

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS
MESTRADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM CURATIVO DE BIOCELULOSE COM PROPRIEDADES
ANTIMICROBIANAS PARA USO NO TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂ-
NEAS EM MODELO LABORATORIAL**

EDUARDA ZENI NEVES

Joinville – SC

2022

EDUARDA ZENI NEVES

DESENVOLVIMENTO DE UM CURATIVO DE BIOCELULOSE COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS PARA USO NO TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM MODELO LABORATORIAL

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE – como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Engenharia de Processos.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Testa Pezzin.

Coorientadora: Profa. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider.

Joinville – SC

2022

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

N518d	Neves, Eduarda Zeni Desenvolvimento de um curativo de biocelulose com propriedades antimicrobianas para uso no tratamento de feridas cutâneas em modelo laboratorial / Eduarda Zeni Neves; orientadora Dra. Ana Paula Testa Pezzin; coorientadora Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider. – Joinville: UNIVILLE, 2022. 169 p.: il. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos – Universidade da Região de Joinville) 1. Curativos – Desenvolvimento. 2. Ferimentos e lesões - Tratamento. 3. Pele – Ferimentos e lesões. 4. Celulose – Uso terapêutico. I. Pezzin, Ana Paula Testa (orient.). II. Schneider, Andréa Lima dos Santos (coorient.). III. Título. CDD 677.8
-------	--

Termo de Aprovação

"Desenvolvimento de um Curativo de Biocelulose com Propriedades Antimicrobianas para uso no Tratamento de Feridas Cutâneas em Modelo Laboratorial"

por

Eduarda Zeni Neves

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestra em Engenharia de Processos, área de concentração Desenvolvimento e Gestão de Processos e Produtos e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos.



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



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



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

Banca Examinadora:



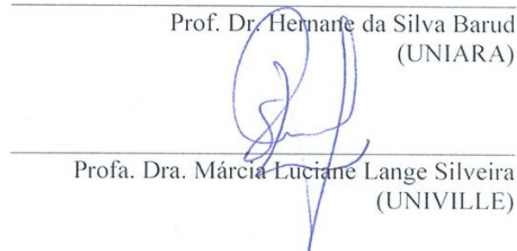
Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin



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



Prof. Dr. Hernane da Silva Barud
(UNIARA)



Prof. Dra. Márcia Luciane Lange Silveira
(UNIVILLE)

Joinville, 30 de março de 2022.

A sua profissão é privilégio e aprendizado (...)
Toda pessoa que serve além do dever, encontrou o caminho para a verdadeira felicidade.

André Luiz

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 a Deus, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir, proteção para me amparar, por ter iluminado a minha trajetória, guiado meus passos e por permitir a realização e conclusão deste trabalho, sem ele nada disso seria possível, sou eternamente grata. E também por sempre colocar pessoas maravilhosas no meu caminho.

Agradeço ao meu pai Fernando Antônio Bartolomei Neves (*in memorian*) e à minha vó Floracy dos Santos Zeni (*in memorian*) por terem confiado em mim, por todos os ensinamentos e pela construção do meu caráter, que me capacitaram para que eu tivesse condições de chegar até aqui!

Minha profunda gratidão à minha mãe, Edna Floraci Zeni, que sempre acreditou em mim, por todos os seus esforços, para que o meu sonho pudesse se concretizar. Aos meus irmãos, Lucas e Caio, e à minha mãe por entenderem minha ausência em diversos momentos e sempre fazerem mais do que o possível para que eu conseguisse seguir adiante.

À professora Dra. Ana Paula Testa Pezzin, pela oportunidade de ingressar numa área tão fascinante, pela orientação, conhecimentos transmitidos e principalmente por sua amizade, atenção comigo e constante incentivo, sempre dando-me oportunidade de desenvolvimento profissional/ pessoal.

À professora Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider, pela coorientação e pelos ensinamentos.

À Professora MSc. Michele Cristina Formolo Garcia, pela colaboração com seus conhecimentos e amizade.

Ao Professor MSc. Giancarlo Décimo Grazziotin pelo grande apoio, incentivo, atenção, pelos ensinamentos, conselhos, amizade e toda ajuda de sempre, será sempre uma referência para mim!

Agradeço aos alunos de Iniciação Científica: Bruna Segat, Geasi L. Martins, Graziéli P. Katrucha e Sandro R. K. Junior pelo auxílio nas atividades experimentais, companheirismo, força, parceria em todas as horas, ombro de desabafos e risadas nos dias cinzentos. À Victoria Fonseca Silveira do grupo de pesquisa materiais poliméricos pelo carinho e ajuda de sempre.

À amiga Ketlin Cristine Batista Mancinelli, pelo carinho, risadas, desabafos e boa vontade em me ajudar sempre!

A todas as pessoas que conheci durante o Mestrado, cada uma tem uma importância e lembrança na minha vida.

A todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Agradeço a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE e a FAPESC pelo apoio financeiro e bolsa de estudos, aos professores pelos conhecimentos transmitidos e aos meus colegas de curso pelo conhecimento compartilhado, desabafos, risadas e companheirismo.

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

RESUMO

Desenvolvimento de um curativo de biocelulose com propriedades antimicrobianas para uso no tratamento de feridas cutâneas em modelo laboratorial.

As feridas diabéticas estão frequentemente associadas a complicação por micro-organismos afetando muitos pacientes e constituindo um grave problema de saúde pública mundial pela falta de tratamentos eficientes. Isso motivou os pesquisadores a desenvolver soluções para resolver esse problema de saúde. Entre as opções de curativos que vem ganhando destaque está a celulose bacteriana (CB) por ter a função de barreira física eficiente contra qualquer tipo de infecção externa e ao mesmo tempo permite a transferência de fármacos para a ferida mantendo-a tratada. Mesmo se comportando como um excelente curativo, o seu uso industrial enfrenta dificuldades em virtude de conseguir uma produção em larga escala da CB com tempo reduzido e maior rendimento para suprir a demanda industrial. Portanto, o presente estudo teve como objetivo estudar diferentes meios de cultivo para produção de CB com baixo custo e maior produtividade para otimizar a produção da CB pela bactéria *Komagataeibacter hansenii*, além de incrementar o curativo de celulose bacteriana com extratos vegetais para agregar propriedades específicas, como ação anti-inflamatória, cicatrizante e bactericida. Dentre os meios testados, o meio contendo amido solúvel e lactose se destacou, conseguindo obter uma CB com produção de 233% maior quando comparada a obtida no meio de referência HS e com redução de 71% nos custos relacionados ao meio nutricional e a celulose (R\$/g de CB). Das amostras caracterizadas, todas apresentaram comportamento térmico, morfológico e grupamentos funcionais equivalentes ao da estrutura padrão da CB. Nos testes envolvendo extratos vegetais, dentre os 6 escolhidos para o estudo, o extrato de barbatimão se destacou nas análises de compostos fenólicos e antimicrobiano contra o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, sugerindo grande potencial da CB como curativo para aplicação no tratamento de feridas contaminadas. Nas CB incorporadas com barbatimão houve redução na estabilidade térmica das membranas, entretanto, essa redução não interfere na sua utilização como curativo, já que essa aplicação não irá expor o polímero a elevadas temperaturas.

Palavras-chave: Celulose bacteriana, *Komagataeibacter hansenii*, extratos vegetais, regeneração tecidual, produção.

ABSTRACT

Development of a biocellulose dressing with antimicrobial properties for use in the treatment of skin wounds in a laboratory model.

Diabetic wounds are often associated with complications by microorganisms affecting many patients and constituting a serious public health problem worldwide due to the lack of efficient treatments. This motivated researchers to develop solutions to solve this health problem. Among the dressing options that have been gaining prominence is bacterial cellulose (BC) for having the function of an efficient physical barrier against any type of external infection and at the same time allowing the transfer of drugs to the wound, keeping it treated. Even behaving as an excellent dressing, its industrial use faces difficulties due to achieving a large-scale production of BC with reduced time and greater yield to meet industrial demand. Therefore, the present study aimed to study different culture media for the production of BC with low cost and higher productivity to optimize the production of BC by the bacterium *Komagataeibacter hansenii*, in addition to increasing the bacterial cellulose dressing with plant extracts to add specific properties, as an anti-inflammatory, healing and bactericidal action. Among the tested media, the medium containing soluble starch and lactose stood out, achieving a BC with a production of 233% higher when compared to that obtained in the HS reference medium and with a 71% reduction in costs related to the nutritional medium and cellulose (R\$/g of BC). Of the samples characterized, all presented thermal behavior, morphology and functional groups equivalent to the standard structure of BC. In tests involving plant extracts, among the 6 chosen for the study, barbatimão extract stood out in the analysis of phenolic and antimicrobial compounds against the growth of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, suggesting great potential of BC as a curative for application in the treatment of contaminated wounds. In the BC incorporated with barbatimão, there was a reduction in the thermal stability of the membranes, however, this reduction does not interfere with its use as a dressing, since this application will not expose the polymer to high temperatures.

Keywords: Bacterial cellulose, *Komagataeibacter hansenii*, herbal extracts, tissue regeneration, production.

RESUMEN

Desarrollo de un apósito de biocelulosa con propiedades antimicrobianas para su uso en el tratamiento de heridas cutáneas en un modelo de laboratorio.

Las heridas diabéticas suelen estar asociadas a complicaciones por microorganismos que afectan a muchos pacientes y constituyen un grave problema de salud pública a nivel mundial debido a la falta de tratamientos eficaces. Esto motivó a los investigadores a desarrollar soluciones para resolver este problema de salud. Entre las opciones de apósitos que han ido cobrando protagonismo se encuentra la celulosa bacteriana (CB) por tener la función de una eficiente barrera física contra cualquier tipo de infección externa y al mismo tiempo permitir el paso de fármacos a la herida, manteniéndola tratada. Aun comportándose como un excelente aderezo, su uso industrial enfrenta dificultades debido a que se logra una producción de CB a gran escala con tiempos reducidos y mayor rendimiento para satisfacer la demanda industrial. Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo estudiar diferentes medios de cultivo para la producción de CB con bajo costo y mayor productividad para optimizar la producción de CB por parte de la bacteria *Komagataeibacter hansenii*, además de incrementar el aderezo de celulosa bacteriana con extractos de plantas para agregar propiedades específicas, como acción antiinflamatoria, cicatrizante y bactericida. Entre los medios probados, se destacó el medio que contenía almidón soluble y lactosa, logrando un CB con una producción 233% superior al obtenido en el medio de referencia HS y con una reducción del 71% en los costos relacionados con el medio nutricional y la celulosa. (R\$/g de CB). De las muestras caracterizadas, todas presentaron comportamiento térmico, morfología y grupos funcionales equivalentes a la estructura estándar de CB. En pruebas con extractos de plantas, entre los 6 elegidos para el estudio, el extracto de barbatimão se destacó en el análisis de compuestos fenólicos y antimicrobianos contra el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, lo que sugiere un gran potencial de CB como apósito para aplicación en el tratamiento de heridas contaminadas. En el CB incorporado con barbatimão, hubo una reducción en la estabilidad térmica de las membranas, sin embargo, esta reducción no interfiere con su uso como apósito, ya que esta aplicación no expone el polímero a altas temperaturas.

Palabras claves: Celulosa bacteriana, *Komagataeibacter hansenii*, extractos vegetales, regeneración tisular, producción.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura química com as ligações glicosídicas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4) e as ligações de hidrogênio intra e intermoleculares da celulose	32
Figura 2 – Modelo simplificado da rota metabólica para a biossíntese da CB a partir de glicose, manitol ou glicerol por <i>K. hansenii</i> ATCC 23769	38
Figura 3 – Bactéria <i>Komagataeibacter</i> secretando fibrilas de celulose em fitas para formação da membrana: (a) micrografia eletrônica de transmissão - MET (HIRAI; TSUJI; HORII, 2002) e (b) imagem durante a síntese.....	40
Figura 4 – Esquema do processo síntese da CB utilizando amido: a) Os grânulos de amido em suspensão no meio de cultura; (b) Após a autoclave, o amido é parcialmente gelatinizado, a lixiviação de amilose e os grânulos incham; (c) nanofibrilas de CB crescem na presença do amido parcialmente gelatinizado; (d) Após prensagem a quente em prensa hidráulica a 105 °C, o nanocompósito mostra redes interpenetrantes de amilose e celulose	45
Figura 5 – Membranas de CB obtidas sob condição estática (a) e agitada (b)	48
Figura 6 – Representação da celulose: (a) Estrutura molecular da CB úmida e (b) micrografia de superfícies da CB	54
Figura 7 – Ilustração das plantas selecionadas para o estudo: calêndula (a), picão-preto (b), urucum (c), barbatimão (d), ipê-roxo (e) e girassol (e).....	63
Figura 8 – Fluxograma simplificado da metodologia adotada para o estudo dos meios de cultivo.....	68
Figura 9 – Fluxograma simplificado da metodologia adotada para o estudo das membranas curativas (bioativas). *membranas HS e ManitolLAS-65	69
Figura 10 – Diagrama de Ishikawa mostrando os diferentes parâmetros que podem afetar significativamente os resultados do processo de produção da CB. Fatores marcados com * e ** foram considerados para o estudo de otimização, sendo parâmetros fixos e variáveis, respectivamente.....	83
Figura 11 – Gráficos do estudo dos diferentes meios de cultivo: (a) produção de CB em base seca (g/L) e (b) do pH inicial e pH final. *Letras não compartilhadas no gráfico representam valores com diferença significativa pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$)	89

Figura 12 – Aspectos físicos das membranas de celulose úmida produzidas em meio de cultivo (a) HS, grupo ManitolAS (b) -37,5, (c) -50 e (d) -75 e grupo ManitolLAS (e) -42,5, (f) -47,5, (g) -65, (h) -70 e (i) -100.....	90
Figura 13 – Estimativa de custo para obtenção de 1 L do meio HS e dos meios de cultivo otimizados (a) e produção em base seca dessas membranas (b). *Letras não compartilhadas no gráfico representam valores com diferença significativa pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).....	95
Figura 14 – Cinética de produção da CB por <i>K. hansenii</i> do meio HS e ManitolLAS-65 a 30 °C sob condição estática durante 15 dias (a) e em 7 dias de cultivo (b). *Letras não compartilhadas no gráfico representam valores com diferença significativa pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).....	98
Figura 15 – Aspectos físicos das membranas de celulose úmida produzidas nos meios de cultivo HS (letras com final 1) e ManitolLAS-65 (letras com final 2) nos diferentes tempos de cultivo: (a) 1 dia, (b) 2 dias, (c) 3 dias, (d) 4 dias, (e) 5 dias, (f) 6 dias, (g) 7 dias, (h) 8 dias, (i) 9 dias, (j) 10 dias, (k) 11 dias, (l) 12 dias, (m) 13 dias, (n) 14 dias e (o) 15 dias	99
Figura 16 – Curvas de análise termogravimétrica (TG) e termogravimétrica diferencial (DTG) obtidas por TGA, para as diferentes amostras de CB	105
Figura 17 – Espectros de FTIR obtidos para as membranas puras nos diferentes meios de cultivo.....	108
Figura 18 – Micrografias de CB obtidas com aumento de 5000x, 10000x e 15000x, respectivamente, para as membranas puras nos diferentes meios de cultivo: HS (a, b, c), ManitolAS-75 (d, e, f), ManitolLAS-70 (g, h, i) e ManitolLAS-65 (j, k, l).....	111
Figura 19 – Curva de calibração do ácido gálico.....	112
Figura 20 – Antimicrobiano dos extratos fluidos para (a) <i>E. coli</i> , (b) <i>P. aeruginosa</i> e (c) <i>S. aureus</i>	114
Figura 21 – Antimicrobiano das CBs incorporadas para (a) <i>E. coli</i> , (b) <i>P. aeruginosa</i> e (c) <i>S. aureus</i>	116
Figura 22 – Curvas de análise termogravimétrica (TG) e termogravimétrica diferencial (DTG) obtidas por TGA, para as diferentes amostras de CB	118
Figura 23 – Espectros de FTIR obtidos para as amostras	121

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Produção de celulose bacterina a partir de <i>K. hansenii</i> (ATCC 23769) utilizando diferentes fontes nutricionais em cultivo estático	43
Quadro 2 – Composição dos meios de cultivo e agrupamentos.....	73
Quadro 3 – Dados obtidos da análise de TGA para as membranas de CB pura em meios HS, MF-35, PHS, Manitol, ManitolAS-75/50/37,5/25 e ManitolLAS-100/70/65/47,5/42,5. * nd = não determinado	104
Quadro 4 – Dados obtidos da análise de FTIR para as membranas de CB em meio padrão, MF-35, PHS, Manitol, ManitolAS-75, ManitolAS-50, ManitolAS-37,5, ManitolAS-25, ManitolLAS-100, ManitolLAS-70, ManitolLAS-65, ManitolLAS-47,5 e ManitolLAS-42,5. *U= estiramento; Ua= estiramento assimétrico; δ= deformação angular	107
Quadro 5 – Dados obtidos da análise de TGA para as membranas de CB pura em meios HS e ManitolLAS-64, para membranas de CB imersas em etanol (HS/E e ManitolLAS-65/E) e as membranas incorporadas com extrato de barbatimão (HS/E-EFB e ManitolLAS-65/E-FB). * nd = não determinado	117
Quadro 6 – Dados obtidos da análise de FTIR para as membranas de CB puras (HS e ManitolLAS-65), CB imersas em etanol (HS/E e ManitolLAS-65/E), CB incorporadas com extrato de barbatimão (HS/E-EFB e ManitolLAS-65/E-EFB) e do extrato fluído de barbatimão (EFB). *U= estiramento; Ua= estiramento assimétrico; Us= estiramento simétrico; δ= deformação angular; EFB= extrato fluído de barbatimão	122

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1 OBJETIVOS.....	20
1.1 Objetivo geral	20
1.2 Objetivos específicos.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Feridas.....	21
2.1.1 Estágio de cicatrização.....	22
2.1.2 Tratamento	23
2.1.3 Tendência.....	26
2.2 Direcionamento do estudo	28
2.2.1 Biomateriais.....	28
2.2.2 Biopolímeros	29
2.2.3 Celulose bacteriana (CB)	31
2.2.3.1 Produção da Celulose Bacteriana (CB).....	34
2.2.3.1.1 Micro-organismos produtores de celulose bacteriana	35
2.2.3.1.2 Metabolismo	36
2.2.3.1.3 Condições Nutricionais.....	40
2.2.3.1.4 Condições de cultivo	46
2.2.3.1.5 Purificação da CB.....	48
2.2.3.1.6 Secagem	50
2.2.3.2 Propriedades da celulose bacteriana e aplicações	51
2.2.3.3 Perspectivas futuras relatadas	55
2.2.3.4 Celulose Bacteriana/ Plantas medicinais.....	58
2.2.4 Plantas medicinais	62
2.3 Relevância do trabalho	66
3 METODOLOGIA	67
3.1 Produtos químicos e reagentes	69
3.2 Obtenção da membrana de celulose	70
3.2.1 Análise dos parâmetros de processos.....	70
3.2.2 Micro-organismo	70
3.2.3 Preparação do inóculo líquido	71

3.2.4 Condições de cultivo	71
3.2.5 Purificação da membrana de celulose bacteriana	76
3.2.6 Determinações analíticas	76
3.2.6.1 Análise de pH dos meios de cultivo antes e após a incubação	76
3.2.6.2 Produção da CB	76
3.2.7 Estimativa de custo dos meios de cultivo em escala laboratorial	77
3.2.8 Influência do tempo de cultivo na produção de CB	77
3.2.9 Preparação das amostras para caracterização	77
3.3 Obtenção das membranas curativas (bioativas)	78
3.3.1 Produção da membrana de celulose bacteriana	78
3.3.2 Purificação das membranas de celulose bacteriana	78
3.3.3 Incorporação dos extratos vegetais	79
3.4 Caracterização	79
3.4.1 Caracterização biológica (antimicrobiano)	79
3.4.2 Caracterizações estruturais	80
3.4.2.1 Análise termogravimétrica (TGA)	80
3.4.2.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	81
3.4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	81
3.4.3 Caracterizações químicas	81
3.4.3.1 Determinação dos compostos fenólicos totais	81
3.4.4 Análise estatística	82
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	83
4.1 Produção da CB	83
4.1.1 Estimativa de custo dos meios de cultivo em escala laboratorial	94
4.1.2 Perfil de cultivo da biossíntese da CB dos meios HS e ManitolLAS-65	97
4.2 Caracterizações	102
4.2.1 Análise Termogravimétrica (TGA)	102
4.2.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	106
4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	110
4.3 Membranas curativas (bioativas)	112
4.3.1 Caracterizações dos extratos pré-selecionados	112
4.3.1.1 Determinação dos compostos fenólicos totais dos extratos	112
4.3.1.2 Atividade biológica (antimicrobiano) dos extratos	114
4.3.2 Caracterizações das membranas com os extratos selecionados	116

4.3.2.1 Atividade biológica (antimicrobiano) das CB/extratos selecionados.....	116
4.3.3 Análise Termogravimétrica (TGA).....	117
4.3.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	120
CONCLUSÃO	125
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	128
REFERÊNCIAS.....	129
APÊNDICE A – Composição e resultados do estudo dos meios de cultivo que não entraram na discussão desse trabalho.....	165
ANEXO A – Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações	169

INTRODUÇÃO

As feridas diabéticas são difíceis de curar e representam um desafio clínico significativo tanto para os pacientes quanto para os profissionais de saúde (CHAWLA et al., 2009). Essas lesões estão frequentemente associadas a complicação por micro-organismos, já que permanecem abertas por meses e expõem os tecidos internos a agentes como bactérias e fungos que podem crescer e se multiplicar causando infecções e nos casos mais graves levando a amputações (ARIS et al., 2019). Assim, o cuidado e o tratamento eficaz dessas lesões são essenciais para reduzir as infecções, reverter os números de casos de amputações (55 mil amputações/ ano no Brasil) (HOSPITAL SANTA CLARA, 2014) e promover o bem-estar dos pacientes.

Como consequência dos avanços na área da biotecnologia uma variedade de novos produtos terapêuticos tem surgido nos últimos anos para resolver esse problema. Entre as novas abordagens está a criação de substitutos de pele que não apenas forneçam uma nova cobertura temporária e eficaz para tratar as feridas, mas que atuem como reservatórios de fármacos, chamados de *bioactive wound dressing*, que tem a função de impedir o crescimento microbiano e trazer fatores de crescimento e substâncias biológicas para ajudar a aumentar ou modular o processo de cicatrização, fazendo com que as feridas se mantenham estéreis, úmidas e tratadas (BOATENG; CATANZANO, 2015; CHOUHAN et al., 2019; HAN; CEILLEY, 2017; MURPHY; EVANS, 2012).

Para o sucesso desses curativos é preciso considerar vários aspectos importantes, como: (i) o uso de matérias-primas baratas e resíduos agrícolas ou de alimentos; (ii) facilidade na síntese e no método de processamento; (iii) propriedades biocompatíveis; (iv) impacto reduzido no meio ambiente ao final da vida útil; (v) fabricação de produtos biodegradáveis (MOCANU et al., 2019). Nesse sentido, a engenharia de tecidos vem revelando o grande potencial de vários polissacarídeos no desenvolvimento de curativos (STUMPF et al., 2013).

Dentre os polissacarídeos, os de origem microbiana apresentam propriedades úteis para diversas aplicações biomédicas, como exemplo o ácido hialurônico, dextrano, alginato, esquizofilano, celulose bacteriana, etc (CZAJA et al., 2007; HAMED I et al., 2020; SAFAEE-ARDAKANI et al., 2019). A celulose bacteriana é um biomaterial não tóxico, biocompatível, biodegradável, altamente poroso, semelhante a matriz

extracelular, apresenta alta capacidade de retenção de líquidos e permite a transferência de fármacos para a ferida, servindo ao mesmo tempo, como barreira física eficiente contra qualquer tipo de infecção externa. Logo, esse material tem um impacto significativo no desenvolvimento de produtos biotecnológicos de interesse na área médica em tratamentos de feridas crônicas (CZAJA et al., 2007; DONINI et al., 2010; PACHECO et al., 2018a; PORTELA et al., 2019; SHARMA; BHARDWAJ, 2020).

Como o Brasil apresenta uma das maiores biodiversidade do planeta e com uma rica flora, possuindo mais de dezenas de milhares de espécies nativas, além de possuir uma rica diversidade étnica e cultural, detendo portanto, um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, torna-se essencial a investigação a respeito das plantas existente no território brasileiro e a sua associação com novas tecnologias e, conseqüentemente, torná-las progressivamente valiosas no cotidiano (BRASIL, 2016).

Então, a fim de desenvolver um curativo inovador e ecologicamente correto, que provoque o menor impacto possível ao meio ambiente e criar novas formas de aplicação para a flora brasileira, agregando valor a um vasto e importante recurso natural disponível em nosso país, optou-se por relacionar a celulose bacteriana com extratos de picão-preto (*Bidens pilosa*) devido a presença de poliacetilenos e flavonoides, que conferem propriedades antioxidantes, anti-hiperglicêmicas, anti-úlceras, anti-inflamatórias, antitérmicas, antivirais, antifúngicas e antibacterianas; de girassol (*Helianthus annuus*), pois favorece o desbridamento autolítico no leito da ferida, contribuindo na produção de metaloproteínas que induzem a granulação e podem acelerar o processo de cicatrização; de urucum (*Bixa orellana*), que apresenta atividade antimicrobiana *in vitro* e atividade antioxidante; de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*), que possui atividade cicatrizante, anti-inflamatória, hemostática, antisséptica, antidiarreica e antiedematogênica; de calêndula (*Calendula officinalis*) por apresentar atividade cicatrizante em feridas cutâneas e atividade antibacteriana *in vitro*; e de ipê roxo (*Tabebuia heptaphylla e impetiginosa*), que apresenta ação anti-inflamatória, analgésica, antibiótica e antineoplásica, além de favorecer o processo de cicatrização (COELHO et al., 2010; FERREIRA et al., 2012; PARENTE et al., 2009; SANTOS; CURY, 2011; VILAR et al., 2014).

Entretanto, um grande obstáculo é encontrado no âmbito da produção da celulose bacteriana, pois ainda há uma lacuna para encontrar formas viáveis e de bai-

xo custo, para difundir e viabilizar sua produção em larga escala (CHAGAS, 2018; TSOUKO et al., 2015; TURECK, 2017). A maior dificuldade para possibilitar o seu uso comercialmente está em conseguir uma produção em larga escala da CB com tempo reduzido e maior rendimento para suprir a demanda industrial. 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, tais como a utilização de resíduos agroindustriais ou opções comerciais com custos mas baixo (HUTCHENS et al., 2007; MOHITE; PATIL, 2014; TURECK, 2017).

Dessa forma, a possibilidade de produzir CB em larga escala com êxito será alcançada e a tornará um biomaterial imperativo, utilizada na criação de uma vasta variedade de dispositivos e produtos inovadores (MOHITE; PATIL, 2014; MONA et al., 2019; YOSHINAGA; TONOUCHI; WATANABE, 1997).

Segundo Jugend e Silva (2013), a palavra inovação significa introduzir novidades. As atividades de inovação derivam da exploração de mudanças e das possibilidades de realizar as coisas de maneiras novas ou diferentes. É relevante notar que inovação difere de ciência. A inovação possui caráter comercial e aplicado. A ciência, por sua vez, tem como finalidade central a produção de novos conhecimentos técnico-científicos, porém, sem aplicação imediata em produtos, serviços e processos (JUGEND; SILVA, 2013).

Dessa forma, diante de todos os fatos mencionados e as possibilidades promissoras de aplicação da celulose bacteriana associada a tais extratos, se justifica o seu estudo visando sua aplicação terapêutica, avaliação de diferentes meios de cultura para o otimizar a produção de CB em larga escala com baixo custo e maior produtividade para tornar real a sua produção em um futuro próximo.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Desenvolver um curativo antimicrobiano de celulose bacteriana produzido a partir de fontes alternativas de carbono e nitrogênio carregado com extratos vegetais e avaliar as suas propriedades visando sua aplicação para uso no tratamento de feridas cutâneas.

1.2 Objetivos específicos

- Definir os melhores parâmetros de processos para a produção de celulose bacteriana por *Komagataeibacter hansenii* (ATCC 23769) a partir da aplicação da ferramenta de qualidade de causa e efeito (diagrama de Ishikawa);
- Avaliar a síntese de CB por *K. hansenii* utilizando meios de cultivos com diferentes fontes de nutrientes com o intuito de aumentar a produtividade;
- Avaliar as membranas com os melhores resultados de produção em base seca por meio de análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Análise Termogravimétrica (TGA), Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR) e custos dos meios de cultivos para selecionar o melhor cultivo;
- Avaliar o perfil de cultivo da produção de CB do meio padrão e o meio alternativo selecionado para definir o menor tempo possível de cultivo;
- Caracterizar as membranas de celulose bacteriana incorporadas com os extratos vegetais de barbatimão, calêndula, girassol, ipê-roxo, picão-preto e urucum por meio de análises de Espectroscopia na Região do Infravermelho, térmicas, propriedades antimicrobianas e fenólicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Feridas

As feridas/úlceras são interrupções na continuidade de um tecido cutâneo-mucoso, levando a alterações estruturais e fisiológicas com extensão e profundidade variáveis, podendo ainda, serem definidas como aguda ou crônica ao que se refere ao tempo de reparação tissular (BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001; BRASIL, 2002).

As feridas agudas cicatrizam completamente dentro de um tempo esperado, entre 2 a 3 meses, englobando feridas relacionadas a cirurgias, queimaduras, traumas, perfurações, etc (BOATENG; CATANZANO, 2015; BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001). As feridas crônicas, entretanto, apresentam um longo período de cicatrização, sem reparo tecidual e sem integridade funcional após um período de tratamento de 3 meses e a cicatrização completa pode levar anos, porém, tendem a reaparecerem, tornando-se um tratamento prolongado, doloroso e caro, além de caracterizar um problema de saúde pública (COSTA et al., 2020; LEITE, 2018).

Como principais consequências das úlceras crônicas estão a imobilidade, limitações físicas, dor constante e danos psicológicos, além de também afetar negativamente as taxas de morbimortalidade, causando incapacitação temporária ou permanente dos pacientes (COSTA et al., 2020).

E ainda, essas lesões estão frequentemente associadas a complicação por micro-organismos, sobretudo quando relacionadas com patologias sistêmicas que prejudiquem o processo de cicatrização, progredindo assim o quadro da ferida e levando a perda significativa de tecido que pode afetar estruturas vitais, como ossos, articulações e nervos (BOATENG; CATANZANO, 2015). Entre as principais patologias associadas à dificuldade de cicatrização estão a doença arterial coronariana, doença vascular periférica, câncer, obesidade e diabetes mellitus (BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001; HESS, 2011).

A diabetes mellitus é uma doença crônica e está entre as maiores epidemias desse século atingindo mais de 15 milhões de brasileiros e 537 milhões de pessoas em todo o mundo (IDF, 2021). As estimativas indicam que em 2045 esse número será superior a 700 milhões e tem como uma das principais complicações a dificuldade de cicatrização de feridas (IDF, 2021). As lesões diabéticas ocorrem geralmente nos pés e são importantes causas de hospitalização prolongada e juntamente

com a falta de tratamentos eficientes, resultam em 55 mil amputações/ano no Brasil (HOSPITAL SANTA CLARA, 2014). Logo, as complicações associadas com as feridas diabéticas constituem um grave problema de saúde pública mundial, afetando muitos pacientes, contribuindo assim para os custos de saúde pública e interferindo na qualidade de vida dessa população.

2.1.1 Estágio de cicatrização

A cicatrização de feridas é um processo altamente dinâmico e envolve interações complexas de moléculas da matriz extracelular, mediadores solúveis, várias células e subtipos de leucócitos infiltrados (EMING et al., 2007). O processo cicatricial é comum a todas as feridas e consiste em uma cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que interagem para que ocorra a reconstituição tecidual (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

Para alcançar a integridade e a homeostase do tecido, o processo de cicatrização envolve três fases que se sobrepõem no tempo e no espaço: inflamação, formação de tecidos e remodelação de tecidos (EMING et al., 2007):

- Fase inflamatória: após a lesão acontece a agregação plaquetária aos vasos sanguíneos danificados que é seguida pela infiltração de leucócitos (células fagocíticas que liberam espécies reativas de oxigênio (ERO's) e que são antimicrobianas, e proteases que limpam a ferida de corpos estranhos e bactérias), neutrófilos e macrófagos no local da ferida, que irão fornecer fatores de crescimento e matrizes provisórias necessárias para o recrutamento de células epidérmicas e dérmicas no leito da ferida. Essa fase é fundamental no processo de reparo e tem duração de um a quatro dias, tendo como objetivo evitar sangramentos excessivos e fornecer proteção provisória para a área ferida, conter e definir a extensão da área lesionada, combater a contaminação por bactérias e controlar o acúmulo de tecidos mortos ou danificados (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; DEMIDOVA-RICE; HAMBLIN; HERMAN, 2012; EMING et al., 2007);
- Fase de formação de tecidos: é caracterizada pela epitelização e o tecido de granulação recém-formado, consistindo em células endoteliais, macrófagos e fibroblastos, que começam a cobrir e encher a área da ferida para restaurar a integridade do tecido (EMING et al., 2007);

- Fase de remodelação de tecidos: depois de 1 a 2 semanas após a lesão acontece a síntese, remodelação e deposição de moléculas estruturais da matriz extracelular através das células fibroblásticas diferenciadas (miofibroblastos), que são indispensáveis para iniciar o reparo e a progressão para o estado de cura, tornando-se a fase mais longa. Finalmente, ocorre a apoptose das células fibroblásticas, levando à formação de um tecido cicatricial relativamente acelular cuja resistência à tração é comparável à pele não ferida (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; DEMIDOVA-RICE; HAMBLIN; HERMAN, 2012; EMING et al., 2007).

O processo de cura normalmente acontece de forma rápida e satisfatória, porém nos casos das lesões crônicas, esta progressão natural é afetada, ocorrendo ausência ou a lentidão da regeneração tecidual (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; CÔRTEZ, 2008; FLETCHER, 2008). O processo de cicatrização neste caso não é de forma ordenada, uma vez que ele é interrompido em um ou mais locais, devido a uma fase inflamatória prolongada ou excessiva, infecções persistentes, formação de biofilmes resistentes a fármacos e à incapacidade das células dérmicas e epidérmicas na resposta ao estímulo reparador, resultando no fracasso da cicatrização dessas feridas (DEMIDOVA-RICE; HAMBLIN; HERMAN, 2012; EDWARDS; HARDING, 2004; EMING et al., 2007; FLETCHER, 2008; WOLCOTT; RHOADS; DOWD, 2008). Além disso, feridas crônicas diabéticas podem ser caracterizadas por angiogênese inadequada, resultando em diminuição do fluxo sanguíneo para o leito da ferida.

2.1.2 Tratamento

A infecção da ferida é uma das principais preocupações de segurança para os pacientes, bem como para os profissionais de saúde em todo o mundo, assim, o cuidado e o tratamento das feridas são essenciais para reduzir as infecções e promover o bem-estar dos pacientes.

Uma questão que merece ressalva são as feridas do tipo crônicas, pois mais de 90% dessas feridas apresentam colonização por micro-organismos, visto que essas feridas estão associadas a diferentes patologias, o que interfere no processo de cicatrização, demandando um tempo maior de cura e tornando-as mais suscetíveis à

entrada de partículas externas e micro-organismos, causando assim infecções, ainda mais no caso das feridas diabéticas que são caracterizadas pelo seu aspecto seco e queratinizado, o que racha e fissura mais facilmente, levando a um portal para infecções com uma prevalência de mais de 50% de feridas infectadas nesses pacientes (ALVARADO-GOMEZ et al., 2018; GARMS et al., 2019; HOBIZAL; WUKICH, 2012; SULAEVA et al., 2015). Ressalta-se ainda, que a colonização por micro-organismos na lesão não indica necessariamente que ela contaminou, a contaminação de micro-organismos no leito da ferida acontece acima de 10^5 unidades formadoras de colônias (UFC) por miligrama de tecido (BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001; KAMAMOTO; CARVALHO, 2011).

A maioria das infecções em feridas são causadas por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* e algumas espécies de *Proteus*, *Clostridium* e *Coliform*, com ressalva para *S. pyogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis*, *Vibrio vulnificus*, *Aeromonas hydrophila*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* em pacientes diabéticos (AKASH et al., 2020; ARIS et al., 2019; BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001; GANGAWANE; BHATT; SUNMEET, 2016; HALBERT et al., 1992; TWUM-DANSO et al., 1992). Para combater a infecção e evitar o atraso da cicatrização, antimicrobianos tópicos são utilizados empiricamente há muito tempo, como exemplo a prata tem sido usada desde 69 a.C. (HAN; CEILLEY, 2017; MURPHY; EVANS, 2012).

Os primeiros tratamentos de ferida que se tem conhecimento foram em Alexandria em 3.000 a.C. (GOMES; CARVALHO, 2002). Entre os tratamentos mais antigos e mais usados, tem-se os curativos tradicionais (secos) que são feitos de tecido, como a gaze, que fornecem pouca ou nenhuma oclusão e permitem a evaporação da umidade, resultando em um ambiente seco e causando lesão quando removidos. Foi descoberto ainda, que mesmo 64 camadas de gaze não conseguem impedir a entrada de bactérias exógenas na ferida (HAN; CEILLEY, 2017; OWENS, 1943; SOUZA, 2007). Em 1962 ocorreu a chamada "revolução no conceito de curativos", quando um estudo demonstrou que a taxa de epitelização era 50% mais rápida em um ambiente úmido e que a formação de crostas era minimizada, mudando drasticamente o conceito de ambiente ideal para feridas (de seco para úmido). A partir dessa época, iniciou um grande interesse pelo desenvolvimento de pesquisas, produção e comercialização de curativos úmidos, vindo a serem lançados em 1982 as

coberturas à base de hidrocoloides e nos anos 90 os hidropolímeros, porém, os seus custos elevados foram uma barreira inicial para sua difusão (MANDELBAUM; SANTIS; MANDELBAUM, 2003a; WINTER, 1962).

Ao longo dos tempos o tratamento de feridas foi estudado e o conceito de tratamento ideal foi modificado e aperfeiçoado, como o conceito de fornecimento de um ambiente úmido para incentivar o melhor ambiente para o processo de cicatrização natural (KORRAPATI; BABU, 2000), além de constantemente surgir novas tecnologias e estudos sobre esta temática (GOMES; CARVALHO, 2002).

Atualmente é considerado que o tratamento de feridas envolve aspectos sistêmicos e locais. O método convencional local engloba o procedimento de limpeza e desbridamento, administração de medicamentos e colocação da cobertura na lesão, com o objetivo de auxiliar o restabelecimento da integridade do tecido ou prevenir a infecção por micro-organismos (COSTA et al., 2020). Porém, esse tratamento tem como problema ser realizado mais de uma vez ao dia, causando grande dor e desconforto ao paciente na remoção das coberturas, além de atrasar o crescimento tecidual (COSTA et al., 2020).

Ressalta-se um conceito importante no tratamento de feridas é o papel do desbridamento ou a remoção de material não viável do tecido, o procedimento é realizado através de mecanismos cirúrgicos, autolíticos, enzimáticos, biológicos ou mecânicos (HAN; CEILLEY, 2017; POWERS et al., 2016).

No que tange o uso farmacológico no tratamento de feridas são utilizados enzimas desbridantes (papaína, collagenase, fibrolisina) (LEITE, 2018), anti-inflamatórios (dexametasona) (ABUBAKAR et al., 2012), antimicrobianos (sulfadiazina de prata, prata iônica) (MUANGMAN et al., 2010), ácidos graxos essenciais, adsorventes (carvão ativado) (POLETTI et al., 2002), imunomoduladores (WEN; CHEN; YANG, 2012), entre outros (MANDELBAUM; SANTIS; MANDELBAUM, 2003b; POWERS et al., 2016). Enquanto as coberturas são do tipo gases, filmes e malhas, e ainda oclusivas, semioclusivas e não oclusivas (MANDELBAUM; SANTIS; MANDELBAUM, 2003b).

Para um curativo ser considerado ideal ele tem que desempenhar: fornecimento e manutenção de um ambiente úmido; proteção de feridas contra infecções secundárias, agindo como uma barreira bacteriana; fornecimento de troca gasosa adequada; fornecimento de isolamento térmico livre de partículas ou contaminantes

tóxicos; gestão do excesso de exsudato, permitindo a remoção não traumática; elástico e não antigênico (GUSTAITE et al., 2015; KORRAPATI; BABU, 2000).

Para atender a esses requisitos estão sendo desenvolvidas coberturas avançadas, sintéticas (derivadas de produtos manufaturados ou desenvolvidos em laboratório) e biológicas (derivadas de tecidos naturais), com o intuito de evitar sofrimento ao paciente (KORRAPATI; BABU, 2000).

2.1.3 Tendência

Com o avanço da engenharia de tecidos e da medicina regenerativa, estão sendo criados substitutos da pele que não apenas fornecem uma nova cobertura temporária e eficaz para tratar as feridas, mas também estão mudando o paradigma do gerenciamento de feridas (MURPHY; EVANS, 2012). As novas preparações estão trazendo o uso de coberturas multifuncionais, semipermeáveis, flexíveis, adsorventes, não aderentes e que atuem como reservatórios de fármacos, chamadas de *bioactive wound dressing*, com o intuito de impedir o crescimento microbiano e trazer fatores de crescimento e substâncias biológicas para ajudar a aumentar ou modular o processo de cicatrização, fazendo com que as feridas se mantenham estéreis, úmidas e tratadas (BOATENG; CATANZANO, 2015; CHOUHAN et al., 2019; HAN; CEILLEY, 2017; MURPHY; EVANS, 2012).

A tendência do tipo de cobertura é o uso de materiais à base de polímeros naturais, os quais são considerados uma boa opção para o tratamento de úlceras crônicas (HAN; CEILLEY, 2017). O uso de biopolímeros como material para tratamento de feridas tem um amplo escopo devido às suas excelentes propriedades de biocompatibilidade, capacidade de suportar o crescimento celular, potencial regenerativo, biodegradabilidade, durabilidade e atuam como sistema de liberação de medicamento (BOATENG; CATANZANO, 2015; SAHANA; REKHA, 2018). Ao que se refere a origem, podem ser obtidos de vegetais (amido, celulose e borracha natural), animais (colágeno, ácido hialurônico, quitosana, fibroína de seda), fungos (quitina), bactérias (celulose bacteriana (o qual vai ser o objeto desse estudo)) e algas (alginato), sendo portanto uma classe de curativos sustentáveis em função de utilizar matérias-primas de base biológica para a sua produção e apresentar biodegradação completa sem subprodutos nocivos, logo, não impactam o meio ambiente

(BOATENG; CATANZANO, 2015; SAHANA; REKHA, 2018; SUARATO; BERTORELLI; ATHANASSIOU, 2018).

Esses materiais permitem a fabricação de uma variedade de tipos de curativos e ainda trazem benefícios à farmacoterapia, através da proposta de serem curativos bioativos, pois atuam como reservatório e sistema de liberação de medicamentos e barreira de proteção física das feridas, além de não necessitarem de trocas diárias, o que contribui para o aumento do conforto e da qualidade de vida do paciente durante o tratamento (COSTA et al., 2020; DUTRA et al., 2017; SOUZA et al., 2018). Nos casos de feridas crônicas, em que os pacientes geralmente passam por longos tratamentos e frequentes trocas de curativos, um sistema de liberação controlada de medicamentos no local da ferida pode melhorar a resposta terapêutica dessa lesão (BOATENG; CATANZANO, 2015). Eles podem ser preparados na forma de filmes, esponjas, membranas, hidrogéis ou hidrocolóides, em substituição às formas farmacêuticas convencionais, que são pomadas, cremes, géis, soluções, suspensões e pós (BOATENG; CATANZANO, 2015; COSTA et al., 2020; SIMÕES et al., 2018).

Os medicamentos incorporados podem desempenhar um papel ativo no processo de cicatrização de feridas, diretamente como agentes de limpeza ou desbridantes para remover tecido necrótico ou indiretamente como medicamentos antimicrobianos, que previnem ou tratam agentes de infecção ou forneçam fatores de crescimento para ajudar na regeneração do tecido (BOATENG; CATANZANO, 2015). Desde a chamada "revolução no conceito de curativos" ocorreu um grande interesse no desenvolvimento de curativos antimicrobianos, principalmente, em função das feridas cutâneas infeccionadas serem responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade, tornando-se essencial desenvolver soluções para resolver esse problema de saúde (SIMÕES et al., 2018; WINTER, 1962; WOODFORD; LIVERMORE, 2009).

Outra estratégia que vem ganhando destaque nos últimos anos é o uso de compostos derivados de plantas medicinais, em substituição aos fármacos sintéticos em decorrência da resistência microbiana (KOEHLER; BRANDL; GOEPFERICH, 2018; LIAKOS et al., 2015; PEREIRA et al., 2013). Logo, as plantas medicinais que agreguem atividades antioxidantes, cicatrizantes e antimicrobianas são de interesse para incorporar aos curativos, pois essas propriedades ajudam na contração, vascularização e epitelização da lesão (KRISHNAN; THOMAS, 2019; SUARATO;

BERTORELLI; ATHANASSIOU, 2018). Nesse sentido, vários pesquisadores têm estudado com sucesso a utilização de curativos biopoliméricos associados com plantas medicinais, como por exemplo, filmes de quitosana com óleo de tomilho (ALTIOK; ALTIOK; TIHMINLIOGLU, 2010), esponjas de colágeno com extrato de hamamélis (ANTONIO et al., 2011), fibroína de seda com extrato de cominho preto (MUTHUMANICKAM et al., 2019), celulose pelo método de eletrofiação com óleos essenciais de canela, capim-limão e hortelã-pimenta (LIAKOS et al., 2015), membrana de látex com extratos de própolis (ZANCANELA et al., 2019), cipó-timbó (BARROS et al., 2018) e guaçatonga (BORGES et al., 2014; CARVALHO et al., 2018; TRECCO et al., 2014), membrana de celulose bacteriana com extrato de própolis (BARUD et al., 2013), alginato de sódio com babosa (PEREIRA et al., 2013), entre outros.

2.2 Direcionamento do estudo

2.2.1 Biomateriais

Um grande avanço foi feito nas últimas décadas para desenvolver substitutos de pele para o tratamento de feridas agudas e crônicas, além de constantemente surgir novos estudos no campo de biomateriais com a finalidade de aperfeiçoá-los e torná-los ideais, levando assim, conforto e qualidade de vida para o paciente ao decorrer do tratamento. Esses biomateriais são projetados e desenvolvidos para interagir com os sistemas biológicos e tem como objetivo restaurar, manter ou melhorar a função do tecido afetado por doenças ou acidentes, além de contribuir para o alívio das dores ocasionadas pela lesão (BISWAL; BADJENA; PRADHAN, 2020; SAVOJI et al., 2018). O mercado global de biomateriais está em grande crescimento e as previsões é que chegue em US\$ 207 bilhões até 2024 (MARKETS AND MARKETS, 2019).

Um biomaterial ideal deve possuir as seguintes características: ser biocompatível, biofuncional, bioabsorvível, biodegradável, poroso, permeável para passagem de nutrientes e troca de gases, possuir tamanho de poros que permita a penetração celular e formação de tecido, possuir superfície apropriada para adesão celular, promover produção da matriz extracelular, transportar e transmitir sinais biomoleculares (PALSSON; BHATIA, 2003). Além disso, ele deve ser isento de produzir qualquer resposta biológica adversa local ou sistêmica, ser atóxico, não alergênico, não

inflamatório, não carcinogênico, não antigênico e não mutagênico (BISWAL; BADJENA; PRADHAN, 2020; GHASEMI-MOBARAKEH et al., 2019; MORAIS; GUIMARÃES; ELIAS, 2007; WILLIAMS, 2008).

Os biomateriais podem ser classificados, de acordo com a sua natureza, em duas categorias: os naturais que incluem o colágeno, a seda, a queratina e polissacarídeos; e os sintéticos que englobam as cerâmicas, os polímeros sintéticos, metais e compósitos (BISWAL; BADJENA; PRADHAN, 2020; HA et al., 2013; HOLZAPFEL et al., 2013).

Entre a variedade de tipos de biomateriais, os biopolímeros apresentam grande potencial de uso e têm sido aplicados no desenvolvimento de novos produtos médicos, em especial na criação de curativos, por apresentarem características mecânicas semelhantes aos materiais biológicos e facilidade de manuseio, além de serem naturais e com uma perfeita biocompatibilidade, biodegradabilidade, caráter renovável, semelhança com a matriz extracelular e um ambiente propício para regenerar feridas, por esses motivos que se justifica a escolha desse tipo de biomaterial para ser objeto dessa pesquisa (FARIA-TISCHER; TISCHER, 2012; GRIFFITH, 2000; KIM; BAEZ; ATALA, 2000; LIU et al., 2017; RAMESH; MORATTI; DIAS, 2018; WILLIAMS, 2003).

2.2.2 Biopolímeros

Entre os grandes avanços do século XX destaca-se o desenvolvimento de polímeros sintéticos, devido ao aumento de suas possibilidades de aplicações. Esses polímeros são obtidos principalmente a partir do petróleo, porém, o custo desta matéria-prima, a instabilidade da situação geopolítica das regiões das grandes reservas mundiais, a durabilidade desses materiais a longo prazo e o consenso sobre a necessidade de diminuição das emissões atmosféricas representam uma preocupação global, impulsionando assim a produção de polímeros produzidos a partir de matérias-primas renováveis como alternativa para esse problema (BRITO et al., 2011; GOMES, 2011; IQBAL et al., 2014; KAYRA; AYTEKIN, 2019; LI et al., 2018; UL-ISLAM; KHAN; PARK, 2012a; VALERO-VALDIVIESO; ORTEGÓN; USCATEGUI, 2013). Salienta-se ainda que essa preocupação vem ao encontro dos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODM) e dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

(ODS) para inserir estratégias de sustentabilidade dos nossos recursos para preservar a Terra.

Logo, os polímeros podem ser classificados quanto à sua natureza, como naturais ou sintéticos. Os biopolímeros são polímeros naturais produzidos por seres vivos ou obtidos a partir de matérias-primas de fontes renováveis, como exemplos os materiais vegetais (amido, celulose e borracha natural), animais (colágeno, ácido hialurônico, quitosana, fibroína de seda), fungos (quitina), bactérias (celulose bacteriana), algas (alginato), entre outros (BOATENG; CATANZANO, 2015; BRITO et al., 2011; SAHANA; REKHA, 2018).

Uma grande vantagem do uso dos biopolímeros é que alguns desses materiais apresentam degradação facilitada no ambiente em função da ação de bactérias, fungos e algas, transformando o material em moléculas menores devido à cisão de ligações da sua cadeia principal e consequentemente, contribuindo para a diminuição do impacto ambiental (RAGHAVAN, 1995; REICH; STIVALA, 1971; VALERO-VALDIVIESO; ORTEGÓN; USCATEGUI, 2013).

Os biopolímeros vêm sendo amplamente utilizados como material de suporte para a área biomédica, devido as suas excelentes propriedades de biocompatibilidade, capacidade de suportar o crescimento celular, potencial regenerativo, biodegradabilidade, serem atóxicos, durabilidade, reservatório de fármaco e sistema de liberação de medicamento (BOATENG; CATANZANO, 2015; KHAN et al., 2015; SAHANA; REKHA, 2018). Porém, alguns materiais dessa classe apresentam algumas limitações em função de não apresentarem certas propriedades terapêuticas, como ação antimicrobiana, tanto bactericidas (quando causa a morte de bactérias), bacteriostática (quando inibem o crescimento de bactérias no meio) ou bacteriolítico (além de matar as bactérias também eliminam as células já mortas através do processo de lise celular) (BOATENG; CATANZANO, 2015; KHAN et al., 2015; LOPES, 2019; SAHANA; REKHA, 2018). Tais propriedades em polímeros puros podem ser adicionadas com sua associação a outros materiais com essa característica.

Dentre as possibilidades de fornecimento de novos materiais biopoliméricos para uso em curativos, destaca-se a celulose (KAYRA; AYTEKIN, 2019). Apesar da maioria da celulose ser produzida pelas plantas durante a fotossíntese, alguns micro-organismos tais como as algas, fungos ou bactérias também são capazes de produzir este polissacarídeo, surgindo então, como uma fonte alternativa mais responsável (KLEMM et al., 2018). Visto que, a crescente demanda de derivados de

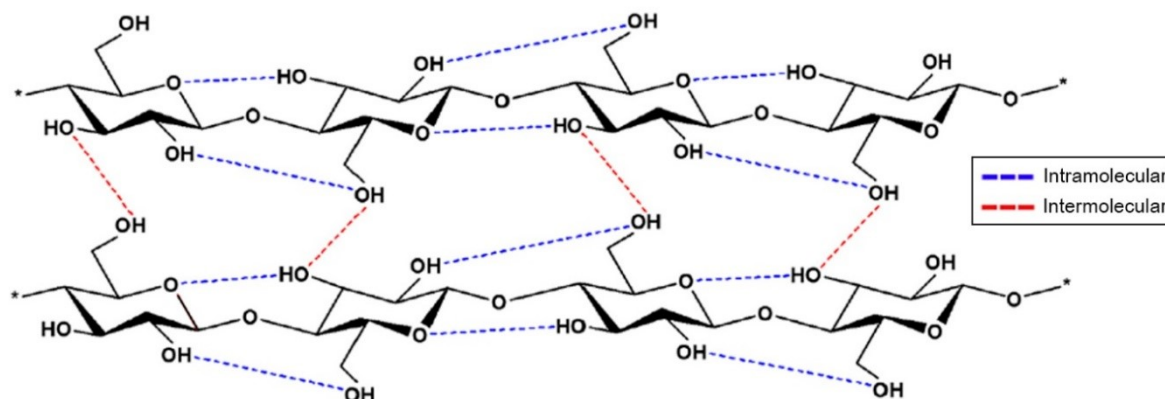
celulose vegetal, levou ao aumento do consumo de madeira como matéria-prima, causando desmatamento e questões ambientais globais (PARK; PARK; JUNG, 2003).

2.2.3 Celulose bacteriana (CB)

A celulose ($C_6H_{10}O_5$) é um polímero natural mais abundante na Terra com uma produção brasileira de 22,5 milhões de toneladas no ano de 2021 (IBÁ 2021), apresentando grande importância econômica. Sua estrutura é constituída por repetidas moléculas de β -D-glicopirranose unidas em cadeias longas, não ramificadas, por ligações glicosídicas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4) (BROWN JR., 1987; KAYRA; AYTEKIN, 2019; KLEMM et al., 2005; SANCHEZ, 2012). As moléculas de celulose também formam ligações de hidrogênio intra e intermoleculares através dos grupos hidroxilas, onde o primeiro tipo de interação é responsável pela rigidez da cadeia e o segundo pela formação da fibra vegetal que elevam a resistência mecânica e fazem com que a celulose seja insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos (BROWN JR., 1996; CHEN et al., 2015; DONINI et al., 2010; KAYRA; AYTEKIN, 2019; LINDMAN; KARLSTRÖM; STIGSSON, 2010; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

A formação da estrutura polimérica é iniciada quando duas moléculas de glicose se unem e formam a celobiose, que é a unidade estrutural de repetição da molécula de celulose (BROWN JR., 1996). Na Figura 1 é representado como as ligações intra e intermoleculares se dispõem na cadeia polimérica, bem como a sua estrutura altamente cristalina e a unidade de repetição (β -D-glicopirranose).

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura química com as ligações glicosídicas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4) e as ligações de hidrogênio intra e intermoleculares da celulose



Fonte: Adaptado de Phanthong et al. (2018).

A celulose é biodegradável, não tóxica e não alergênica, sendo o principal componente da parede celular das plantas, contendo impurezas como lignina, pectina e hemicelulose, e é normalmente obtida industrialmente a partir do processamento da madeira para a produção de pasta celulósica, nomeada de celulose vegetal (CV) (AMORIM et al., 2020b; DUCHEMIN; MATHEW; OKSMAN, 2009; GOMES, 2011; KLEMM et al., 2005). Porém, em virtude da demanda crescente de produtos oriundos da celulose vegetal, seja para fins industriais ou biomédicos como a celulose microcristalina, preparada por hidrólise ácida a partir da polpa da madeira altamente purificada para utilização na fabricação de fármacos, têm levado a problemas relacionados ao desmatamento e criando questões ambientais globais como o desequilíbrio climático, poluição do ar, erosão dos solos e degradação dos mananciais em função dos efluentes tóxicos, esgotamento de água, grande consumo de energia, perda de biodiversidade da flora e fauna e entre outros impactos, que levam à necessidade da substituição da produção deste polímero por uma alternativa mais sustentável para reduzir o impacto ambiental (NGUYEN, 2006; PARK; PARK; JUNG, 2003; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; TYAGI; SURESH, 2016).

Por esses motivos, um grande interesse foi criado em todo o mundo na produção de celulose usando fontes alternativas, para reduzir ao mínimo o impacto ambiental, portanto, mesmo as plantas sendo as maiores fontes de celulose, vários tipos de micro-organismos como algas, fungos e bactérias são capazes de produzir celulose como fonte alternativa e mais responsável, afim de evitar o desmatamento, essa classe de celulose é denominada biocelulose, celulose bacteriana, celulose

microbiana ou nanocelulose bacteriana (CB), recebe esse nome em virtude de ter sido encontrada pela primeira vez em um cultivo de bactéria (DAYAL et al., 2013; KLEMM et al., 2006, 2011; MONA et al., 2019; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

A celulose vegetal e a celulose bacteriana apresentam a mesma fórmula molecular, porém, apresentam algumas propriedades mecânicas, físicas e químicas distintas (PORTELA et al., 2019; SULAEVA et al., 2015; TSOUKO et al., 2015). Dentre as propriedades superiores da CB, ela apresenta uma estrutura de fibras nanométricas contra o micrométrico da celulose vegetal, que lhe conferem melhores propriedades como alta resistência mecânica, alta porosidade, elevado grau de polimerização (2000-8000), alta pureza, alta capacidade de retenção de água (> 90%), boa biocompatibilidade, carácter não tóxico e nanoestrutura altamente cristalina (60-90%), que possibilita a sua utilização industrial em uma ampla área de aplicações e em especial na área da saúde como curativo (DONINI et al., 2010; KLEMM et al., 2005; PORTELA et al., 2019; UZYOL; SAÇAN, 2017).

Comparando a obtenção da CV com a CB, os processos de preparação do meio de cultura, separação e purificação das células para a CB são mais simples em função de não conter compostos indesejados e não provocar reações que gerem produtos nocivos ao meio ambiente, tornando o custo do processo mais baixo, já que esse tipo de celulose é pura (AMORIM et al., 2020b; PORTELA et al., 2019; TYAGI; SURESH, 2016).

Além disso, as membranas de CB possuem nanofibrilas de celulose (nanocelulose) e por isso representam uma importante classe de nanomateriais e com os avanços nas pesquisas ela vêm se mostrando como um material multifuncional extremamente útil para diversas aplicações e com grande ascendência no mercado. O mercado global de CB deverá atingir 639,8 milhões de dólares até 2026, impulsionado principalmente pelas intensivas pesquisas e descobertas da comunidade científica (MARKET RESEARCH, 2021).

Apesar da CB ser considerada uma alternativa ideal para substituir a celulose vegetal e ter um mercado potencial, o seu alto custo e o tempo da produção ainda são fatores limitantes em comparação com outros produtos orgânicos comerciais, por esse motivo que muitos pesquisadores tem concentrado os trabalhos em otimizar a produção em termos de gerar uma maior quantidade de celulose em um menor tempo e viável economicamente para ser possível introduzir no mercado a CB com uma produção e custo competitivo para que todo o seu potencial possa ser

extrapolado para as plantas industriais e explorado para diferentes aplicações (CACICEDO et al., 2016; HUTCHENS et al., 2007; REVIN et al., 2018; SANI; DAHMAN, 2010; SHARMA; BHARDWAJ, 2019b; UL-ISLAM et al., 2017).

Nesse sentido de viabilizar a produção da CB, a área médica é um dos principais foco dos pesquisadores, pois a celulose bacteriana e os demais tratamentos para feridas ainda apresentam um valor alto e o “custo do fator de cura” é uma das grandes preocupações dos pesquisadores. Conseguir fazer a ponte entre o número de pacientes e os tratamento de feridas disponíveis é o objetivo final da maioria dos pesquisadores para tratar milhões de pacientes afetados. Isso motivou os pesquisadores a desenvolver diferentes soluções de tratamento de feridas com boa relação custo-benefício nos últimos anos (CHOUHAN et al., 2019).

Por esses motivos, optou-se pela celulose produzida por meio de micro-organismos (CB), a qual é sintetizada em laboratório, por ser 100% pura não há a necessidade dos mesmos processos de purificação como a celulose vegetal, tornando o processo mais simples, além de ser auto-sustentável.

2.2.3.1 Produção da Celulose Bacteriana (CB)

A síntese de CB por *Komagataeibacter xylinus*, anteriormente denominada *Acetobacter xylinum*, foi descrita pela primeira vez em 1886 por Brown, quando este observou a formação de uma fina membrana gelatinosa na interface líquido-ar durante a fermentação do vinagre (BROWN, 1886; CACICEDO et al., 2016; DONINI et al., 2010). Porém, estudos intensivos sobre a síntese de 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 et al., 2005; BROWN JR., 1989; TURECK, 2017).

Para sintetizar CB alguns fatores devem ser considerados, tais como o micro-organismos produtor, as condições nutricionais e de cultivo (CHAWLA et al., 2009; TURECK, 2017).

2.2.3.1.1 Micro-organismos produtores de celulose bacteriana

Vários micro-organismos são capazes de sintetizar a CB, como as bactérias das espécies *Komagataeibacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina* e *Salmonella*, dentre estas, as bactérias do gênero *Komagataeibacter* têm sido amplamente citadas em estudos de produção e consideradas modelo para fins industriais (CHAWLA et al., 2009; RANGASWAMY; VANITHA; HUNGUND, 2015). Esse gênero recebeu esse nome em agradecimento ao microbiologista japonês, Prof. Kazuo Komagata, por sua contribuição sobre as bactérias do ácido acético (RYNGAJŁŁO et al., 2019).

Os estudos referentes a obtenção de CB iniciaram utilizando a bactéria *Komagataeibacter xylinus* em 1947 e até hoje no meio científico diversos pesquisadores têm estudado incansavelmente estratégias de melhorar a produção da CB, envolvendo variados tipos de substratos para o meio de cultivo, condição de cultivo e tipo de micro-organismos. Muitos trabalhos vêm relatando outras espécies do gênero *Komagataeibacter*, como a *K. hansenii*, *K. europaeus*, *K. oboediens* e *K. intermedius*, além do desenvolvimento, isolamento e modificações de diferentes espécies visando uma melhor produção de celulose com o intuito de extrapolá-la para o processo em plantas industriais (BLANCO et al., 2018; DONINI et al., 2010; FARAG et al., 2016; JACEK; RYNGAJŁŁO; BIELECKI, 2019; PARK; PARK; JUNG, 2003; STUMPF et al., 2013; ULLAH et al., 2016; YAMADA; HOSHINO; ISHIKAWA, 1997).

As espécies do gênero *Komagataeibacter* como a *K. xylinus* e *K. hansenii* são os produtores mais eficientes de celulose em comparação com outras cepas (RANGASWAMY; VANITHA; HUNGUND, 2015). *K. hansenii* é uma bactéria gram-negativa, estritamente aeróbica, não-patogênica, comumente encontradas na superfície de frutas e vegetais em decomposição, no vinagre e em bebidas alcoólicas (ASHTAVINAYAK; ELIZABETH, 2016; CACICEDO et al., 2016; DONINI et al., 2010; KLEMM et al., 2001; LYNCH et al., 2019; TURECK, 2017). Essa bactéria destaca-se entre os micro-organismos que possuem maior potencial de produção de celulose, sendo que uma única célula pode converter até 108 moléculas de glicose por hora em celulose (BARUD, 2010; BROWN JR., 2004; PECORARO et al., 2008; RECOUVREUX, 2008). A espécie *K. 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, com faixa de temperatura para crescimento 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 (TURECK, 2017). *K. hansenii* produz celulose extracelular livre de lignina ou hemicelulose, tornando-a uma excelente fonte de celulose pura (CASTRO et al., 2011; MOHITE; PATIL, 2014; MONA et al., 2019; PORTELA et al., 2019; TURECK, 2017). As bactérias desse gênero convertem etanol a ácido acético, logo, apresentam uma alta capacidade de tolerância a substâncias ácidas e são capazes de converter várias fontes de carbono e nitrogênio em celulose, mas o seu mecanismo de síntese ainda não foi completamente elucidado, porém, acredita-se que seja semelhante ao da *K. xylinus*, que começa sempre com o precursor de UDP-glicose e termina formando uma cadeia polissacarídica (BROWN JR., 2004; CACICEDO et al., 2016; IGUCHI et al., 1988; KESHK, 2014; RANGASWAMY; VANITHA; HUNGUND, 2015).

2.2.3.1.2 Metabolismo

A síntese da celulose pelas bactérias compreende um processo composto de várias etapas, que envolve muitas enzimas individuais e complexos de proteínas catalíticas e regulatórias. De forma geral, o processo ocorre em três etapas principais, sendo a primeira a formação das cadeias de glicose β -(1 $\rightarrow$ 4) ligadas, a segunda etapa pela secreção extracelular das cadeias lineares e a última etapa a organização e cristalização das cadeias de glucanas, por meio de ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals dispostas hierarquicamente em tiras (BIELECKI et al., 2005; DONINI et al., 2010; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991):

A bactéria *K. xylinus* tem a capacidade de utilizar uma variedade de substratos carbônicos para a biossíntese de celulose, porém, dependendo da fonte de carbono utilizada o micro-organismo segue vias metabólicas distintas para a produção da CB (JOZALA et al., 2016). Entretanto, a via bioquímica mais compreendida envolve a conversão da glicose como substrato exógeno à celulose (RECOUVREUX, 2008).

K. xylinus, opera no ciclo das pentoses-fosfato (hexoses) e no ciclo de Krebs juntamente com a gliconeogênese. O ciclo das pentoses-fosfato envolve a oxidação de carboidratos em etanol, o qual é metabolizado pelas bactérias formando ácidos

orgânicos (glucônico, láctico, acético), e o ciclo de Krebs envolve a oxidação desses ácidos orgânicos (DONINI et al., 2010; LEE et al., 2014; MONA et al., 2019; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; SOUZA, 2014). Acontece esse ciclo, porque a *K. xylinus* não é capaz de metabolizar anaerobicamente a glicose em virtude de não possuir fosfofrutose-quinase-1, necessária para a glicólise (LEE et al., 2014; MONA et al., 2019; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

A síntese de celulose por *K. xylinus* com glicose envolve quatro etapas enzimáticas (glicoquinase, fosfoglicomutase, UDPG-pirofosforilase e celulose sintase) (DONINI et al., 2010; LEE et al., 2014; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; YOSHINAGA; TONOUCI; WATANABE, 1997):

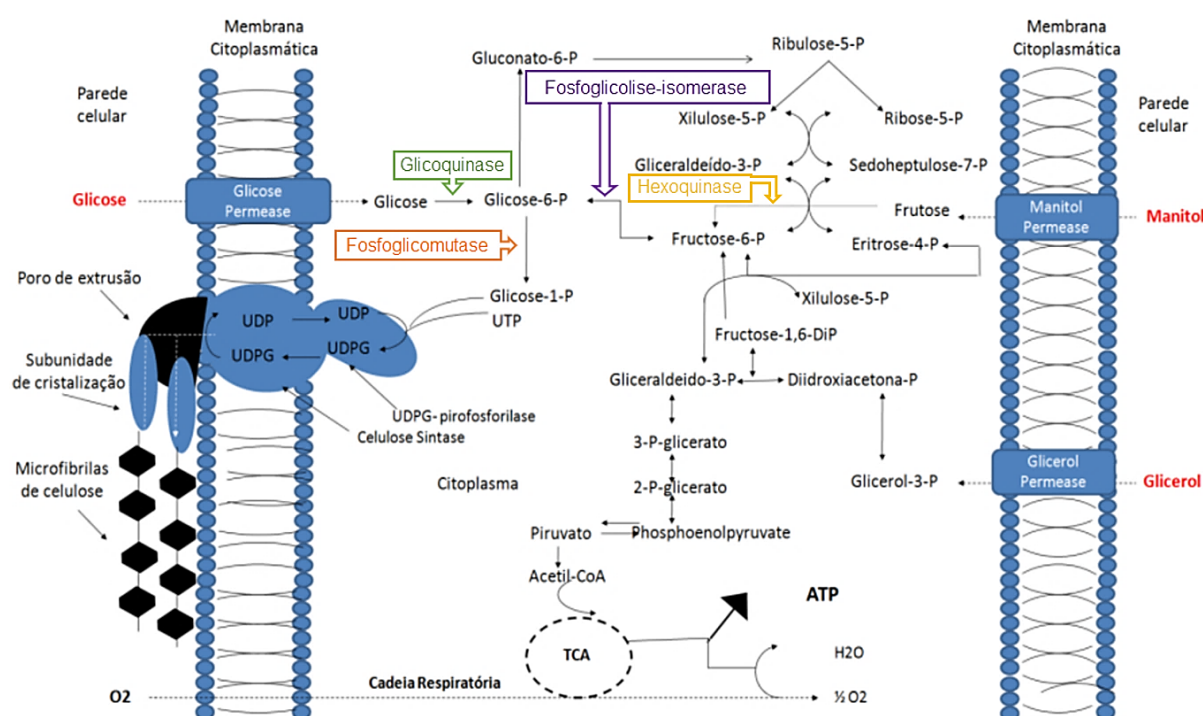
- 1º. Inicia-se no transporte do meio externo para o interior do citoplasma da bactéria ou de fontes internas, onde ocorre a fosforilação de glicose para glicose-6-fosfato pela enzima Glicoquinase;
- 2º. A Fosfoglicomutase que catalisa a reação de isomerização da glicose-6-fosfato para glicose-1-fosfato;
- 3º. A síntese de UDP-glicose (UDPG) pela UDPG-pirofosforilase (glicose-1-fosfato-uridililtransferase);
- 4º. E por último a Celulose Sintase (CS) que produz a celulose a partir de UDP-glicose.

Durante a síntese da CB as bactérias convertem os componentes dos meios em celulose e/ ou utilizam para síntese de metabolitos, como por exemplo a produção de ácidos orgânicos (glucônico, acético ou láctico) como parte dos subprodutos metabólicos, já que se trata de uma bactéria do ácido acético (CHAGAS, 2018; CHEN et al., 2019a; HUTCHENS et al., 2007; RAGHUNATHAN, 2013). No caso da glicose como fonte de carbono, a bactéria oxida a glicose diretamente na forma de ácido glucônico (gluconato), o qual se acumula no sistema e como resultado ocorre a diminuição do pH da cultura e da produção da celulose, a explicação para isso é que a glicose é consumida mais rapidamente se comparada a outras fontes de carbono (CHEN et al., 2019a; GULLO et al., 2017, 2019; HUTCHENS et al., 2007; MASAOKA; OHE; SAKOTA, 1993; SCHRAMM; GROMET; HESTRIN, 1957).

Quando a produção da CB acontece utilizando frutose como fonte de carbono, a sua biossíntese depende de duas vias, a via das pentoses (a glicólise é inviabilizada pela ausência de fosfofrutoquinase) e o ciclo de Krebs. Dessa forma, a frutose

é diretamente metabolizada e transformada em frutose-6-fosfato e, posteriormente, é isomerizada para glicose-6-fosfato pela enzima fosfoglicose isomerase e a partir desse ponto a via metabólica para produção de CB segue o mesmo caminho da síntese do biopolímero utilizando de glicose, conforme mostrado na Figura 2 (CHAGAS, 2018; DONINI et al., 2010). Na produção da CB a partir de dissacarídeos, (sacarose, lactose, maltose e ribose), a biossíntese do biomaterial inicia-se no periplasma da célula com a hidrólise dos dissacarídeos em monossacarídeos, como frutose e glicose (LEE et al., 2014). Não se têm relato na literatura sobre a via metabólica da lactose e o amido solúvel para a bactéria *Komagataeibacter*, porém, vários trabalhos relatam que esses substratos são uma fonte de carbono interessante para a produção de CB (ABDELRAOF; HASANIN; EL-SAIED, 2019; BÄCKDAHL et al., 2008; GRANDE et al., 2009; HESSLER; KLEMM, 2009; TURECK, 2017; YANG et al., 2014).

Figura 2 – Modelo simplificado da rota metabólica para a biossíntese da CB a partir de glicose, manitol ou glicerol por *K. hansenii* ATCC 23769



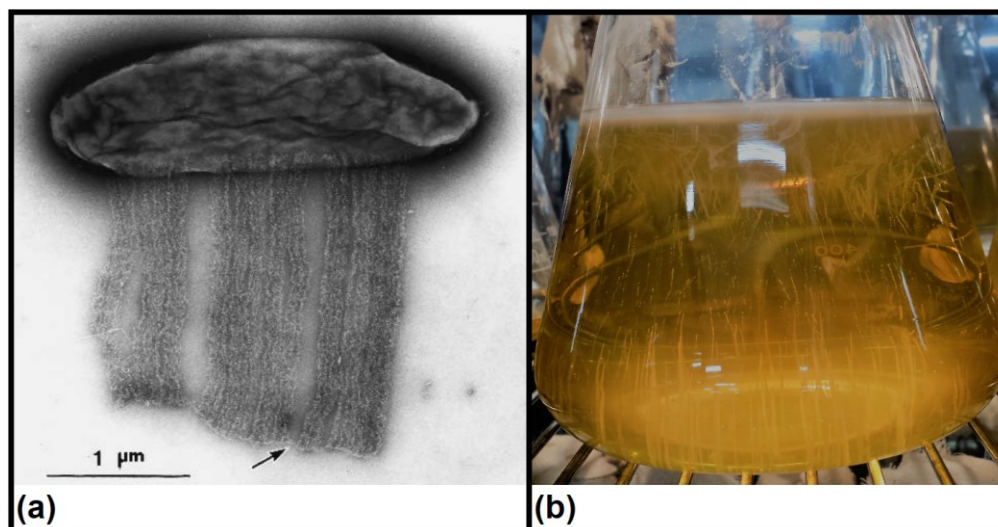
Fonte: Adaptado de Souza (2014).

Pela via endógena (gliconeogênese) a síntese começa a partir da oxidação do etanol em oxaloacetato e posteriormente em piruvato pela ação da enzima carboxilase do piruvato, por fim, é metabolizado no ciclo do ácido tricarboxílico ou ciclo do

ácido cítrico para gerar ATP para crescimento celular bacteriano e síntese de celulose. A transformação do piruvato em fosfoenolpiruvato é produzida pela ação da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase, consumindo cerca de 10% da adenosina trifosfato (ATP). Portanto, a reação de síntese de CB acontece a partir da energia do seu metabolismo aeróbico e constitui um processo cansativo para a célula (BIELECKI et al., 2005; DONINI et al., 2010; FRAJÁCOMO, 2017; LEE et al., 2014; SOUZA, 2014).

Neste contexto, após a polimerização de monômeros de glicose em cadeias β -(1 $\rightarrow$ 4) glucanas, ocorre a secreção extracelular das cadeias lineares e organização e cristalização das cadeias glucanas dispostas em fitas. Logo, 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, por meio dos complexos terminais que são associados com os poros superficiais das células, ou seja, a CB é extrudida através dos poros das células bacterianas na forma de fitas (GRANDE et al., 2009). Estas, posteriormente agrupam-se com outras 36 iguais a elas, forma-se então uma fibrila elementar com um diâmetro de 3,5 nm (nanofibrilas) (CACICEDO et al., 2016). Então elas se unem por meio de ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals formando fitas com uma largura de 40 a 60 nm e espessura de 3 a 8 nm. As fitas rolam para cima para formar as fibras, que ficam emaranhadas em uma película gelatinosa tridimensional contendo cerca de 1-2% de celulose e 98-99% de água (w/w) (PECORARO et al., 2008; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991). Na Figura 3 é ilustrado a bactéria do gênero *Komagataeibacter* secretando as fibrilas de CB.

Figura 3 – Bactéria *Komagataeibacter* secretando fibrilas de celulose em fitas para formação da membrana: (a) micrografia eletrônica de transmissão - MET (HIRAI; TSUJI; HORII, 2002) e (b) imagem durante a síntese



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Durante o cultivo estático a membrana formada na interface ar/líquido permite as bactérias aeróbicas moverem-se para a superfície possibilitando obter oxigênio com maior facilidade para seu crescimento, conforme visualizado na Figura 3 (CACICEDO et al., 2016; DONINI et al., 2010). Além disso, esse mecanismo de flotação previne a desidratação do substrato (devido ao caráter higroscópico da CB), serve como proteção contra a luz ultravioleta e atua como uma barreira contra o crescimento de outros micro-organismos (DONINI et al., 2010; PORTELA et al., 2019; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; SOUZA, 2014). 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 (TURECK, 2017). Enquanto o sistema for mantido imóvel, a membrana se mantém suspensa na parede interna do frasco por coesão (TURECK, 2017). As bactérias contidas na membrana podem ser facilmente removidas, pela imersão em soluções alcalinas diluídas em água, seguido pela lavagem exaustiva com água (BARUD, 2010; IGUCHI; YAMANAKA; BUDHIONO, 2000).

2.2.3.1.3 Condições Nutricionais

O método para a produção de celulose bacteriana é equivalente ao modo convencional para a cultura de manutenção da bactéria. Ou seja, micro-organismos

são inoculados em meios nutrientes convencionais que possuem a função de simular o seu *habitat* natural, portanto, devem conter fontes de carbono, nitrogênio, sais inorgânicos, e, se necessário, outros nutrientes orgânicos tais como aminoácidos, vitaminas e outros necessários para o crescimento microbiano (IGUCHI et al., 1988). Como meio padrão para o cultivo da CB, têm-se o meio Hestrin-Schramm (HS), porém, esse meio apresenta um custo elevado em virtude da suplementação de glicose ou manitol, extrato de levedura e peptona como substratos de maior custos e, portanto, torna-se inadequado para ser usado na produção da CB industrialmente (ABDELRAOF; HASANIN; EL-SAIED, 2019; BLANCO et al., 2018; HESTRIN; SCHRAMM, 1954; SANI; DAHMAN, 2010; SHODA; SUGANO, 2005). Por esse motivo, diversos trabalhos têm sido relatado na literatura para produzir CB com outros substratos visando diminuir o custo de produção e aumentar a quantidade de celulose gerada pela bactéria. Tais estudos são de elevada importância para permitir a viabilidade da produção da CB em uma escala significativa para transformar o seu uso industrial viável nos diferentes campos do conhecimento de aplicação desse material, uma vez que o custo de produção associado ao substrato representa até 65% do custo total do cultivo microbiano (ABDELRAOF; HASANIN; EL-SAIED, 2019; COSTA et al., 2017; HUTCHENS et al., 2007; JOZALA et al., 2015; TSOUKO et al., 2015; VELÁSQUEZ-RIÑO; BOJACÁ, 2017; ZHONG et al., 2013). Logo, o meio de cultura é o fator mais importante para o custo total de produção da CB, em especial os nutrientes carbônicos (JOZALA et al., 2016; ZHONG et al., 2013).

Nesse sentido, as bactérias acéticas do gênero *Komagataeibacter* produzem CB utilizando a glicose como fonte tradicional de carbono, porém, esse substrato pode ser substituído por fontes alternativas como etanol, n-butano, manitol, glicerol, lactato, frutose, sacarose, maltose, xilose, melaços, entre outros, tendo em vista que não hidrolisam o amido nem a lactose e são quimiorganotróficas (JOZALA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2010; RUKA; SIMON; DEAN, 2012; SOUZA, 2014).

O nitrogênio por sua vez é um componente principal, muito importante no metabolismo celular, e compreende entre 8 e 14% da massa celular seca de bactérias, além de fornecer aminoácidos, vitaminas e sais minerais para o micro-organismo (CAMPANO et al., 2016; CHAWLA et al., 2009). Como fontes de nitrogênio destacam-se sais de amônio, sulfato de amônio, cloreto de amônio, fosfato de amônio, nitratos, ureia, peptona, extrato de levedura ou semelhantes (IGUCHI et al., 1988). O extrato de levedura e a peptona são os componentes básicos para o meio HS e são

as fontes de melhor assimilação no metabolismo da *Komagataeibacter* (CAMPANO et al., 2016).

Os sais inorgânicos como fosfatos, sais de magnésio, sais de cálcio, sais de ferro, sais de manganês, podem ser adicionados. Como nutrientes orgânicos se tem os aminoácidos, vitaminas, ácidos graxos, ácidos nucléicos, extratos de leveduras, e proteína de soja hidrolisada (IGUCHI et al., 1988).

Outro ponto para se considerar na escolha do substrato para fornecer os nutrientes para a bactéria, é se esses substratos são bem assimilados por determinada cepa a fim de conseguir converter o máximo de celulose e o mínimo de produtos secundários do metabolismo, como os ácidos orgânicos, que diminuem o pH do meio de cultivo durante a produção da CB e reduzem o rendimento da celulose (HUTCHENS et al., 2007; ULLAH et al., 2016). E por fim, a otimização da síntese de CB para aplicações industriais requer primeiro a produção em pequena escala com protocolos aprimorados para conseguir atingir uma quantidade de celulose superior (UL-ISLAM et al., 2017).

Logo diversas fontes de carbono (monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos) e nitrogênio (orgânico e inorgânico) foram avaliados para a produção da CB por *K. hansenii* (ATCC 23769) na literatura e são apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Produção de celulose bacterina a partir de *K. hansenii* (ATCC 23769) utilizando diferentes fontes nutricionais em cultivo estático

Fonte de carbono	Suplementação	pH	Temperatura	Dias de cultivo	Produção (g/L)	Literatura
Extrato de açúcares da madeira extraídos com água quente	-	8,0	28	10	0,15	Kiziltas et al (2015)
Extrato de algaroba	Extrato de levedura	-	30	5	1,4	Nascimento et al (2014)
Glicose Sacarose Frutose	Extrato de levedura Peptona de caseína	5,0	30	7	0,9	Lima et al (2017)
Líquido de Sisal	Extrato de levedura	5,0	30	7	2,2	Lima et al (2017)
Líquido de sisal	Extrato de levedura	6,0	28	7	2,1	Gottschalk et al (2014)
Glicose	Extrato de levedura Sulfato de amônia Fosfato de Sódio Ácido Cítrico	6,0	28	7	0,86	Gottschalk et al (2013)
Melaço cinta preta	-	6,0	30	9	2,9	Khattak et al (2015)
Melaço da cervejaria	-	6,0	30	9	1,74	Khattak et al (2015)
Lactose	Prodex Lac®	-	30	12	5,6	Tureck (2017)
-	Suco de cenoura	-	30	14	1,35	Gunduz e Asik (2018)
Manitol Etanol	Extrato de levedura	7,0	26,3	12	2,85	Farrag et al (2019)

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Entre os estudos mostrados no Quadro 1, observou-se que manitol/ lactose/ melaço cinto preta e extrato de levedura/ Prodex Lac® foram as melhores fontes de carbono e nitrogênio para a produção da CB.

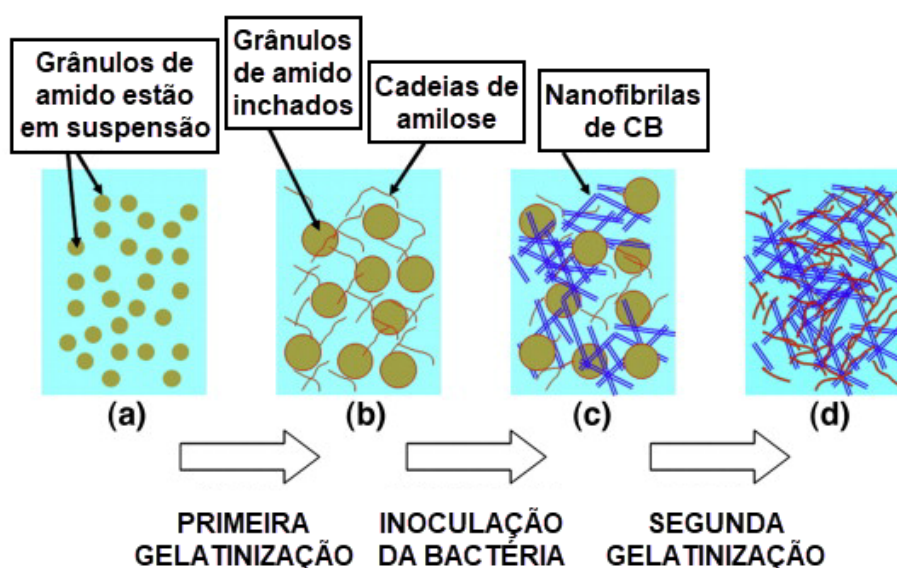
Quando se analisa essas fontes de carbono, os substratos de grau analítico que se destacaram para a produção da CB foram o manitol e a lactose. A melhora na produção da CB a partir do manitol é em função do fluxo metabólico para a produção do ácido glucônico como subproduto nesta via ser baixo comparado com a fonte tradicional (glicose), esse fato é evidenciado na resposta negativa na produção da CB a partir da glicose mostrada no Quadro 1 (GULLO et al., 2019; JONAS; FARAH, 1998; OIKAWA; OHTORI; AMEYAMA, 1995; SOUZA, 2014). Acrescenta-se também que o manitol é recomendado pela ATCC® como um dos substratos para ser usado no meio de cultura de manutenção da *K. hansenii*. Dentre todos os estudos encontrados na literatura utilizando a *K. hansenii* (ATCC 23769), o trabalho de Turek (2017) foi o qual apresentou a maior produção de CB. A autora explicou que a lactose juntamente com a fonte de nitrogênio (Prodex Lac®) tiveram efeitos sinérgicos, demonstrando que a combinação desses dois substratos tem efeitos positivo na produção da CB, porém, ainda não está claro qual o papel deles no metabolismo da *K. hansenii*. Já a explicação do destaque da utilização do extrato de levedura na produção da CB é em função dele ser um dos substratos de melhor assimilação no metabolismo da *Komagataeibacter* (CAMPANO et al., 2016).

Portanto, nesse trabalho o manitol foi avaliado como fonte de carbono “padrão” e comparado com outras fontes alternativas, bem como o seu uso associado com outros açúcares, investigando, portanto, o efeito sinérgico do meio de cultura com mais de uma fonte de carbono, além de ter poucos relatos na literatura com esse foco. As fontes alternativas estudadas foram frutose, sacarose, lactose e amido solúvel, os quais podem ser reaproveitados de resíduos da agroindústria, além da fonte tradicional (glicose) e do etanol. Como fonte de nitrogênio foi avaliada a utilização da milhocina em função de ser um resíduo da maceração do milho e Prodex Lac® por ser um extrato de levedura bruto, podendo ambos serem vantajosos economicamente (FURLAN et al., 2000; MANERA et al., 2011; MICHALSKI et al., 2008; SCHOLZ, 2011).

Ressalta-se ainda, que o uso da lactose e do amido na produção da celulose não foi completamente elucidado, porém, alguns autores conseguiram atingir uma melhora na síntese desse biopolímero, por esse motivo, tornaram-se opções de in-

investigação para esse estudo. Uma hipótese relatada para o amido na literatura é que ele não é consumido pelas bactérias do gênero *Komagataeibacter* e leva a produção de um compósito, já que o amido passa por um processo de gelatinização quando o meio de cultura é esterilizado em autoclave a 121 °C, conforme exemplificado na Figura 4.

Figura 4 – Esquema do processo síntese da CB utilizando amido: a) Os grânulos de amido em suspensão no meio de cultura; (b) Após a autoclave, o amido é parcialmente gelatinizado, a lixiviação de amilose e os grânulos incham; (c) nanofibrilas de CB crescem na presença do amido parcialmente gelatinizado; (d) Após prensagem a quente em prensa hidráulica a 105 °C, o nanocompósito mostra redes interpenetrantes de amilose e celulose



Fonte: Adaptado de Grande et al. (2009).

Diante de todos os fatos mencionados, a busca pela otimização nas condições de cultivo se torna essencial, visto que esta influencia diretamente no custo e rendimento da CB (CHAWLA et al., 2009; HUTCHENS et al., 2007; IGUCHI et al., 1988; SHARMA; BHARDWAJ, 2019b; TSOUKO et al., 2015). A determinação de um meio ideal e de um conjunto apropriado de condições de crescimento que permita altos níveis de produção de celulose ajudaria na viabilidade da ampliação dessa tecnologia para uma situação industrial (RUKA; SIMON; DEAN, 2012). Porém, essa determinação deve ser cuidadosamente calculada antes da produção em massa de CB (RUKA; SIMON; DEAN, 2012). Assim, o estudo do uso de substratos alternativos, além dos tradicionais, visando encontrar novos substratos que contribuam para a redução do custo final desse polímero é de fundamental importância para obter

uma produção viável da CB industrialmente para a sua disseminação em diversas aplicações tecnológicas e inovadoras.

2.2.3.1.4 Condições de cultivo

A celulose bacteriana apresenta diferentes estratégias a respeito das suas condições de cultivo. As convencionalmente usadas incluem cultura estática ou cultura agitada, enquanto que os métodos de operação utilizados incluem processo em batelada, processo em batelada alimentada, processo repetido em batelada ou processo contínuo (CACICEDO et al., 2016; CAMPANO et al., 2016; WATANABE et al., 2003). A produção e as propriedades (em especial a porosidade) da CB podem ser afetadas por algumas condições de cultivo, como pH, temperatura, tempo de cultivo, cepa utilizada, tipo de cultivo (estático ou agitado), proporção de inóculo, densidade ótica do inóculo (D.O), volume de meio (relação área/volume), fonte nutricional e oxigênio dissolvido no meio de cultivo. É fundamental que todas essas condições sejam controladas para obter propriedades reprodutíveis do polímero (BASU; VADANAN; LIM, 2019; KLEMM et al., 2018; LEE et al., 2014; TANG et al., 2010).

A faixa de pH onde ocorre a produção da celulose é entre 4,5 e 7,5, enquanto em ambientes muito ácidos com pH menores que 3,5 a CB é inibida e o intervalo no qual o pH é ótimo para produção da CB acontece em 6,5 (JUNG et al., 2010; SON et al., 2001). Durante o cultivo da *K. hansenii* ocorre uma diminuição do pH do meio ocasionada pelas reações metabólicas, como por exemplo a produção de ácidos orgânicos (glucônico, acético ou láctico) durante o consumo dos nutrientes no meio, já que se trata de uma bactéria do ácido acético. Logo, uma alternativa para evitar grandes alterações do pH durante o cultivo bacteriano é utilizar meios tamponados para alcançar o maior rendimento possível, a exemplo dos meios HS (CHAWLA et al., 2009; RAGHUNATHAN, 2013).

Já a temperatura que favorece a produção da celulose é na faixa de 28 e 30 °C, com a produção ótima em 30 °C e valores acima de 35 °C reduzem a produção da CB (RANGASWAMY; VANITHA; HUNGUND, 2015; SON et al., 2001; VELÁSQUEZ-RIAÑO; BOJACÁ, 2017).

Tradicionalmente, a cultura é desenvolvida estaticamente em bandejas rasas, como placas de Petri ou microplacas, ou em recipientes como Erlenmeyer ou Duran, permanecendo cobertas por um período de 5 a 20 dias, até que uma membrana cu-

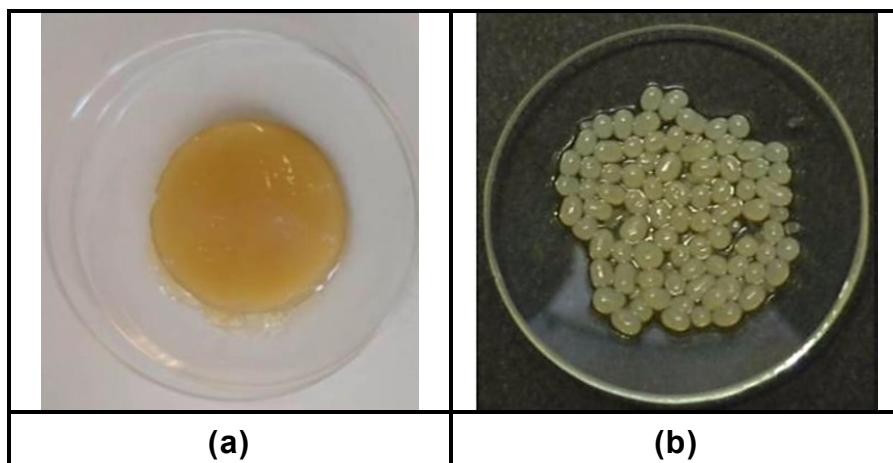
bra a superfície do meio de cultivo da bandeja, o aumento do tempo de crescimento aumenta a formação da membrana juntamente com as ligações de hidrogênio e C-H (LIN et al., 2013a; RECOUVREUX, 2008; SHEYKHNAZARI et al., 2011). O seu limite de crescimento acontece quando a membrana aprisiona todas as bactérias, as quais tornam-se inativas devido ao fornecimento insuficiente de oxigênio (IGUCHI; YAMANAKA; BUDHIONO, 2000; LEE et al., 2014).

A sua produção pode ser obtida em laboratório utilizando cultivos tanto em meios sólido ou líquido, como em condições estática ou agitada (DONINI et al., 2010; RUKA; SIMON; DEAN, 2012; YAMADA; HOSHINO; ISHIKAWA, 1997). Os cultivos estáticos, que são os tradicionais, simples, com menor custo e utilizados para produção de CB comercialmente, especialmente para a área médica em função das propriedades obtidas e do formato adequado e uniforme produzido apenas nesse tipo de processo, ou em cultivos dinâmicos (agitadores orbitais/eletromagnéticos ou biorreatores), que aceleram a produção (BRANDES et al., 2017; DONINI et al., 2010; JONAS; FARAH, 1998; PARK; JUNG; PARK, 2003; SHAH et al., 2013).

A escolha pelo tipo de cultivo irá refletir nas propriedades físicas, mecânicas e morfológicas de celulose obtida, portanto, a escolha ideal dependerá da aplicabilidade final desejada (CACICEDO et al., 2016; JOZALA et al., 2016). Na cultura estacionária, o resultado é acumulação de uma membrana gelatinosa e homogênea de celulose sobre a superfície do meio; enquanto na cultura agitada, a celulose sintetizada surge sob a forma de suspensões ou esferas fibrosas irregulares, conforme mostrado na Figura 5 (BRANDES et al., 2017; HESTRIN; SCHRAMM, 1954; JONAS; FARAH, 1998). Entre as propriedades físicas obtidas na condição estática se tem uma membrana com estrutura mais cristalina e de alta qualidade, porém demanda um tempo maior de cultivo (SHARMA; BHARDWAJ, 2019b). O cultivo sob agitação ainda requer muitos estudos, pois mesmo diante de algumas vantagens, apresenta diversos problemas, como a instabilidade da estirpe, redução em algumas propriedades da CB (resistência mecânica, grau de polimerização, índice de cristalinidade e módulo de elasticidade), promove a mutação das cepas produtoras de celulose em mutantes não produtores em função das tensões de cisalhamento provocadas pela agitação, o comportamento não-newtoniano durante a mistura da celulose bacteriana, ou fornecimento inadequado de oxigênio (BRANDES et al., 2017; CZAJA; ROMANOVICZ; BROWN, 2004; DUDMAN, 1960; LEISINGER; WIEMKEN; ETTLINGER, 1966; SCHRAMM; HESTRIN, 1954).

Logo, a CB sintetizada em cultivo estático apresenta melhores propriedades comparada ao cultivo agitado para os quesitos necessários para a área médica. Todavia, os estudos de produção ainda precisam ser aprimorados para alcançar maiores rendimentos, além de reduzir os custos.

Figura 5 – Membranas de CB obtidas sob condição estática (a) e agitada (b)



Fonte: Adaptada de Gullo et al (2019).

2.2.3.1.5 Purificação da CB

Comparando a purificação da celulose vegetal com a celulose bacteriana, na fase final da produção comercial da celulose oriunda das plantas ela deve ser separada de outros compostos como lignina, pectina e hemiceluloses, os quais são difíceis de serem removidos e que restringem o seu uso, necessitando portanto, de uma etapa de purificação para a sua eliminação a fim de se obter a celulose pura (UL-ISLAM et al., 2017). Esse processo envolve a utilização intensiva de energia, água e produtos químicos que geram reações que são excessivamente poluentes, produzindo compostos como os organoclorados, além de serem processos complexos e custosos, pois são usados diferentes tipos de processos físicos, mecânicos e químicos dependendo do tipo, do tamanho ou grau de pureza desejados, além de danificarem as propriedades do polímero (AMORIM et al., 2020b; CACICEDO et al., 2016; FONTANA et al., 1990; SANTOS et al., 2001; TYAGI; SURESH, 2016).

Já a purificação da CB é mais simples em função de não conter compostos indesejados, tornando o custo do processo mais baixo, já que esse tipo de celulose é pura, sendo necessário somente retirar impurezas como células, componentes do

meio de cultivo, proteínas e endotoxinas que podem causar reações pirogênicas nos produtos de grau farmacêutico para que então a “celulose pura” seja obtida e o rendimento calculado (CACICEDO et al., 2016; CHAWLA et al., 2009; PORTELA et al., 2019; SOUZA, 2007; TYAGI; SURESH, 2016).

Diversos pesquisadores têm relatado diferentes processos de purificação da CB, tanto para aplicações gerais como para aplicações nas áreas alimentícias e biomédicas, os quais exigem uma purificação mais intensa, tornando-se fundamental que esse produto não contenha nenhum resquício bacteriano e impureza (SILVEIRA et al., 2019). Outra condição importante que o biomaterial precisa possuir é uma certa resistência, pois dependendo do método de purificação empregado poderá danificar as propriedades do biopolímero, deixando o quebradiço e perdendo a qualidade para posterior comercialização desse material (SANI; DAHMAN, 2010; SILVEIRA et al., 2019). Visando compreender melhor a influência das condições de purificação nas propriedades da CB, alguns pesquisadores estudaram a exposição da CB por diferentes tratamentos e relataram que o processo de purificação pode melhorar ou afetar as propriedades estruturais, térmicas, mecânicas e morfológicas da membrana dependendo da técnica empregada, uma vez que dependendo da concentração dos produtos químicos utilizados eles poderão provocar sua mercerização, com conversão de celulose I em celulose II (CHAWLA et al., 2009; COIMBRA, 2016; GEA et al., 2011; PECORARO et al., 2008; SANTOS et al., 2015; SILVEIRA et al., 2019; TANG et al., 2010; TURECK, 2017).

Dentre os métodos de purificação, o tratamento com álcali (0,1 M de hidróxido de sódio) é o mais eficiente dentre os relatados da literatura, conseguindo remover todas as impurezas da CB sem danificar o polímero, mantendo a boa qualidade do material e com características desejáveis em termos estruturais, térmicos e morfológicos, estando apto para uma ampla gama de aplicações industriais (CACICEDO et al., 2016; GATENHOLM; KLEMM, 2010; SILVEIRA et al., 2019; SULAEVA et al., 2015). E no que tange as aplicações para a área médica, essa solução de NaOH comparada com outras soluções alcalinas na mesma concentração (K_2CO_3 , Na_2CO_3 e KOH) resulta em uma membrana com porosidade menor, o que é de grande interesse para produtos para a área médica/farmacêutica, tornando portanto, esse método mais vantajoso para esses segmentos (TANG et al., 2010). Outra vantagem desse método é não causar impacto ambiental, pois demanda menos energia e o resíduo gerado na purificação pela solução de NaOH 0,1 M pode ser facilmente neu-

tralizado por uma reação de ácido-base e descartado sem grandes danos ao meio ambiente, diferente do processo de purificação da celulose vegetal que necessita de vários processos químicos e reagentes oxidantes (ALMEIDA et al., 2007; LOPES, 2019; SANI; DAHMAN, 2010; TYAGI; SURESH, 2016).

Essa metodologia consiste em um tratamento térmico e alcalino, onde após a produção da CB o material é lavado com água destilada e colocado em uma solução de NaOH 0,1 M em uma temperatura de 80 °C durante 1 h, em seguida a CB é lavada com água destilada, esse último procedimento é repetido até o pH da membrana se neutralizar e por último a CB é esterilizada (SILVEIRA et al., 2019).

2.2.3.1.6 Secagem

O método de secagem afeta as propriedades da CB. Entre os diferentes procedimentos utilizados para a desidratação desse polímero, têm-se (KLEMM et al., 2018):

- Secagem por ar e prensagem ocorre da temperatura ambiente até 200 °C. A secagem por ar resulta em uma perda da estrutura tridimensional para uma estrutura colapsada, com aparecimento de rugas intensas devido ao forte encolhimento, agregação de fibras, tornando a membrana mais quebradiça e com a porosidade reduzida em função da tensão superficial e interfacial da evaporação da água, respectivamente, enquanto na secagem por prensagem são observadas as mesmas características finais com exceção do enrugamento;
- Liofilização: é um procedimento suave e a secagem ocorre por sublimação sob temperatura e pressão específicas, que mantêm a estrutura original das nanofibras e não deixa a membrana quebradiça, onde a água é substituída por ar e forma os aerogéis;
- Secagem por pontos críticos: também é um método suave de secagem que mantêm a estrutura original do polímero e não deixa a membrana quebradiça, onde a secagem total ocorre pela troca gradual de solventes (água → acetona ou etanol), resultando em um organogel.

Entre as técnicas de secagem mais utilizadas para a área médica está o método de secagem por liofilização em função de manter a estrutura porosa, o proce-

dimento de congelamento não causa nenhum dano para a CB e permite uma taxa de reidratação de até 70% do teor original de água, enquanto que para a secagem em estufa a taxa é de até 6% (KLEMM et al., 2005, 2018). Tang e colaboradores (2010) investigaram o efeito das secagens em estufa a 80 °C e por liofilização nas propriedades de porosidade da CB e descobriram que as membranas liofilizadas apresentaram porosidade muito maior e mais uniforme (92%) do que as secas ao ar quente (65%). Essa diferença de porosidade ocasionada pelos métodos de secagem acontece em materiais com alto teor de água que quando são expostos em temperaturas elevadas resultam em poros colapsados (KARATHANOS; KANELLOPOULOS; BELESSIOTIS, 1996). Além disso, é uma técnica simples e de baixo custo (SHARMA; BHARDWAJ, 2019b).

2.2.3.2 Propriedades da celulose bacteriana e aplicações

A CB é uma membrana flexível, altamente cristalina e pura, semitransparente, de cor amarelada, composta de polissacarídeos, sintetizada por bactérias do ácido acético, sendo biodegradável, biocompatível, não-tóxica, apirogênica e estéril (PANERARI et al., 2008; PORTELA et al., 2019).

As fibras da CB possuem um diâmetro de 20–100 nm e fibrilas com 1,5 nm de largura, logo, apresentam uma grande área superficial por unidade de massa (FU; ZHANG; YANG, 2013; MOHITE; PATIL, 2014; PORTELA et al., 2019). Acrescenta-se ainda, que as nano e microfibrilas combinadas com sua natureza altamente hidrofílica, porosa e com grande área superficial, absorvem entre 60–700 vezes a água em relação a sua massa seca, enquanto mantém um alto grau de conformabilidade (CHANG; CHEN, 2016; CZAJA et al., 2007; FU; ZHANG; YANG, 2013; PORTELA et al., 2019).

Uma possível explicação para esse alto nível de hidrofiliidade refere-se ao fato de que a montagem das fitas de celulose ocorre extracelularmente durante síntese no meio líquido e numerosas micelas são então formadas capturando grandes quantidades de líquido (PORTELA et al., 2019). Além disso, a combinação do alto teor de água e alta cristalinidade resultam na boa estabilidade térmica da CB, essa característica possibilita a sua esterilização por um processo de aquecimento e pressão (autoclave), tornando a esterilidade simples e barata, pois poucos polímeros têm essa vantagem de poderem ser aquecidos acima de 100 °C sem alterar suas

propriedades biofísicas (CACICEDO et al., 2016; EL-WAKIL et al., 2019; RANI; RASTOGI; APPAIAH, 2011).

A CB apresenta estrutura tridimensional e é estabilizada por meio de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, formando uma membrana espessa e gelatinosa caracterizada por uma alta resistência mecânica combinada com uma alta maleabilidade e elasticidade, resultando em um biomaterial de fácil manuseio, além de não fornecer nenhum risco para a saúde, enquanto a maioria dos polímeros sintéticos apresentam riscos significativos para a saúde, como irritação da pele e doenças respiratórias (CZAJA et al., 2007; PORTELA et al., 2019).

Apesar dessas excelentes propriedades, essas características da CB podem ser afetadas por diversos fatores como as condições de cultivo (tempo, temperatura, pH, tipo de cultivo), o micro-organismo, os meios de cultura empregados e o estado hidratado/seco (PORTELA et al., 2019; SULAEVA et al., 2015; TSOUKO et al., 2015).

Acredita-se que a CB é um dos biomateriais mais prósperos para a indústria, pois é livre de impurezas e a sua produção pode ser realizada durante todo o ano (DONINI et al., 2010). Entre as diversas aplicações, a CB vem sendo empregada em diversas inovações, desde biológicas até as mais tecnológicas, como na indústria têxtil (COSTA et al., 2019), mineração (DONINI et al., 2010), tratamento de efluentes (BRANDES et al., 2018; GALÁRRAGA et al., 2020; HUANG et al., 2014; RICACZESKI, 2017), indústria de papel (BASTA; EL-SAIED, 2009), indústria alimentícia (LIN; CHEN; CHEN, 2011; QIU; NETRAVALI, 2014; YORDSHAHI et al., 2020), dispositivos eletricamente condutores (PINEDA; MESA; RIASCOS, 2012), materiais biomédicos (ABEER; AMIN; MARTIN, 2014; ÁVILA et al., 2014; BACAKOVA et al., 2019; BARUD et al., 2016; GATENHOLM; KLEMM, 2010; NAPAVIDICHAYANUN et al., 2018; RAMBO et al., 2007; TANG et al., 2017), entre outras.

Uma das áreas de maior desenvolvimento nos últimos anos e que utiliza a CB é a área biomédica, com exemplos representativos na engenharia de tecidos como um biomaterial natural, onde é utilizada como enxertos vasculares, cartilagem, córnea, menisco artificiais, vasos sanguíneos, pele artificial, regeneração neural, regeneração tecidual e curativos de CB puros como as marcas brasileiras Nexfill®, Membracel® e Bionext® (CAVALCANTI et al., 2017; CZAJA et al., 2007; FU; ZHANG; YANG, 2013; HUANG et al., 2014; PECORARO et al., 2008; WEI; YANG; HONG, 2011).

Na literatura existem relatos de diversos estudos *in vivo* comprovando a sua propriedade de biocompatibilidade, característica essencial que um biomaterial precisa possuir para a área médica. As aplicações das pesquisas incluem tratamento de úlceras agudas/ crônicas (ALVAREZ et al., 2004; PARK et al., 2014), implantes em ratos (HELENIUS et al., 2006), *stents* vasculares (ESGUERRA et al., 2010; KLEMM et al., 2001; SCHUMANN et al., 2009), entre outros (ALMEIDA et al., 2014).

Por apresentar alta resistência à tração, alta porosidade, estrutura similar a matriz extracelular, alta pureza, grande capacidade de absorção de água, biocompatibilidade e nanoestrutura nanofibrilar (responsável por suas características físicas e mecânicas) vem sendo utilizada em diversas aplicações médicas como: substituto temporário de pele no tratamento de lesões, queimaduras, como curativo de barreira contra micro-organismo em ferimentos e auxiliar em abrasões dérmicas com sucesso desde a década de 80 (CZAJA et al., 2007; FONTANA et al., 1990; HUTCHENS et al., 2007; PORTELA et al., 2019; RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015).

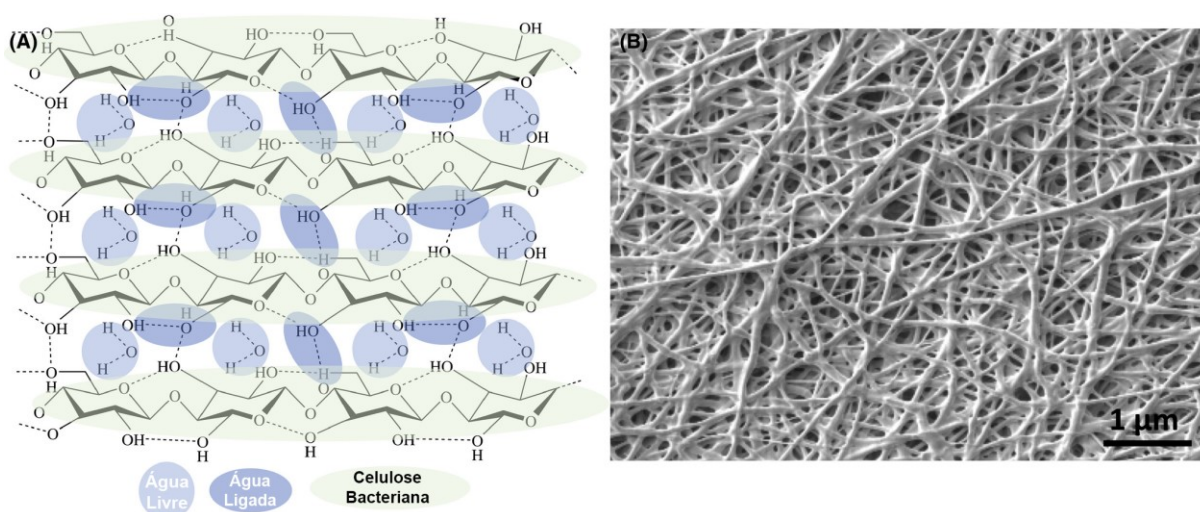
As propriedades físicas, térmicas, mecânicas e biológicas da CB também a tornam interessante no uso como curativo, pois ela fornece uma barreira física contra infecções bacterianas, facilmente esterilizável, não alergênica, não tóxica, não carcinogênico, biocompatível, não necessita de procedimentos para remoção posterior, possui efeito hemostático e reduz a dor durante o tratamento (isolando as terminações nervosas) (FONTANA et al., 1990; PANERARI et al., 2008; PITANGUY; SALGADO; MARACAJÁ, 1988; PORTELA et al., 2019; SANCHAVANAKIT et al., 2006).

Outra vantagem é a sua característica hidrofílica que tem a função de controlar o exsudato, proporcionar um ambiente úmido na ferida e acelerar a granulação, resultando em uma melhor cicatrização e reduzindo a dor e o tempo de tratamento. Com isso, diminui também o custo das internações de doentes com queimaduras e com feridas crônicas, além de atender todos os requisitos de curativo ideal e dos mais modernos biomateriais para feridas crônicas (CAVALCANTI et al., 2017; KHALID et al., 2017; PORTELA et al., 2019; STASIAK-RÓŻAŃSKA; PŁOSKA, 2018).

Algumas das principais características necessárias para o tratamento de feridas, são as propriedades de retenção/liberação de água, a fim de manter a ferida hidratada, absorver grandes quantidades de exsudatos, evitar a desidratação do curativo e evitar que ele se prenda ao ferimento para que o processo de troca seja in-

dolor (OVINGTON, 2007; PORTELA et al., 2019; RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015; STASIAK-RÓŻAŃSKA; PŁOSKA, 2018). A estrutura molecular da CB apresenta moléculas de água ligadas através de ligações de hidrogênio, a água livre (não ligada) capaz de penetrar e sair da estrutura molecular da CB através dos poros é responsável pela manutenção do nível de hidratação da ferida, que é crucial para a aplicação do curativo e cicatrização, conforme pode ser visualizado na Figura 6.

Figura 6 – Representação da celulose: (a) Estrutura molecular da CB úmida e (b) micrografia de superfícies da CB



Fonte: Portela et al. (2019).

Outra característica essencial do curativo de CB é não promover o prolongamento do processo inflamatório, isso é atribuído as suas características físicas e de biocompatibilidade, como sua porosidade, textura da superfície, consistência e propriedade químicas, que promovem uma melhor reação tecidual não perpetuando o processo inflamatório (JOZALA et al., 2016; PANERARI et al., 2008). Outra característica desse curativo biológico é em função da sua semitransparência, o qual possibilita uma constante inspeção da ferida e um segundo tratamento imediato nos casos em que ocorra complicações, como também uma liberação precoce do paciente para o retorno das suas atividades normais, levando a um tempo de internação mais curto, diminuição da troca de curativos e atendimento médico, e consequentemente, sendo outro aliado na redução dos custos do tratamento (PITANGUY; SALGADO; MARACAJÁ, 1988).

Essa redução de custos no tratamento foi comprovada em um estudo com pacientes da Alemanha e Itália, onde os curativos de CB foram 60% a 70% mais econômicos quando comparados aos curativos tradicionais. Nesse estudo, foi considerado o custo total do tratamento com números de trocas, tempo de internamento, mão de obra e de remédios de ambos em clínicas médicas (SCHMITZ; EBERLEIN; ANDRIESSEN, 2014).

Esse biomaterial é conhecido também como pele artificial em função de ser semelhante a pele humana, outra característica que possui é a permeabilidade seletiva, pois é permeável a gases e impermeável a micro-organismos, formando uma barreira bacteriológica para que o ferimento consiga respirar, além de acelerar todo o processo de reepitelização (CZAJA et al., 2006; YOSHINAGA; TONOUCHI; WATANABE, 1997). Pode-se dizer que a CB satisfaz os requisitos necessários para promover a cicatrização das feridas e ser considerada um curativo promissor.

Em um estudo foi avaliado o efeito da aplicação das membranas de CB com diferentes valores de pH em feridas cutâneas de ratos, os autores concluíram que a CB ácida obteve melhor eficiência na cicatrização das feridas (POURALI et al., 2018). Além disso, a pele em seu estado natural é de natureza seca e ácida (pH entre 4 e 6,8), sendo os queratinócitos as células responsáveis pela produção de lipídios da pele e por manter os níveis de hidratação (PORTELA et al., 2019). Dessa forma, manter um pH baixo para as membranas não prejudicará a pele do paciente, uma vez que ambos apresentam caráter ácido.

Diante da variedade de aplicações e características especiais conclui-se que a CB é um material muito versátil e ideal para curativos de alta qualidade, aplicado principalmente em inovações e soluções de grande importância para a sociedade.

2.2.3.3 Perspectivas futuras relatadas

Apesar do seu enorme potencial para cicatrização de feridas, o alto custo e o lento processo de produção da CB são as principais desvantagens que dificulta a sua aplicação industrial em larga escala (CZAJA et al., 2007; KLEMM et al., 2018; TSOUKO et al., 2015; TURECK, 2017). Nos últimos anos, muitos estudos buscam encontrar novos meios de cultivo de baixo custo e métodos para acelerar a produção do polímero em um menor tempo, porém o meio de cultura ainda será um fator que precisará de bastante investigação para viabilizar o seu uso (SHARMA;

BHARDWAJ, 2019b; TSOUKO et al., 2015). Além disso, investigações bioquímicas, genéticas e de engenharia precisam ser conduzidas de modo a compreender e melhorar o processo de produção da celulose, além de um controle minucioso nos parâmetros estruturais para poder aumentar o número de aplicações em um futuro próximo (CZAJA et al., 2007; MOHITE; PATIL, 2014; MONA et al., 2019; YOSHINAGA; TONOUCHI; WATANABE, 1997). E então a possibilidade de produzir CB em larga escala com êxito será alcançada e o tornará um biomaterial imperativo, utilizada na criação de uma vasta variedade de dispositivos e produtos inovadores (MOHITE; PATIL, 2014; MONA et al., 2019; YOSHINAGA; TONOUCHI; WATANABE, 1997).

Embora a CB apresente aplicações em diferentes áreas em função das suas excelentes propriedades físico-químicas, algumas características ainda são limitadas desse promissor biopolímero, como a atividade anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana, essa última é crucial para evitar a infecção da ferida durante a cicatrização, reduzindo a eficácia da CB como curativo em feridas altamente contaminadas (BARUD et al., 2016; PORTELA et al., 2019; SHAH et al., 2013; SULAEVA et al., 2015; WEI; YANG; HONG, 2011). No entanto, devido às características de alta resistência mecânica e à tração, estabilidade térmica, alta pureza, alta porosidade e alta hidrofiliabilidade forma um suporte macromolecular adequado que possibilita a inserção de uma alta capacidade de carregamento de líquidos e materiais biofuncionais para aprimorar as propriedades terapêuticas desse material, funcionando portanto, como um sistema de introdução e liberação controlada desses ativos (ALMEIDA et al., 2014; CAMPANO et al., 2016; MOHITE; PATIL, 2014; PORTELA et al., 2019; SULAEVA et al., 2015). Essas inserções de diferentes tipos de materiais podem ser realizadas *in situ* (durante o cultivo da CB) ou *ex situ* (após o cultivo), vindo a ampliar as pesquisas de CB para possíveis produtos inovadores (HU et al., 2014; JOZALA et al., 2016; SHAH et al., 2013).

Entre as abordagens mais utilizadas para inserir propriedades adicionais para a CB, está o método de impregnação *ex situ*. O fator mais importante na utilização desse método é que a estrutura original da CB permanece quase inalterada (CACICEDO et al., 2016). A interação acontece na forma física ou através da presença de porções OH nas cadeias de celulose que resulta em ligação de hidrogênio com os materiais adicionados (SHAH et al., 2013). Ressalta-se que o obstáculo da técnica *in situ* está relacionado às substâncias terapêuticas que serão inseridas no

meio nutriente antes do cultivo, pois elas podem ter efeitos citotóxicos em função da atividade antimicrobiana contra as células do micro-organismo produtor de celulose, que irá inibir a produção da CB (EL-WAKIL et al., 2019; SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010). Acrescenta-se ainda que, ao se utilizar o método de esterilização tradicional dos meios de cultivo que é por autoclavagem a 121 °C, por ser uma temperatura muito elevada, vários compostos bioativos são degradados, portanto, a atividade terapêutica não será alcançada.

Outra estratégia relatada é a modificação química da CB para fornecer uma capacidade de adsorção adicional para a inserção de substâncias desejáveis, essa alternativa se torna relevante em função da CB apresentar carácter hidrofílico e com a modificação da superfície é possível torná-la hidrofóbica através de processos *ex situ* de acetilação, silanização, esterificação, eterificação, carboxilação, fosforilação, entre outros, aumentando assim o número de tipos de substâncias capazes de interagir com esse biomaterial e proporcionando a criação de uma variedade de novos dispositivos e produtos inovadores (SULAEVA et al., 2015).

Através dessas abordagens e o aprimoramento dos estudos envolvendo a CB, a gama de aplicações foi aumentando e os novos estudos estão trazendo uma classe de novos biomateriais multifuncionais, porque permitem a criação de materiais com propriedades aprimoradas ou novas, misturando vários constituintes e explorando efeitos sinérgicos, como os biocurativos antimicrobianos através da inserção de prata (ARIS et al., 2019; CESCO et al., 2020; TABAI; EMTIAZI, 2018; TEIXEIRA et al., 2019; WU et al., 2014), nanopartícula de titânio (KHALID et al., 2017; LOPES, 2019), ácido hialurônico (LI et al., 2015), antibiótico amoxicilina (YE et al., 2018), antibiótico ceftriaxona (LAZARINI et al., 2016), pectina (CACICEDO et al., 2018), colágeno (CAI; YANG, 2011; MORAES et al., 2016), gelatina (CAI; KIM, 2010; KIRDPONPATTARA; PHISALAPHONG; KONGRUANG, 2017; LIN et al., 2015a), quitosana (KIM et al., 2011; KINGKAEW et al., 2014; LIN et al., 2013b; UL-ISLAM; KHAN; PARK, 2012b), cloreto de benzalcônio (WEI; YANG; HONG, 2011), argila montmorilonita (HODEL et al., 2020; SAJJAD et al., 2019; UL-ISLAM; KHAN; PARK, 2012a, 2012b), entre outros, os resultados de tais estudos foram positivos e a expectativa é que o uso comercial se torne real em um futuro próximo, como foi o caso da empresa Xylos ao lançar em 2003 nos EUA o curativo de celulose bacteriana antimicrobiano com a inserção de polihexametileno biguanida (PHMB), denominado “XCell Antimicrobial Wound Dressing”, atualmente esse curativo pertence a

empresa Lohmann & Rauscher, renomeado para “Suprasorb® X + PHMB” (ALBLAS et al., 2011; HU et al., 2014).

Apesar desses resultados encorajadores, a busca por um material ainda mais ideal para o tratamento de feridas diabéticas ainda continua (KHALID et al., 2017; SULAEVA et al., 2015). Esse tipo de ferida é difícil de curar e representa um importante impacto socioeconômico e um desafio clínico significativo, assim como a qualidade de vida do paciente (CHAWLA et al., 2009; CZAJA et al., 2006). Nesse sentido, um novo foco nas investigações da comunidade científica para o tratamento dessas lesões está sendo relatado a partir do desenvolvimento de curativos associados com plantas medicinais em função dos seus potenciais usos terapêuticos. Além disso, o aumento da conscientização sobre feridas infectadas e resistência a antibióticos foram um dos motivos para direcionar esses estudos na criação de um curativo multifuncional com agentes biológicos, como extratos vegetais, que podem conferir natureza antimicrobiana, anti-inflamatória, antifúngica e antioxidante a CB (PORTELA et al., 2019; SHARMA; BHARDWAJ, 2019b).

Diante dessas possibilidades de aprimoramento que estão surgindo com o intuito de melhorar os benefícios da CB em diversas áreas, vários estudos indicam que ela é a melhor candidata em aplicações biomédicas e biotecnológicas para o desenvolvimento de uma infinidade de dispositivos biomédicos diferentes e em especial como curativo (CZAJA et al., 2007; MOHITE; PATIL, 2014; RECOUVREUX, 2008). Além disso, a CB como biomaterial no tratamento de feridas será intensivamente usada e continuará a representar grande importância no futuro (FU; ZHANG; YANG, 2013; KLEMM et al., 2018; SULAEVA et al., 2015; UL-ISLAM et al., 2017).

2.2.3.4 Celulose Bacteriana/ Plantas medicinais

Em geral, a literatura apresenta-se muito vasta em relação a aplicação da CB, porém, estudos envolvendo esse polímero e plantas medicinais começaram a despertar o interesse da comunidade científica nas últimas décadas e com um aumento acentuado nos últimos 3 anos (63,5%). Esse levantamento foi conduzido sem limitação de tempo até fevereiro de 2020 e foi consultado as seguintes bases de dados: Pubmed, ScienceDirect, Scopus, Google Scholar, Google Patents e Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), resultando em um total de 63 documentos (teses, dissertações, artigos e patentes).

Os primeiros relatos encontrados na literatura remetem a Recouvreux (2008), Picchi (2010) e Saibuatong & Phisalaphong (2010), sendo os pioneiros em descrever o emprego da CB com plantas medicinais para a área médica. Desde então, o uso da CB como curativo terapêutico vêm se intensificando e os novos trabalhos vêm mostrando novas vantagens e o aprimoramento de tais estudos, como também novas abordagens para a área médica, além de estarem surgindo novas aplicações além dessa área, como na área têxtil, cosmética e na engenharia de alimentos.

Uma questão importante que vem sendo reportado nas pesquisadas desses novos curativos de CB são as propriedades do curativo com relação à capacidade de retenção de água (CRA) e a capacidade de liberação de água (TLA), pois os exsudatos devem ser eliminados da ferida para que ocorra a cicatrização e os curativos apresentam a função de drenagem em conjunto com a hidratação e liberação de ativos terapêuticos para que o processo de cicatrização ocorra da melhor maneira, exigindo que o curativo equilibre a absorção e liberação de líquidos (ABEER; AMIN; MARTIN, 2014; DAVIDSON, 2015; PORTELA et al., 2019).

A CRA e a TLA são uma das propriedades mais relevantes no desenvolvimento de um curativo, fornecendo parâmetros físicos quantitativos, que dependem do tamanho e distribuição dos poros, volume, área superficial, condição de cultivo, micro-organismo, composição nutricional do meio de cultivo e a adição de substâncias hidrofílicas na CB, que poderão alterar os valores de CRA e TLA (PORTELA et al., 2019; SULAEVA et al., 2015; TSOUKO et al., 2015; UL-ISLAM; KHAN; PARK, 2012b). Quanto maior a área da superfície e o tamanho dos poros, maior será a quantidade de água penetrada e retida na matriz de CB (TSOUKO et al., 2015). Outro índice de qualidade para curativos é a avaliação pré-clínica da taxa de transmissão de vapor de água (TTVA), se o valor é alto irá acelerar a desidratação e a formação de crostas de uma ferida e se for baixo irá causar a acumulação de fluídos na ferida, prolongando o processo de cicatrização e aumentando o risco de contaminação bacteriana, portanto, um valor de TTVA desejável é de 2500–3000 g/m².dia que irá fornecer umidade adequada e evitar a desidratação da ferida (PORTELA et al., 2019; QUEEN et al., 1987).

Vários grupos de pesquisa vem propondo o uso de distintas plantas medicinais como própolis (BARUD et al., 2013; FELTZ et al., 2018), calêndula (NEVES et al., 2018), hamamélis (MOLIN et al., 2019), café (EL-WAKIL et al., 2019), tomilho (ADEPU; KHANDELWAL, 2020; JIJI et al., 2019), gengibre (BRASSOLATTI et al.,

2018; POURALI; YAHYAEI, 2019), babosa (BRUNKEN et al., 2014; SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010), abacaxi (ATAIDE et al., 2017), amora (CHEN et al., 2019b), entre outros. O principal motivo do interesse por estudos mais naturalistas é o cenário de resistência microbiana frente a vários fármacos, uma vez que as plantas medicinais possuem vários compostos nas plantas, sendo, portanto, uma solução para enfrentar a resistência microbiana em feridas contaminadas. A seguir serão apresentadas algumas plantas que mais estão sendo reportadas na literatura com esse polissacarídeo.

O primeiro estudo envolvendo planta medicinal foi de CB com suplementação de acemanana (babosa) durante a síntese do biopolímero, com o intuito de formar um compósito com propriedades terapêuticas (RECOUVREUX, 2008). Foi demonstrado que a acemanana aumentou a espessura das fibras em 18% e reduziu o diâmetro dos poros em 20%, como conclusão a autora propôs a construção de dispositivos de implante bioativos a partir deste compósito (RECOUVREUX, 2008). Posteriormente, outro trabalho de CB com adição de gel de babosa durante a síntese do biopolímero obteve resultados similares, foi demonstrado que a adição de até 30% de babosa reduziu o tamanho médio dos poros em cinco vezes, enquanto que as características mecânicas, de higroscopicidade, cristalinidade, área superficial, permeabilidade ao vapor de água e o WHC aumentaram em comparação com a CB pura, portanto, esses resultados são satisfatórios e torna o biomaterial CB/babosa promissor para uso como curativo (SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010). Além disso, até os dias atuais outros pesquisadores continuam estudando com sucesso a CB associada com a babosa sob diferentes condições que englobam aplicações para a área médica e cosmeceutica (BATAIN et al., 2019; BRUNKEN et al., 2014; CESCO et al., 2014; GODINHO et al., 2016; HASAN; BIAK; KAMARUDIN, 2012; LIN et al., 2015b; PIAIA; PAES; PORTO, 2014; PINTO, 2012).

Uma substância natural que vem despertando o interesse do meio científico é a própolis. Em um dos estudos da CB/própolis foi investigado a incorporação do extrato alcoólico em membranas úmidas e secas de CB, o trabalho relatou que as amostras úmidas do polímero foram exaustivamente submetidas a um processo de troca de solventes (água por etanol) antes da incorporação, pois algumas substâncias que compõem a própolis possuem caráter hidrofóbico e são solúveis em ambiente alcoólico. Portanto, para facilitar a interação do extrato com a celulose eles usaram álcool etílico que forma um azeótropo com a água, diminuindo a porcentagem

de água gradualmente (PICCHI, 2010). Dentre os resultados alcançados pelo autor, destaca-se que a incorporação foi mais eficiente na membrana úmida, pois o extrato é adsorvido na superfície e nos seus interstícios, diferente de quando a incorporação acontece nela seca, pois essa incorporação fica apenas na superfície, logo, a membrana desidratada não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana.

Similarmente em outro trabalho de CB/própolis, os pesquisadores também utilizaram o processo de troca de solvente com etanol e demonstraram que foi possível incorporar própolis na superfície e nos interstícios da membrana úmida, e concluíram que para se obter uma cicatrização mais rápida em feridas contaminadas é necessário incorporar uma quantidade desejada de compostos bioativos e de atividade antibacteriana, porém, essa dose pode ser facilmente acertada para obter um curativo terapêutico com concentrações adequadas, levando em consideração a sua aplicação e o tempo de permanência na pele (BARUD et al., 2013). Além desses estudos, outros pesquisadores testaram diferentes tipos de própolis na CB, bem como o estudo do efeito sinérgico da própolis com outras plantas e alcançaram resultados satisfatórios com aplicabilidade nas áreas médica, cosmecêutica e de alimentos (AMORIM et al., 2020a; ARAÚJO JÚNIOR et al., 2014; FELTZ et al., 2018; MARQUELE-OLIVEIRA et al., 2019; MOCANU et al., 2019; PACHECO et al., 2018b; PICOLOTTO et al., 2019; SANCHEZ, 2012).

Recentemente um grupo de pesquisa estudaram o efeito de CB/café e demonstraram que o biomaterial preparado era adequado para ser usado como um curativo bioativo para liberação de compostos fenólicos que visam auxiliar e acelerar o processo cicatricial de feridas (EL-WAKIL et al., 2019). Outros resultados satisfatórios foram encontrados na literatura empregando CB/café sob diferentes condições em aplicações cosmecêutica (PERUGINI et al., 2020; SILVA et al., 2014).

Acrescenta-se ainda que vários estudos demonstraram que a associação da CB com plantas medicinais foram eficazes na cicatrização de feridas em modelo animal e em humanos (EL-HOSEN et al., 2015; JIJL et al., 2019; MARQUELE-OLIVEIRA et al., 2019; MORAES; RIBEIRO; GASPARI, 2019; MUALLA et al., 2016; PICOLOTTO et al., 2019; SANCHEZ, 2012).

Além disso, os relatórios da FDA (Food and Drug Administration) indicam que a CB é o principal e único componente de alguns produtos aprovados para o tratamento de feridas, fato que nos motiva em nossos esforços para promover seu uso nessa área (ABEER; AMIN; MARTIN, 2014).

Dessa forma, a associação da CB/plantas medicinais caracterizam uma excelente opção para ser usada em tratamento de feridas diabéticas, porque permitem que extratos de plantas bioativas possam ser usados no combate de infecções, em vez de antibióticos, para diminuir a resistência bacteriana e melhorar o bem-estar geral dos pacientes (KHANAFARI; ZANGENEH; SHARIFNIA, 2013; SHARMA; BHARDWAJ, 2019b). Além de levar à criação de materiais com propriedades aprimoradas ou novas, misturando vários constituintes e explorando efeitos sinérgicos (HU et al., 2014).

2.2.4 Plantas medicinais

A utilização de plantas medicinais no tratamento e na cura de doenças e feridas é uma prática milenar, já que, foi a partir da experimentação e aplicação delas por meio de chás, cataplasmas, tinturas e pós que foram descobertos os primeiros compostos químicos naturais dotados de propriedades biológicas. Inclusive a Organização Mundial da Saúde reconhece que cerca de 80-85% da população mundial continua usando as plantas medicinais para esses fins, por isso que em diversas regiões do Brasil, desde pequenos povoados até grandes cidades, plantas medicinais são encontradas nos quintais de residências, comercializadas em feiras, mercados populares e lojas especializadas (BRASIL, 2016; MACIEL et al., 2002). Dessa forma, com o passar do tempo e o aprimoramento das tecnologias envolvendo estudos etnofarmacológicos, foi possível conectar os conhecimentos técnico e científico com as propriedades dos produtos oriundos da natureza a fim de aumentar a eficácia no desenvolvimento de produtos terapêuticos naturais.

As plantas de interesse para o tratamento de feridas, são destacadas pela ação cicatrizante, anti-inflamatória e antimicrobiana, e essas ações são concedidas pelos princípios ativos, como polifenóis, triterpenos, saponinas, autocianinas, alcalóides, flavonóides e biomoléculas e podem influenciar em uma ou mais fases do processo de cicatrização (PONRASU; SUGUNA, 2012).

O Brasil é um dos grandes produtores do setor agrícola, possuindo uma extensa área verde, solo fértil e biodiversidade, configurando uma importante fonte pa-

ra o desenvolvimento terapêutico e descoberta de novos princípios ativos decorrentes dos recursos naturais que ele possui.

Uma busca foi realizada para encontrar quais plantas medicinais têm as características de interesse para tratamentos em feridas. Resultou em uma lista de 51 plantas medicinais (dados não mostrados) que apresentavam atividade terapêutica cientificamente comprovada para o tratamento de feridas. Dentre estas, foram selecionadas 6 espécies para aprofundar o estudo, conforme mostrado na Figura 7.

Figura 7 – Ilustração das plantas selecionadas para o estudo: calêndula (a), picão-preto (b), urucum (c), barbatimão (d), ipê-roxo (e) e girassol (e)

CALÊNDULA	PICÃO-PRETO	URUCUM
		
(a)	(b)	(c)
BARBATIMÃO	IPÊ-ROXO	GIRASSOL
		
(d)	(e)	(f)

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Portanto, uma das plantas escolhidas é o girassol (*Helianthus annuus*), pois contém ácido linoleico, alcaloide, taninos, óleos fixos, ácido graxos não saturados e compostos fenólicos (AZIZ et al., 2014; MORESKI; LEITE-MELLO; BUENO, 2018). O ácido linoleico é fundamental na regulação da produção de collagenase; favorece

o desbridamento autolítico no leito da ferida, pois contribui na produção de metaloproteínas, que induzem a granulação e podem acelerar o processo de cicatrização (FERREIRA et al., 2012). Acrescenta-se ainda que ele exerce importante papel como mediador pró-inflamatório a fim de ocasionar um aumento considerável da migração de leucócitos e macrófagos e regula processos que precedem a mitogênese de células fibroblásticas (MORAIS et al., 2013). O extrato oleoso de girassol é capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. vulgaris* e *C. albicans*, o que favorece a escolha para o nosso estudo (AZIZ et al., 2014). E ainda, foi comprovado em um estudo *in vivo* com coelhos o seu efeito sinérgico com a calêndula em feridas, onde foi mostrado o seu alto poder de eficácia na cicatrização de feridas com processo infeccioso presente (MORESKI; LEITE-MELLO; BUENO, 2018).

Outra planta estudada é o urucum (*Bixa orellana* L.), que possui muitos compostos bioativos, oriundos de seu metabolismo secundário. Dentre os principais compostos destacam-se os fenólicos e os carotenoides, responsáveis pela atividade antioxidante (MOREIRA et al., 2014). Além disso, o extrato da semente do urucum também apresenta atividade antimicrobiana para *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans* e acelera o processo cicatricial de feridas em função da sua atividade anti-inflamatória (CAPELLA et al., 2016; FLEISCHER et al., 2003; VILAR et al., 2014).

Relatos da atividade cicatrizante, anti-inflamatória, hemostática, antisséptica, antidiarreica, antiedematogênica e antimicrobiana, tendo os taninos como componentes majoritários, são descritos para o barbatimão (FONSECA; LIBRANDI, 2008). No processo de cicatrização, os taninos se ligam às proteínas dos tecidos lesados, criando uma camada protetora que isola o local da ferida, reduzindo a permeabilidade e exsudação da ferida e promovendo a reparação dos tecidos (PASSARETTI et al., 2016). Um grupo de pesquisa comprovou em modelo animal a melhora na cicatrização com o uso do barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*) (COELHO et al., 2010).

O ipê-roxo (*Tabebuia heptaphylla* e *impetiginosa*) é usado como analgésico e como auxiliar em tratamentos da pele. Como princípios ativos destacam-se as quinonas, naftoquinona, taninos e flavonoides, que apresentam ação anti-inflamatória,

analgésica, antibiótica e antineoplásica, essas atividades contribuem para a eficácia na melhora da cicatrização em feridas, fato esse comprovado em estudo *in vivo* com animais (COELHO et al., 2010).

O picão-preto (*Bidens pilosa*) possui em sua composição poliacetilenos PHT, flavonoides, alcaloides, esteroides, taninos, ácido linoleico e ácido linolênico. Tais compostos concedem a planta propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-térmicas, antivirais e antifúngicas. Além disso, o picão preto também pode ser empregado no tratamento de infecções microbianas, sendo eficaz no efeito alopático a patógenos (SANTOS; CURY, 2011).

A calêndula (*Calendula officinalis*) foi utilizada na guerra civil americana para tratar os feridos em função do seu poder cicatrizante, anti-inflamatório e antisséptico, essas propriedades são atribuídas aos vários ativos biológicos que ela possui, como carotenoides, flavonoides, glicosídeos, terpenos, saponinas, esteróis, ácidos fenólicos, lipídios, etc (ASHWLAYAN et al., 2018; MORESKI; LEITE-MELLO; BUENO, 2018). Ela é principalmente benéfica na etapa de cicatrização que envolve a reepitelização do machucado, podendo ainda ser aplicada no tratamento de equimoses, eczemas, erupções e outras lesões cutâneas (PARENTE et al., 2009). Também é usada para acalmar a pele inflamada e danificada (ASHWLAYAN et al., 2018). Foi comprovado que a calêndula possui ação anti-inflamatória e seu extrato etanólico e frações diclorometano e hexânica, mostraram dispor de propriedades antibacterianas, especialmente sobre bactérias gram-positivas e favorecem o reparo cicatricial em ratos (PARENTE et al., 2009). Por todos esses motivos que o seu extrato é usado em quase 200 formulações cosméticas (ASHWLAYAN et al., 2018).

Ressalta-se ainda que o picão-preto, calêndula, ipê-roxo e barbatimão fazem parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) (BRASIL, 2009), portanto, apresentam grande potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva e de gerar produtos de interesse ao Sistema Único de Saúde.

Dessa forma, para se beneficiar das propriedades dessas plantas, a utilização de extratos vegetais vem se tornando uma alternativa importante, pois é possível obter grande quantidade de compostos fenólicos (isto é, flavonoides e ácidos fenólicos) que exibem uma ampla gama de efeitos biológicos, incluindo propriedades antioxidantes e antimicrobianas (SUKHTEZARI et al., 2017).

Logo, por meio da associação da membrana de CB com extratos vegetais alcoólicos e glicólicos de girassol, urucum, calêndula, picão-preto, ipê-roxo e barbatimão, será possível desenvolver novas formas de aplicação das plantas associadas ao biomaterial, além de agregar valor à recursos naturais utilizando-os em processos biotecnológicos visando aplicações terapêuticas.

2.3 Relevância do trabalho

Os ativos terapêuticos incorporados podem desempenhar um papel ativo no processo de cicatrização de feridas diretamente como limpeza ou desbridatantes para remover tecido necrótico, ou indiretamente como fármacos antimicrobianos que previnem ou tratam agentes de infecção para ajudar na regeneração do tecido (BOATENG; CATANZANO, 2015). Nesse sentido, as plantas medicinais irão agregar propriedades antioxidantes e antimicrobianas aos curativos, ajudando na contração, vascularização e epitelização da lesão (KRISHNAN; THOMAS, 2019).

Atualmente, existe uma grande variedade de trabalhos científicos que envolvem curativos de CB antimicrobianos, porém, é raro os trabalhos que abordam mais de um tipo de componente bioativo. Além disso os produtos disponíveis comercialmente para feridas utilizam inserções sintéticas.

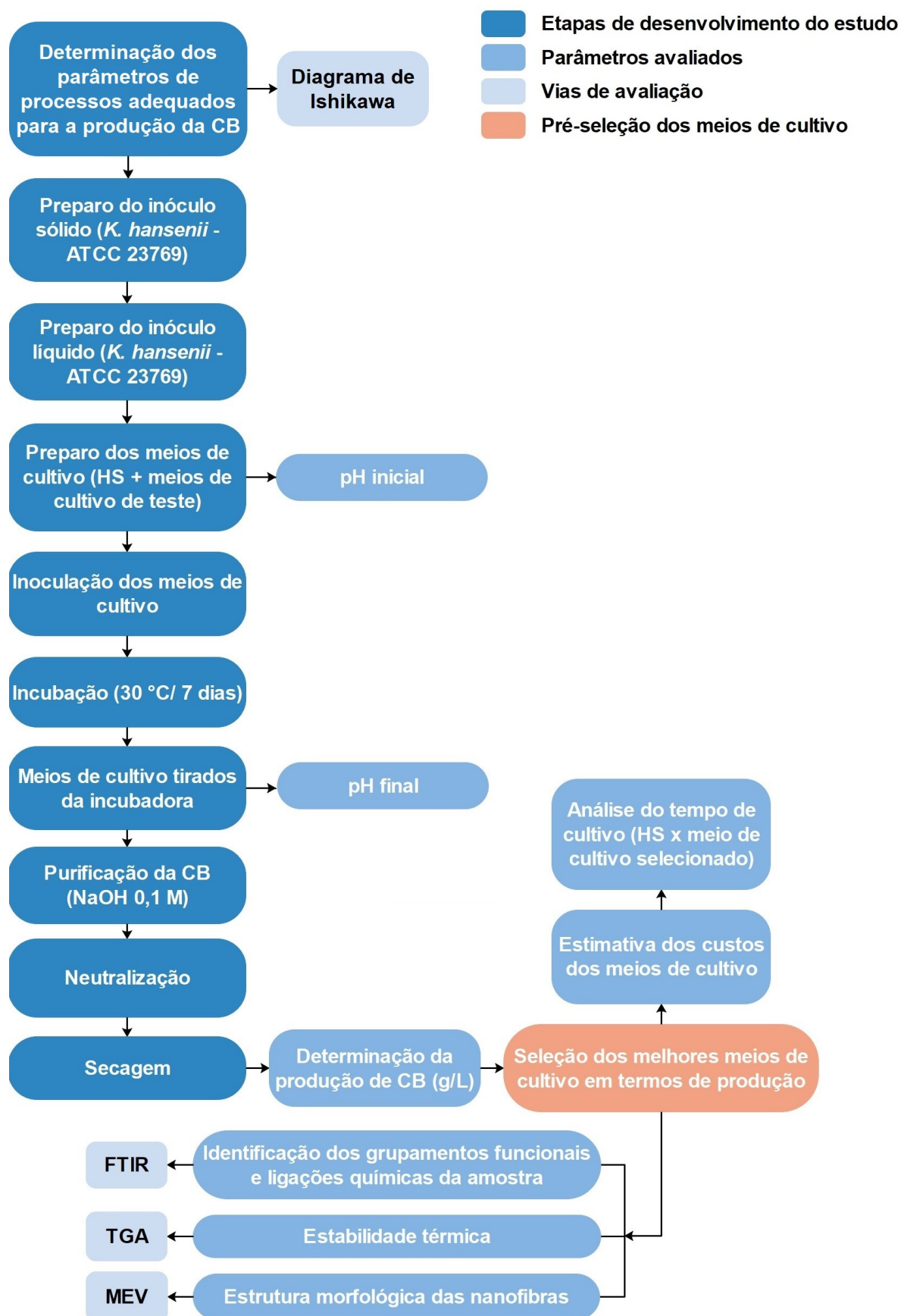
Acrescenta-se ainda, que para o sucesso desses curativos é preciso considerar vários aspectos importantes, como: o uso de matérias-primas de baixo custo; facilidade na síntese e no método de processamento; propriedades biocompatíveis; impacto reduzido no meio ambiente ao final da vida útil; fabricação de produtos biodegradáveis (MOCANU et al., 2019).

Sendo assim, a importância desse trabalho está na confirmação de que o uso de fontes alternativas é viável para a produção da membrana, o qual resultou numa formulação de meio de cultivo ainda não relatada na literatura e com um custo mais baixo, a utilização de mais de um ativo natural para garantir propriedades terapêuticas sinérgicas e mais robustas. Portanto, o trabalho em questões aborda um conjunto de ações ainda não reportado na literatura até onde sabemos, logo, evidenciando o seu caráter inovativo. Além disso, esse biomaterial está alinhado aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) para não impactar o meio ambiente.

3 METODOLOGIA

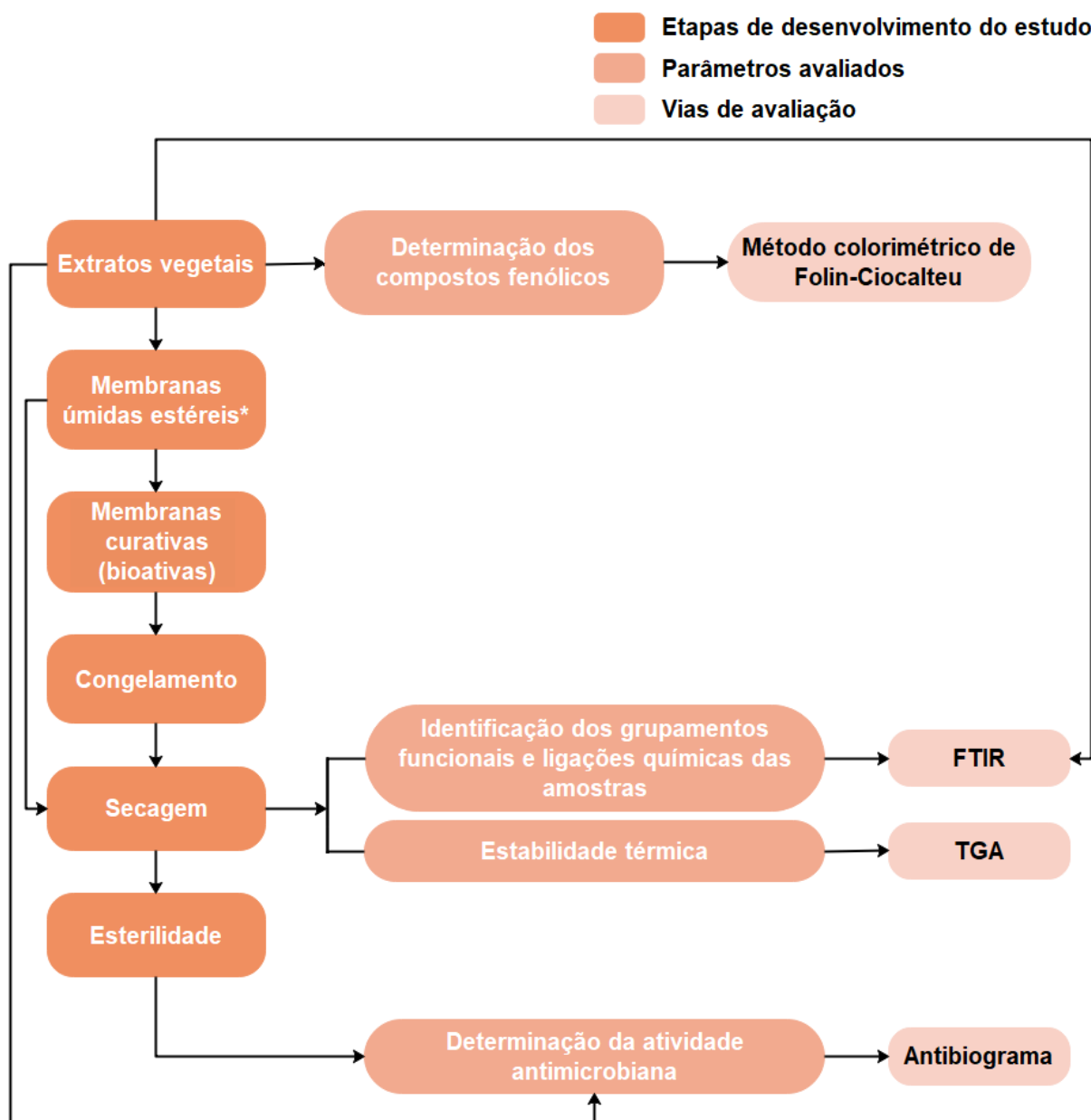
Para uma melhor compreensão da metodologia adotada, nas Figura 8 e 9 são apresentados os fluxogramas simplificados e nas sessões posteriores o detalhamento de cada etapa.

Figura 8 – Fluxograma simplificado da metodologia adotada para o estudo dos meios de cultivo



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Figura 9 – Fluxograma simplificado da metodologia adotada para o estudo das membranas curativas (bioativas). *membranas HS e ManitolLAS-65



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

3.1 Produtos químicos e reagentes

Todos os produtos químicos utilizados na elaboração dos meios de cultura foram de qualidade P.A. e/ou P.A. ACS, bem como os reagentes usados para as análises, exceto quando citado diferente. Em relação aos demais insumos que não se enquadram nessa categoria inclui-se o extrato de levedura obtido da empresa SIGMA ALDRICH, o reagente Folin Ciocalteu da ÊXODO CIENTÍFICA, a água de mace-

ração do milho (milhocina) cedido pela CORN PRODUCTS (Barra Nova/PR), o extrato de levedura bruto (Prodex Lac®) cedido pela BIOSPRINGER (Valinhos/SP) e os extratos vegetais obtidos da empresa FLORA ERVAS COMERCIAL LTDA (São José dos Pinhais/PR).

3.2 Obtenção da membrana de celulose

3.2.1 Análise dos parâmetros de processos

A determinação dos parâmetros de processo adequados é de grande importância para a viabilidade de um processo. Logo, como métodos para solução de problemas e otimização de processos foi aplicado uma das ferramentas de qualidade com foco nos parâmetros de processos, de modo a remover as causas dos problemas, obtendo uma maior produtividade e redução de perdas (MAICZUK; ANDRADE JÚNIOR, 2013). A ferramenta utilizada foi o diagrama de Ishikawa já que é uma ferramenta importante para os processos de planejamento, auxiliando na identificação de causas e efeitos que têm relação direta com a maioria dos problemas encontrados na organização e que devem ser eliminados (ARAÚJO, 2011; FARIA; SANTOS, 2021).

Portanto, inicialmente antes dos testes laboratoriais foi construído o diagrama de Ishikawa para o levantamento dos parâmetros de processos que têm algum potencial de impactar o desempenho da produção da CB. Posteriormente a essa análise, foi realizada a modelagem gráfica desses parâmetros para a avaliação das melhores condutas para a otimização da produção de CB e então iniciar a parte experimental, conforme detalhado em cada etapa desse capítulo.

3.2.2 Micro-organismo

Para a avaliação da produção de CB, o micro-organismo utilizado foi a bactéria *Komagataeibacter hansenii*, linhagem ATCC® 23769. A bactéria foi obtida da Fundação André Tosello – Coleção de Cultura Tropical (CCT), (Campinas, SP). As placas de ágar (pH 6,5 ± 0,05) usadas para o crescimento das cepas foram preparadas em meio manitol-ágar com a seguinte composição: 25 g/L de manitol, 5 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de peptona e 15 g/L de ágar, esterilizadas por 20 min a 121 °C em autoclave, inoculadas em condições assépticas e incubadas a 30 °C por

48 h em condição estática, posteriormente foram mantidas sob refrigeração (4 a 6 °C) e 24 h antes do uso foi incubado estaticamente a 30 °C para ser ativado (ATCC, 2020).

3.2.3 Preparação do inóculo líquido

Para o inóculo foi utilizado o meio manitol líquido (pH $6,5 \pm 0,05$), com 25 g/L de manitol, 5 g/L de extrato de levedura e 3 g/L de peptona (ATCC, 2020; SOUZA et al., 2019). Em condições assépticas as colônias de *K. hansenii* foram selecionadas aleatoriamente e inoculadas em meio manitol esterilizado até a densidade óptica (D.O) inicial ajustada em $1,5 \pm 0,5$ a 600 nm, utilizando o espectrofotômetro Novaspec II – LKB Biochrom e cultivadas em condição estática a 30 °C por 24 h.

3.2.4 Condições de cultivo

Após o cultivo do inóculo, as células foram transferidas a uma taxa de 20% para os meios de cultivo estéreis (pH $6,5 \pm 0,05$) sob condições assépticas e incubados em condição estática a 30 °C durante 7 dias (STUMPF et al., 2013). Todas os experimentos foram conduzidos em triplicata.

Para a produção das membranas foi utilizado como controle o meio de cultivo padrão HS adaptado de Hestrin e Schramm (1954), contendo 20 g/L de manitol, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 2,7 g/L de fosfato de sódio e 1,15 g/L de ácido cítrico.

Para o estudo dos meios alternativos foram elaborados 83 meios de cultivo, os quais englobaram 2 fases de investigação. Na primeira fase foram formulados 20 meios de cultivo + o controle (HS), resultando em 5 meios de cultivo selecionados, que obedeceram ao critério de que a produção de CB em base seca (g/L) fosse igual ou superior ao meio de referência HS. Esses 5 meios de cultivo foram divididos em 3 grandes grupos, MF (MF-25 e MF-35), PHS (PHS) e Manitol (Manitol e ManitolAS-75). A fase 2 teve como objetivo otimizar os resultados alcançados na fase 1, para tanto, foram selecionados os grupos PHS e Manitol. Portanto, para o grupo Manitol o objetivo foi variar as concentrações dos substratos para otimizar a produção, logo, foram criados novos subgrupos: ManitolAS (meio manitol + amido solúvel), Manito-

IASP (meio manitol com Prodex Lac® + amido solúvel), AS (meio manitol com 1 fonte de carbono (amido solúvel)) e MP-AS (variação do meio manitol, utilizando somente Prodex Lac® + manitol + amido solúvel), ManitolLAS (meio manitol + lactose + amido solúvel) e LAS (meio manitol com 2 fontes de carbono (lactose + amido solúvel)). Para o grupo PHS a tentativa foi testar outras concentrações de Prodex Lac® (PHS-10), além da adição de peptona e amido solúvel, dessa forma, os novos subgrupos criados foram PHS-P (PHS + peptona) e PHS-AS-70 (PHS + amido solúvel). Por último, criou-se o grupo HS-AS-70, com o intuito de melhorar os resultados do HS com a adição do amido solúvel. Portanto, esse estudo resultou em um total de 5 grandes grupos e 26 meios de cultivos para serem avaliados + o controle (HS). No Quadro 2 são apresentadas as composições dos diferentes meios estudados, bem como os grupos e os subgrupos, e no Apêndice A constam os demais meios de cultivo.

Quadro 2 – Composição dos meios de cultivo e agrupamentos

(continua)

Fase	Grupos	Subgrupos	Fonte de nitrogênio	Fonte de carbono	Outros nutrientes	SIGLA	Meio	Referência
1	MF		Milhocina (5 g/L)	Frutose (20 g/L)	-	MF-25	Meio 1	Neves et al (2018) e Turek (2017)
1			Milhocina (15 g/L)	Frutose (20 g/L)	-	MF-35	Meio 3	Neves et al (2018)
1	PHS	PHS	Prodex Lac® (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	PHS	Meio 6	Este trabalho
2			Prodex Lac® (10 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	PHS-10	Meio 83	Este trabalho
2		PHS-AS-70	Prodex Lac® (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Amido solúvel (50 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	PHS-AS-70	Meio 77	Este trabalho
2		PHS-P	Prodex Lac® (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	PHS-P	Meio 79	Este trabalho
-	Controle (HS)		Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HS	Meio 7	Adaptado de Hestrin e Schramm (1954)
1	Manitol	Manitol	Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (3 g/L)	Manitol (25 g/L)	-	Manitol	Meio 12	Stumpf et al (2013) e ATCC (2020)
1		ManitolAS	Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (3 g/L)	Manitol (25 g/L) Amido solúvel (50 g/L)	-	ManitolAS-75	Meio 14	Adaptado de Stumpf et al (2013)
2			Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (3 g/L)	Manitol (25 g/L) Amido solúvel (25 g/L)	-	ManitolAS-50	Meio 65	Este trabalho
2			Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (3 g/L)	Manitol (12,5 g/L) Amido solúvel (25 g/L)	-	ManitolAS-37,5	Meio 66	Este trabalho

Quadro 3 – Composição dos meios de cultivo e agrupamentos**(continuação)**

Fase	Grupos	Subgrupos	Fonte de nitrogênio	Fonte de carbono	Outros nutrientes	SIGLA	Meio	Referência
2	Manitol	ManitolIAS	Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (3 g/L)	Manitol (12,5 g/L) Amido solúvel (12,5 g/L)	-	ManitolIAS-25	Meio 67	Este trabalho
2		AS	Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (3 g/L)	Amido solúvel (50 g/L)	-	AS	Meio 22	Este trabalho
2		LAS	Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (3 g/L)	Lactose USP/FCC (25 g/L) Amido solúvel (50 g/L)	-	LAS-75	Meio 68	Este trabalho
2			Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (3 g/L)	Lactose USP/FCC (25 g/L) Amido solúvel (25 g/L)	-	LAS-50	Meio 69	Este trabalho
2			Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (3 g/L)	Lactose USP/FCC (12,5 g/L) Amido solúvel (25 g/L)	-	LAS-37,5	Meio 70	Este trabalho
2			Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (3 g/L)	Lactose Lactose USP/FCC (12,5 g/L) Amido solúvel (12,5 g/L)	-	LAS-25	Meio 71	Este trabalho
2		ManitolLAS	Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (3 g/L)	Manitol (25 g/L) Lactose USP/FCC (25 g/L) Amido solúvel (50 g/L)	-	ManitolLAS-100	Meio 72	Este trabalho
2			Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (3 g/L)	Manitol (20 g/L) Lactose USP/FCC (25 g/L) Amido solúvel (25 g/L)	-	ManitolLAS-70	Meio 73	Este trabalho
2			Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (3 g/L)	Manitol (15 g/L) Lactose USP/FCC (25 g/L) Amido solúvel (25 g/L)	-	ManitolLAS-65	Meio 74	Este trabalho
2			Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (3 g/L)	Manitol (10 g/L) Lactose USP/FCC (25 g/L) Amido solúvel (12,5 g/L)	-	ManitolLAS-47,5	Meio 75	Este trabalho

Quadro 4 – Composição dos meios de cultivo e agrupamentos**(conclusão)**

Fase	Grupos	Subgrupos	Fonte de nitrogênio	Fonte de carbono	Outros nutrientes	SIGLA	Meio	Referência
2	Manitol	ManitoILAS	Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (3 g/L)	Manitol (5 g/L) Lactose USP/FCC (25 g/L) Amido solúvel (12,5 g/L)	-	ManitoILAS-42,5	Meio 76	Este trabalho
2		ManitoIASP	Prodex Lac® (5 g/L) Peptona (3 g/L)	Manitol (25 g/L) Amido solúvel (50 g/L)	-	ManitoIASP-75	Meio 80	Este trabalho
2			Prodex Lac® (5 g/L) Peptona (3 g/L)	Manitol (25 g/L) Amido solúvel (25 g/L)	-	ManitoIASP-50	Meio 84	Este trabalho
2		MP-AS	Prodex Lac® (5 g/L)	Manitol (25 g/L) Amido solúvel (50 g/L)	-	MP-AS-5	Meio 81	Este trabalho
2		MP-AS	Prodex Lac® (10 g/L)	Manitol (25 g/L) Amido solúvel (50 g/L)	-	MP-AS-10	Meio 82	Este trabalho
2	HS-AS-70	HS-AS-70	Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Amido solúvel (50 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HS-AS-70	Meio 78	Este trabalho

Fonte: Elaborada pela autora (2020)

3.2.5 Purificação da membrana de celulose bacteriana

Após o cultivo, as membranas de CB foram lavadas com água destilada e transferidas para uma solução de NaOH 0,1 M a 80 °C por 1 h para dissolução das células bacterianas. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas com água destilada abundantemente por repetidas vezes para remover restos celulares bacterianos e o excesso de NaOH. O processo de lavagem foi finalizado quando o pH da água de lavagem atingiu pH neutro ($6,75 \pm 0,25$) (TEIXEIRA et al., 2019). Posteriormente, as películas foram esterilizadas por 20 min a 121 °C em autoclave e mantidas sob refrigeração a 4 °C para serem utilizadas nos demais procedimentos (STUMPF et al., 2013).

3.2.6 Determinações analíticas

A eficiência da produção da CB foi quantificada após 168 h (7 dias) de cultivo e calculada, bem como a variação do pH durante o cultivo quantificado e avaliado.

3.2.6.1 Análise de pH dos meios de cultivo antes e após a incubação

Os meios de cultivo antes e após a incubação foram submetidos a análise de pH inicial e final em pHmetro de bancada P1000 – Phox.

3.2.6.2 Produção da CB

Para quantificar a celulose, as membranas de CB foram previamente secas em estufa a 60 °C por 24 h. A produção da CB foi calculada utilizando a Equação 1.

$$\text{Produção da CB (g/L)} = \frac{m_{CB}}{V} \quad (1)$$

Onde m_{CB} é a massa seca de CB produzida (g) e V é o volume do cultivo (L).

3.2.7 Estimativa de custo dos meios de cultivo em escala laboratorial

A estimativa de custo dos meios de cultivo com as melhores produção de CB (ManitolAS-75, ManitolAS-50, ManitolAS-37,5, ManitolLAS-100, ManitolLAS-70, ManitolLAS-65, ManitolLAS-47,5 e ManitolLAS-42,5) e o meio de referência HS foi realizada com o intuito de comparar os gastos necessários par elaboração dos meios de cultura. Portanto, foram solicitados orçamentos dos componentes dos meios de cultivo pela empresa Metaquímica no período em junho de 2020. A partir dos valores obtidos foram realizados os cálculos para produção de 1 litro de meio referência HS e dos meios com as melhores produção de CB (CHAGAS, 2018).

3.2.8 Influência do tempo de cultivo na produção de CB

A partir dos resultados obtidos da produção de CB (g/L), definiu-se o meio selecionado com base na maior produção. Portanto, um perfil de cultivo foi avaliado com o meio HS (utilizado como padrão de comparação) e a melhor produção dos ensaios anteriores (meio selecionado). O ensaio da influência do tempo na produção de CB foi conduzido a 30 °C por 15 dias sob condições estáticas e as películas foram coletadas a cada 24 h em triplicata. O perfil de cultivo foi determinado pela produção de CB em base seca (g/L) com intuito de estabelecer o menor tempo possível do cultivo no meio selecionado que fosse equivalente ao meio HS, bem como verificar a diferença significativa em termos de produção em base seca (g/L) desses meios de cultivo durante 15 dias. Ressalta-se que mesmo acompanhando o perfil de síntese do meio HS durante 15 dias, o critério estabelecido para determinar o menor tempo de cultivo do meio selecionado foi que a produção de CB em base seca (g/L) fosse equivalente ou superior ao meio de referência HS cultivado por 11 dias. O tempo estabelecido de 11 dias de incubação para o meio HS teve como base o trabalho de Molin et al. (2019), visto que tal pesquisa teve como objetivo a mesma aplicação deste estudo (curativos).

3.2.9 Preparação das amostras para caracterização

As membranas de CB obtidas nos meios de cultivo otimizados foram analisadas para determinar suas propriedades microestruturais, térmicas e químicas, sendo

previamente secas em estufa a 60 °C/24 h, exceto para a análise de MEV nos quais as películas foram liofilizadas por 24 h.

3.3 Obtenção das membranas curativas (bioativas)

3.3.1 Produção da membrana de celulose bacteriana

A ativação e o inóculo da bactéria foram preparados conforme descrito no item 3.2.1 e 3.2.2. Para a produção das membranas foi utilizado como controle o meio de cultivo padrão HS adaptado de Hestrin e Schramm (1954) e o meio selecionado com o intuito de avaliar como essas membranas iriam se comportar após o tratamento de incorporação dos extratos vegetais frente as diferentes análises de caracterização. Por fim, os meios de cultivos inoculados foram incubados a 30 °C em condição estática durante 5 dias para o meio selecionado e 11 dias para o meio HS para formação das mantas hidratadas de CB.

3.3.2 Purificação das membranas de celulose bacteriana

As membranas de CB foram purificadas com tratamento térmico e alcalino conforme descrito no item 3.2.4. Posteriormente, foram lavadas abundantemente com água destilada por repetidas vezes para remover restos celulares bacterianos e o excesso de NaOH. O processo de lavagem foi finalizado quando o pH da água de lavagem atingiu pH ácido ($4,5 \pm 0,25$), pois de acordo com Pourali et al. (2018), as membranas de CB acidificadas apresentam melhor capacidade curativa. Além disso, conforme os laudos do fabricante (Flora Ervas Comercial LTDA), os extratos também possuem caráter ácido. Dessa forma, manter um pH baixo para as membranas não afetará as propriedades dos extratos.

Após a regulação do pH, as películas foram esterilizadas por 20 min a 121 °C em autoclave e mantidas sob refrigeração a 4 °C para serem utilizadas nos demais procedimentos (STUMPF et al., 2013).

3.3.3 Incorporação dos extratos vegetais

Na primeira etapa, as membranas foram preparadas para receberem os extratos alcoólico. Segundo os laudos dos fabricantes, os extratos foram obtidos por maceração e filtração.

Para facilitar a incorporação dos extratos alcoólicos nas membranas, elas foram mantidas imersas por 24 h em álcool 96%, com trocas contínuas realizadas a fim de garantir a substituição da água pelo etanol (BARUD et al., 2013).

A próxima etapa foi realizar a incorporação dos extratos nas membranas, utilizou como base as metodologias propostas por Sajjad et al (2019) e Sharma e Bhardwaj (2020) com algumas modificações. Portanto, as membranas de CB foram pesadas e cerca de 60% do seu conteúdo de líquido foi drenado com prensagem manual. Posteriormente foi empregada a técnica *ex situ* utilizando o método de impregnação, onde as membranas úmidas foram imersas em 20 mL extratos vegetais e mantidas sob agitação a 150 rpm a 30 °C por 24 h. Após a preparação das membranas curativas (bioativas), o excesso de extrato na superfície da CB foi removido com papel absorvente e foram congeladas e desidratadas utilizando o Liofilizador Terroni LT 1000 por 24 h. Em seguida, foram armazenadas em dessecador para as análises posteriores.

3.4 Caracterização

As membranas CB controle (HS), CB meio selecionado e CB incorporadas com os extratos vegetais foram previamente congeladas (- 80 °C por 24 h) e depois liofilizadas (24 h), exceto quando citado diferente, e então caracterizadas pelas técnicas descritas nos próximos itens.

3.4.1 Caracterização biológica (antimicrobiano)

Para atestar se os extratos fluídos de girassol, urucum, barbatimão, calêndula, picão preto e ipê roxo apresentam atividade antimicrobiana antes de incorporá-los às membranas, estes foram avaliados utilizando as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27583) e Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Estes micro-organismos podem ser

encontrados em feridas diabéticas, por isso foram escolhidos para o teste (AKASH et al., 2020; ARIS et al., 2019).

Para tanto, foi utilizada a técnica de difusão em disco de Kirby et al (1966), os micro-organismos foram pré-cultivados durante a 37 °C por 24 h, em ágar nutriente de acordo com a ATCC®.

Os micro-organismos testados foram diluídos com solução salina estéril, com objetivo de atingir uma densidade equivalente ao padrão de turbidez 0,5 da escala McFarland. Posteriormente, o micro-organismo foi inoculado uniformemente em placas de Petri com o meio Mueller-Hinton (MH). Em seguida, discos de papel filtro estéreis (6 mm de diâmetro) foram imersos nos extratos por cerca de 30 segundos e o excesso de extrato foi removido após a imersão (RAHMAN; RICHARDSON; SOFIAN-AZIRUN, 2010). Os discos foram distribuídos sobre as placas, que por sua vez foram armazenadas em estufa a 37 °C por 24 h para posterior análise dos halos de inibição e quantificação com o uso do paquímetro (TABALL; EMTIAZI, 2016). Todas as experiências foram feitas em triplicata.

As membranas de CB pura e curativas (bioativas) cultivadas em placas de 96 poços (6 mm de diâmetro cada CB) foram esterilizadas durante a noite sob luz UV no fluxo laminar e aplicadas na superfície do ágar MH. Posteriormente, 5 µL de soro fisiológico estéril a 0,85% foi colocado na superfície de cada membrana, que por sua vez foram incubadas e mais tarde foram avaliadas a respeito das suas atividades antimicrobianas da mesma forma que os extratos (BARUD et al., 2013; SHARMA; BHARDWAJ, 2020).

3.4.2 Caracterizações estruturais

3.4.2.1 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 1000 °C a uma taxa de 10 °C/min, sob atmosfera inerte (N₂), para verificar a influência dos meios de cultivos e dos diferentes extratos vegetais na estabilidade térmica da CB, bem como verificar se os extratos vegetais foram incorporados na membrana. Os parâmetros experimentais foram ajustados no software TA – Trios e representados graficamente para interpretação.

3.4.2.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização dos grupamentos funcionais das membranas, extratos vegetais e solventes utilizados na extração foram obtidas por Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR), em equipamento da Perkin Elmer Frontier, no Laboratório de Materiais da Univille. Foram realizadas 32 varreduras por amostra, de 450 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} , no modo de Refletância Total Atenuada (ATR).

3.4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para esta análise as amostras de CB pura (HS e meios alternativos) e CB curativas (bioativas) foram fixadas em um suporte metálico, recobertas com carbono e suas microestruturas foram caracterizadas pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). O equipamento utilizado foi o microscópio MEV-FEG DSM 940A da marca Zeiss com 5 kV de tensão de aceleração no Laboratório de Materiais da UDESC.

3.4.3 Caracterizações químicas

3.4.3.1 Determinação dos compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos estão envolvidos com as propriedades funcionais dos fitoterápicos (MOREIRA et al., 2014). Dessa forma, o teor de compostos fenólicos totais foi avaliado nos extratos antes da incorporação e no extrato residual, para mensurar a quantidade de compostos fenólicos incorporados nas membranas de CB.

Para tanto a concentração de fenólicos totais (CFT) foi determinada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, onde 40 μL de extrato (ou padrão de ácido gálico, para a curva de calibração) foi adicionado em 3,2 mL de água destilada e 200 μL do reagente de Folin-Ciocalteu. A mistura foi levemente agitada e deixada no escuro por 5 min em um tubo Falcon de 15 mL. Após, foi adicionada 600 μL de uma solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3), a solução foi agitada em vortex e deixada no escuro a temperatura ambiente por 1 h. Por fim, as amostras foram transferidas para cubetas e suas absorbâncias foram medidas utilizando um espectrofotômetro, com um comprimento de onda (λ) de 765 nm. Os teores de fenólicos

totais foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EQG) por g de amostra seca (mg EAG/g), sendo determinados pela equação da reta da curva de calibração e Equação 2. O branco foi elaborado da mesma forma, apenas substituindo o extrato por água destilada (PHUYAL et al., 2020; SOUZA, 2013; WATERHOUSE, 2002).

$$C_f = \frac{C_{AG}}{\rho} \quad (2)$$

Onde C_f é concentração de fenólicos totais em mg EAG/g extrato seco. C_{AG} é a concentração de ácido gálico obtido pela curva de calibração em mg/mL e ρ é a densidade dos extratos em g/mL.

Para quantificar os compostos fenólicos das amostras, a curva de calibração foi elaborada com um padrão de ácido gálico. A solução padrão foi feita diluindo 0,5 g de ácido gálico em 10 mL de etanol PA em um balão volumétrico de 100 mL, o volume foi completado com água destilada, resultando em uma concentração final de 5 g/L. Para as diferentes concentrações da curva, a solução foi diluída para 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 mg/mL. Assim, elaborou-se a curva de calibração utilizando-se as absorbâncias em função das concentrações conhecidas (SOUZA, 2013; WATERHOUSE, 2002).

3.4.4 Análise estatística

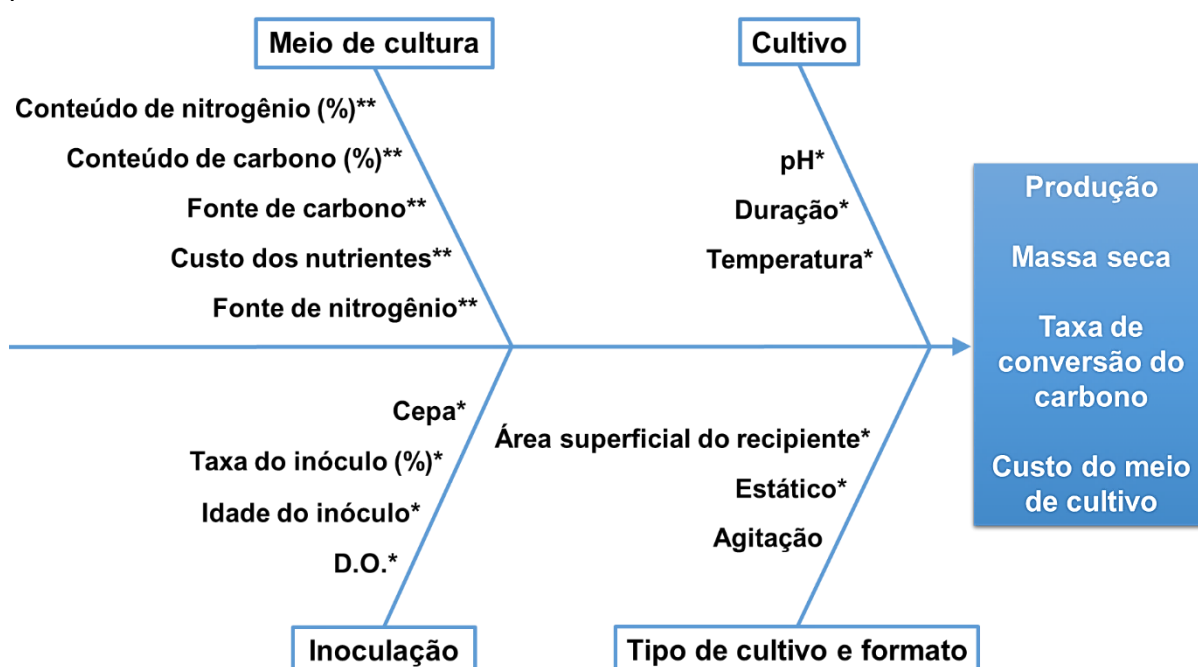
Com exceção das análises de MEV, TGA, FTIR e estimativa de custos do meio de cultivo, todos os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey com 95% ($p < 0,05$) de confiança por meio do software Minitab 17 ou pelo software Microsoft Excel (análise dos CFT) para possíveis valores próximos de CFT entre os extratos e com nível de significância p utilizado foi de 5% ($p \leq 0,05$). Os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão e a diferença significativa nos resultados foram representadas pelas diferentes letras no gráfico.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Produção da CB

A primeira análise do estudo, envolveu delimitar os parâmetros de processos que poderiam afetar significativamente a produção da CB. Na Figura 10 podem ser visualizados os fatores mais importantes que afetam o desempenho geral e a relação custo-benefício da produção e dentre eles destacam-se: (a) cepas eficientes que não sofrem mutações ao longo do tempo; (b) meios nutricionais baseados em fontes de baixo custo de carbono e nitrogênio, sendo esse item um dos critérios mais relevantes, pois, como a celulose é um polímero de carboidrato, o tipo de fonte de carbono é considerado um dos parâmetros mais importantes que afetam os rendimentos da CB; e (c) processos de cultivo eficientes em larga escala (BASU; VADANAN; LIM, 2019; CZAJA et al., 2006). Dentre todos os parâmetros elencados, delimitou-se a composição do meio de cultura, pH, temperatura, duração do cultivo, inóculo, tipo de cultivo e formato como parâmetros mais significativos e importantes para aprofundar o estudo (BASU; VADANAN; LIM, 2019; FARRAG et al., 2019; HUTCHENS et al., 2007).

Figura 10 – Diagrama de Ishikawa mostrando os diferentes parâmetros que podem afetar significativamente os resultados do processo de produção da CB. Fatores marcados com * e ** foram considerados para o estudo de otimização, sendo parâmetros fixos e variáveis, respectivamente



Fonte: Adaptado de Basu et al. (2019).

A condição de cultura estática foi usada nesse estudo em virtude de vários trabalhos relatarem melhores rendimentos em comparação com a cultura agitada em função de não gerar mutantes não produtores de celulose e produzir uma CB com propriedades e formatos adequados para a área médica (BRANDES et al., 2017; JONAS; FARAH, 1998; SHAH et al., 2013; SHARMA; BHARDWAJ, 2019b). Como parâmetros fixos do estudo estão o pH inicial (6,5), temperatura (30 °C) e os fatores relacionados ao inóculo em virtude de serem os parâmetros ótimos de crescimento (JUNG et al., 2010; RANGASWAMY; VANITHA; HUNGUND, 2015; SON et al., 2001; VELÁSQUEZ-RIAÑO; BOJACÁ, 2017). Outro parâmetro fixo no presente estudo, foi o tempo de cultivo utilizado de 7 dias, exceto para o estudo do perfil de cultivo envolvendo o meio HS e o meio otimizado para definir o melhor tempo de cultivo.

Ao término desse tempo de cultivo, os nutrientes do meio e a variação de pH final são fatores importantes a serem analisados, pois durante a síntese da CB as bactérias convertem os componentes dos meios em celulose e/ ou utilizam para síntese de metabólitos, como por exemplo a produção de ácidos orgânicos (glucônico, acético ou láctico) que resultam na diminuição do pH, já que se trata de uma bactéria do ácido acético (CHAGAS, 2018; CHEN et al., 2019a; HUTCHENS et al., 2007; RAGHUNATHAN, 2013). Logo, determinar o pH ideal do meio de cultura considerando que com o tempo de cultivo e as reações metabólicas o pH se altera, se torna importante para obtenção de uma maior produção de CB. A faixa de pH onde ocorre a produção da celulose situa-se entre 4,5 e 7,5, enquanto em ambientes muito ácidos com pH menores que 3,5 a CB é inibida e o intervalo que o pH é ótimo para produção da CB acontece em 6,5 (JUNG et al., 2010; SON et al., 2001). Uma das alternativas para ter pouca mudança do pH durante a síntese da CB foi realizar testes com meios tamponados para alcançar o maior rendimento possível, a exemplo do meio HS (HESTRIN; SCHRAMM, 1954) que são meios com a adição de ácido cítrico e fosfato de sódio, que evitam a oscilação do pH e consequentemente o excesso de ácidos orgânicos.

Na primeira fase desse estudo, foram testados 20 meios de cultivo, dos quais 5 se apresentaram como mais eficientes para produzir celulose em comparação ao meio controle (HS), portanto, eles foram divididos em 3 grandes grupos para serem discutidos: MF (MF-25 e MF-35), PHS (PHS) e Manitol (Manitol e ManitolAS-75).

O grupo MF com suplementação de milhocina e frutose (MF-25, MF-105, MF-35 e MF-115), foram otimizados com as menores concentrações de substratos (MF-

25 e MF-35), demonstrando que o excesso de concentração dos dois nutrientes, principalmente do açúcar, não foi assimilado de forma positiva pela bactéria, levando a uma baixa produção de CB nos meios mais concentrados (MF-105 e MF-115) com $0,4 \pm 0,0$ e $0,5 \pm 0,09$ g/L de CB, respectivamente (dados mostrados no Apêndice A). Isso pode ser explicado, pois a biossíntese da CB depende de duas vias, a via das pentoses (a glicólise é inviabilizada pela ausência de fosfofruto-quinase) e o ciclo de Krebs. Na primeira ocorre a oxidação dos carboidratos e, no ciclo de Krebs, ocorre a oxidação dos ácidos orgânicos (DONINI et al., 2010; LEE et al., 2014; MONA et al., 2019; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; SOUZA, 2014). Dessa forma, a frutose é diretamente metabolizada e transformada em frutose-6-fosfato e, posteriormente, é isomerizada para glicose-6-fosfato pela enzima fosfoglicose isomerase e a partir desse ponto a via metabólica para produção de CB segue o mesmo caminho da síntese do biopolímero utilizando a glicose (CHAGAS, 2018). Portanto, no caso do uso da glicose, a bactéria o consome rapidamente e converte em ácido glucônico, o qual se acumula no sistema e em excesso, causa a diminuição do pH e a produção da CB é prejudicada (CHEN et al., 2019a; GULLO et al., 2017; HUTCHENS et al., 2007; MASAOKA; OHE; SAKOTA, 1993; SCHRAMM; GROMET; HESTRIN, 1957). Isto posto, a tentativa de aumentar a concentração de frutose para atingir uma concentração de CB superior não foi satisfatória porque a quantidade em excesso de frutose foi convertida em ácidos orgânicos, acontecendo o mesmo mecanismo que acontece com a glicose, como foi observado no meio ManitolG (dados mostrados no Apêndice A), fato este comprovado pela diminuição do pH para $4,28 \pm 0,05 \rightarrow 3,62 \pm 0,02$ (MF-25 e MF-105, respectivamente) e $5,92 \pm 0,17 \rightarrow 4,27 \pm 0,07$ (MF-35 e MF-115, respectivamente) quando aumentou-se a concentração de frutose de 20 g/L para 100 g/L. Por outro lado, a baixa concentração de frutose associada à milho-cina (MF-25 e MF-35) atingiu bons resultados, produzindo $0,6 \pm 0,00$ e $0,67 \pm 0,09$ g/L do polímero, respectivamente, corroborando com a literatura que afirma que esses substratos favorecem o aumento da produção de CB (CACICEDO et al., 2016; COSTA et al., 2017; EL-SAIED et al., 2008; FONTANA et al., 1997; LIMA et al., 2017; NGUYEN et al., 2008; SANTOS; CARBAJO; VILLAR, 2013; TURECK, 2017; VAZQUEZ et al., 2013). Porém, apesar dos resultados positivos, esse grupo não apresentou diferença significativa quando comparada ao meio de referência HS.

No que tange o grupo PHS (PHS), esse meio de cultivo foi formulado a partir da modificação do meio de referência HS, substituindo as fontes de nitrogênio tradi-

cionais (extrato de levedura purificado e peptona) pela fonte de nitrogênio de baixo custo Prodex Lac®, o qual é um extrato de levedura bruto. Essa alteração teve como objetivo investigar se o emprego somente desse substrato poderia suprir as necessidades de nitrogênio do micro-organismo e contribuir para a redução dos custos da produção da CB. Portanto, o resultado alcançado com a suplementação de Prodex Lac® como única fonte de nitrogênio no cultivo foi positivo, atingindo uma produção de $0,87 \pm 0,25$ g/L, sendo superior ao meio padrão ($0,6 \pm 0,16$ g/L), demonstrando que somente o uso de Prodex Lac® forneceu a quantidade nutricional de nitrogênio necessária para o micro-organismo produzir a celulose, não necessitando da suplementação adicional de peptona. Na literatura foi encontrado apenas um estudo envolvendo a biossíntese da CB com Prodex Lac® (TURECK, 2017). Nessa pesquisa, o bom desempenho desse substrato para o aumento da produção de CB é justificado por proporcionar um meio de cultura mais rico em nitrogênio, já que se trata de um extrato de levedura bruto, tais resultados estão de acordo com os nossos achados. Similarmente, o Prodex Lac® é reportado em vários estudos envolvendo diferentes tipos de cultivo para obtenção de outros produtos biotecnológicos, como exemplo a produção de enzimas por *Kluyveromyces marxianus* e *Penicillium echinulatum*, tais estudos concluíram que essa fonte de nitrogênio favoreceu uma boa atividade enzimática e redução de custos, além de estimular o crescimento celular, tornando o seu uso bastante promissor (FURLAN et al., 2000; MANERA et al., 2011; MICHALSKI et al., 2008).

O último grupo dessa primeira fase é o Manitol (Manitol e ManitolAS-75), esses meios de cultivo apresentam como característica a presença do manitol como fonte de carbono. Esse substrato tem sido amplamente usado na produção desse biopolímero por permitir converter uma maior quantidade de CB, esse aumento é explicado em função da produção de ácido glucônico como subproduto nesta via ser menor, uma vez que o manitol é convertido em frutose e posteriormente em glicose na sua rota metabólica, já quando a síntese começa com a glicose, a bactéria oxida esse substrato diretamente na forma de ácido glucônico (gluconato) através da glicose desidrogenase e durante todo o cultivo mantém essa produção de metabolitos secundários (CHAWLA et al., 2009; DONINI, 2011; GULLO et al., 2019; HUTCHENS et al., 2007; MIKKELSEN et al., 2009; MOHAMMADKAZEMI; AZIN; ASHORI, 2015; NGUYEN et al., 2008; OIKAWA; OHTORI; AMEYAMA, 1995; RUKA; SIMON; DEAN,

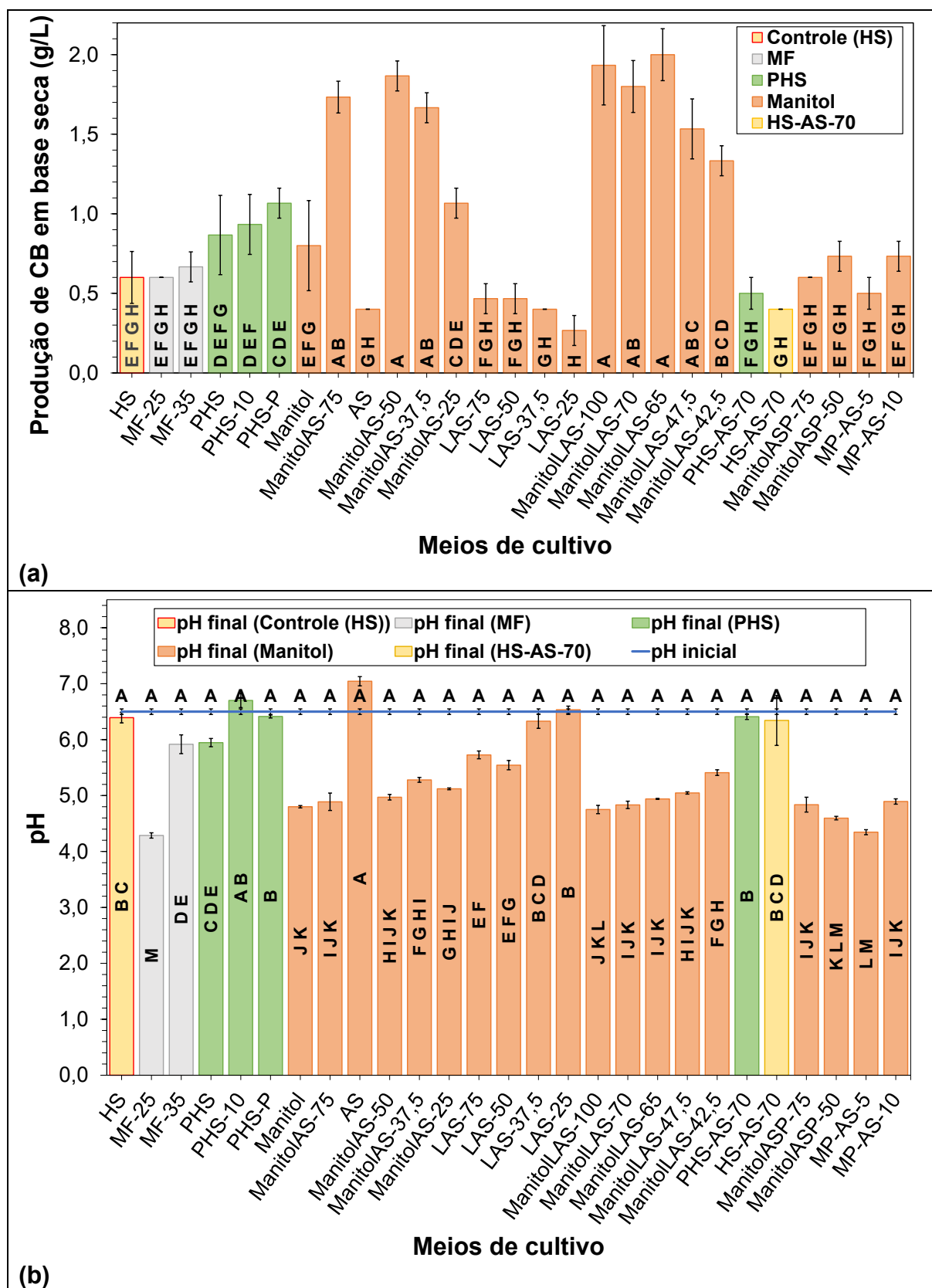
2012; SOUZA; CASTRO; PORTO, 2018; TURECK, 2017). Ressalta-se ainda que o meio denominado manitol, vem sendo citado em muitos estudos como outro meio padrão de referência, já que segundo a ficha ATCC® da *K. hansenii* (23769™), o meio manitol é usado como meio de cultura de manutenção dessa cepa. Essa atribuição de meio ideal para essa bactéria foi comprovada em nosso estudo, onde o meio manitol obteve uma produção 33% maior que o meio HS. Do mesmo modo, quando o meio manitol estava enriquecido com amido solúvel foi possível obter uma produção de 188 e 116% maior em meio ManitolAS-75 se comparado ao meio HS e Manitol, respectivamente, além de ser estatisticamente diferente. Esse resultado demonstra a melhora na produção da CB envolvendo o amido, porém, ainda não está claro na literatura sobre o papel desse substrato na síntese da CB, alguns autores elucidaram que a inserção *in situ* de amido no meio de cultivo não é consumido pelas bactérias do gênero *Komagataeibacter* e leva a produção de um compósito, criando uma rede com dupla estrutura em função das fibras de CB crescerem junto com o amido (GRANDE et al., 2009; YANG et al., 2014). Porém, para este trabalho, essas afirmações ainda precisam ser confirmadas por análises de MEV, visto que a concentração e tipo de amido, condições de cultivo e bactéria foram diferentes. Grande e colaboradores (2009) relataram que durante a preparação do meio de cultivo a partir de diferentes amido (batata e milho) de qualidade alimentar, ele é autoclavado a 121 °C e durante esse processo a fase de amido passa por uma “primeira gelatinização”, onde os grânulos de amido incham e se dissolvem com a temperatura, lixiviam amilose e perdem sua estrutura cristalina pelo derretimento de suas regiões ordenadas, formando uma rede de solução/gelatinização composta por amilose linear e amilopectina altamente ramificada, então após a esterilização as bactérias são inoculadas e a rede de nanofibras é formada na presença de uma estrutura de amido parcialmente gelatinizada.

Como conclusão dessa primeira fase, os 5 melhores meios de cultivo que converteram uma maior quantidade de celulose foram (em ordem de menor produção para a maior): MF-25, MF-35, Manitol, PHS e ManitolAS-75, produzindo entre 0,6 a 1,7 g/L de CB em base seca, com destaque para o meio ManitolAS-75. Vale ressaltar que os valores de pH dos meios se enquadram na faixa de pH onde ocorre

a produção da CB e com as quatro melhores produções com o pH final acima de 4,8 (Manitol, ManitolAS-75, MF-35 e PHS, respectivamente).

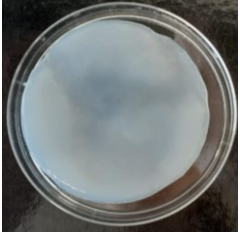
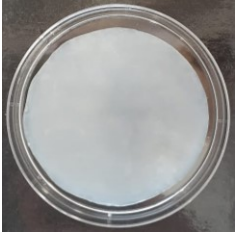
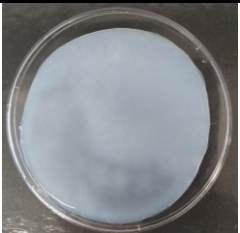
Na Figura 11 são mostrados os resultados alcançados nas fases 1 e 2 e na Figura 12 são apresentadas as imagens das amostras produzidas após a purificação em meio de cultivo HS e nos meios de cultivos com melhores resultados de produção evidenciando os seus aspectos físicos.

Figura 11 – Gráficos do estudo dos diferentes meios de cultivo: (a) produção de CB em base seca (g/L) e (b) do pH inicial e pH final. *Letras não compartilhadas no gráfico representam valores com diferença significativa pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$)



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Figura 12 – Aspectos físicos das membranas de celulose úmida produzidas em meio de cultivo (a) HS, grupo ManitolAS (b) -37,5, (c) -50 e (d) -75 e grupo ManitolLAS (e) -42,5, (f) -47,5, (g) -65, (h) -70 e (i) -100

Controle (HS)	ManitolAS-37,5	ManitolLAS-42,5
		
(a)	(b)	(e)
	ManitolAS-50	ManitolLAS-47,5
		
	(c)	(f)
	ManitolAS-75	ManitolLAS-65
		
	(d)	(g)
		ManitolLAS-70
		
		(h)
		ManitolLAS-100
		
		(i)

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

A fase 2 do estudo de produção englobou otimizar os resultados alcançados na fase 1, para aprofundar os estudos foram selecionados os grupos PHS e Manitol. Para o grupo Manitol, apesar do meio ManitolAS-75 ter atingido uma ótima produção de CB, ele apresentava uma alta concentração de açúcar, o que eleva o seu custo e também poderia causar a presença de compostos inibitórios e reduzir o suprimento de oxigênio pelo meio líquido (ABDELRAOF; HASANIN; EL-SAIED, 2019; SHARMA; BHARDWAJ, 2019a). Pensando nessa hipótese, realizou-se ensaios com concentrações menores de amido solúvel e manitol, bem como o enriquecimento do meio com lactose e Prodex Lac®, além de testar os substratos separadamente. Portanto, para o grupo Manitol foram adicionados novos subgrupos: ManitolAS (ManitolAS-50, ManitolAS-37,5, ManitolAS-25), ManitolASP (ManitolASP-75 e ManitolASP-50), AS (AS) e MP-AS (MP-AS-5 e MP-AS-10), ManitolLAS (ManitolLAS-100, ManitolLAS-70, ManitolLAS-65, ManitolLAS-47,5 e ManitolLAS-42,5) e LAS (LAS-75, LAS-50, LAS-37,5 e LAS-25). Para o grupo PHS a tentativa foi testar outras concentrações de Prodex Lac®, além da adição de peptona e amido solúvel. Logo, os novos subgrupos criados foram PHS (PHS-10), PHS-P (PHS-P) e PHS-AS-70 (PHS-AS-70). E por último, foi elaborado o grupo HS-AS-70 (HS-AS-70), com o intuito de melhorar os resultados do HS com a adição do amido solúvel.

Conforme visualizado na Figura 11, de um modo geral os resultados foram positivos. Para o grupo Manitol a diminuição do amido solúvel exerceu efeito positivo no meio ManitolAS-50, apesar das outras concentrações terem uma diminuição na produção quando comparadas ao ManitolAS-75. Salienta-se ainda que todos os resultados desse grupo produziram mais celulose que o meio HS, porém, somente até o meio ManitolAS-37,5 houve diferença significativa, com nível de 95% de confiança.

Amido solúvel, lactose e manitol foram os açúcares que produziram maiores quantidades de celulose quando usados juntos, independentemente da composição dos meios, indicando que eles devem ser usados ao tentar obter grandes quantidades de CB. Essas amostras estão identificadas como ManitolLAS, com a maior produção observada para o meio ManitolLAS-65, seguida dos meios ManitolLAS-100, ManitolLAS-70, ManitolLAS-47,5 e ManitolLAS-42,5, sendo todos significativamente diferente do meio HS. Como a produção de celulose é, aproximadamente, proporcional ao crescimento celular, isso sugere que os açúcares manitol, lactose e amido

solúvel favoreceram o crescimento microbiano e a produção da CB (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

Outros estudos obtiveram sucesso também utilizando o amido, pesquisadores avaliaram a síntese da CB a partir da *K. xylinus* (ATCC 10.245) usando o hidrolisado de resíduos de casca de batata como meio de cultura sem suplementação adicional com pH 6 durante 4 dias de cultivo estático a 30 °C e investigaram o seu efeito nas propriedades da CB (ABDELRAOF; HASANIN; EL-SAIED, 2019). Dentre os resultados alcançados pelos autores destaca-se que os meios de cultivo com o hidrolisado de resíduos de casca de batata alcançaram uma produção de CB 2,2 vezes maior que o meio HS, pouca variação do pH inicial e final e uma melhor estabilidade térmica, corroborando com os nossos estudos. Outros resultados satisfatórios foram encontrados na literatura empregando diferentes tipos de amido na biossíntese da CB em diferentes condições de cultura (pH, tempo de cultivo, cepas, meio de cultivo) (BÄCKDAHL et al., 2008; HESSLER; KLEMM, 2009; YANG et al., 2014). Além disso, outras investigações também encontraram efeitos sinérgicos positivo da mistura de mais de uma fonte de açúcar no mesmo meio de cultivo (frutose + glicose) em comparação do uso dessas fontes separadas, confirmando que o uso de associações de açúcares é benéfico para a produção da CB (COIMBRA, 2016; YANG et al., 1998).

Por outro lado, quando o amido solúvel foi utilizado como uma única fonte de carbono e posteriormente associado com a lactose, obteve-se quantidades baixas do polímero no nosso estudo. Esse resultado está de acordo com outros trabalhos (RAMANA; TOMAR; SINGH, 2000; RANGASWAMY; VANITHA; HUNGUND, 2015; TABAI; EMTIAZI, 2016). Por exemplo, Ramana e colaboradores (2000) estudaram a síntese da CB utilizando diferentes substratos e relataram que entre as fontes de carbono utilizadas, a lactose, galactose, sorbitol, ácido cítrico, amido e maltose produziram baixas quantidades de celulose a partir de *K. xylinus*.

Outro estudo investigou diferentes fontes de carbono utilizando *K. sp.* RV28 isolada da fruta de romã em decomposição e as menores produções de CB alcançadas pelos autores foram com o uso da lactose e da maltose (RANGASWAMY; VANITHA; HUNGUND, 2015), corroborando com o estudo anterior (RAMANA; TOMAR; SINGH, 2000). Uma explicação para a baixa produção de CB utilizando lactose pode ser atribuída ao fato de que as espécies do gênero *Komagataeibacter*

não possuem o gene que codifica a β -galactosidase, a enzima responsável pela hidrólise da lactose, porém, uma grande quantidade de celulose pode ser obtida realizando modificação genética da *Komagataeibacter* e inserindo o gene lacZ (BATTAD-BERNARDO et al., 2004). Essa explicação está de acordo com outro estudo, onde os autores atingiram rendimentos baixos usando lactose e amido associados a *K. xylinus* e relataram que uma das explicações é que seria necessário realizar uma hidrólise preliminar para que a polimerização pudesse ocorrer com esses carboidratos, sendo outra possibilidade para poder trabalhar com esses substratos sem optar pela modificação genética (MASAOKA; OHE; SAKOTA, 1993; TARR; HIBBERT, 1931).

Os melhores meios de cultivo que converteram uma maior quantidade de celulose foram (em ordem de maior produção para a menor): ManitolLAS-65, ManitolLAS-100, ManitolAS-50, ManitolLAS-70, ManitolAS-75, ManitolAS-37,5, ManitolLAS-47,5 e ManitolLAS-42,5, com destaque para o meio ManitolLAS-65, atingindo uma produção 233% maior que o meio HS, acrescenta-se ainda que todos esses meios de cultivo tiveram diferença significativa em comparação ao meio HS. O pH ao final do cultivo foi inferior ao pH inicial, indicando que houve produção de ácido orgânicos durante a síntese da CB, porém, todos os pHs se enquadravam na faixa onde ocorre a produção de CB (acima de 4,5). Nos meios alternativos, os valores de pH foram menores conforme aumentou-se a concentração dos açúcares, atingindo o menor pH em 4,7, enquanto no meio HS o pH final foi $6,39 \pm 0,09$. Essa baixa variação do pH é explicada pelo uso de solução tampão no meio de cultivo.

Em contrapartida, os demais meios de cultivo tiveram uma produção de CB mais baixa. Essa diminuição na produção da celulose pode estar associada a menor taxa de crescimento específico da bactéria (DAYAL et al., 2013). Isso implica que mais metabólitos inibidores possam ter sido formados com concentrações de açúcares acima do ideal e isso dificultou o crescimento de micro-organismos levando à diminuição da formação de CB. Logo, quando o excesso de nutrientes é fornecido aos micro-organismos, os subprodutos inibitórios se acumulam e suprimem o crescimento de micro-organismos nos meios e diminuem a geração de CB, portanto, definir uma concentração ideal de açúcar para o meio é importante, pois, menores produtos inibitórios metabólicos se desenvolvem durante o cultivo (SHARMA;

BHARDWAJ, 2019a; SOUZA et al., 2019). Por outro lado, alguns meios de cultivo apresentavam concentrações baixas de nutrientes para a bactéria, o que dificultou o crescimento celular e consequentemente a produção do polímero (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

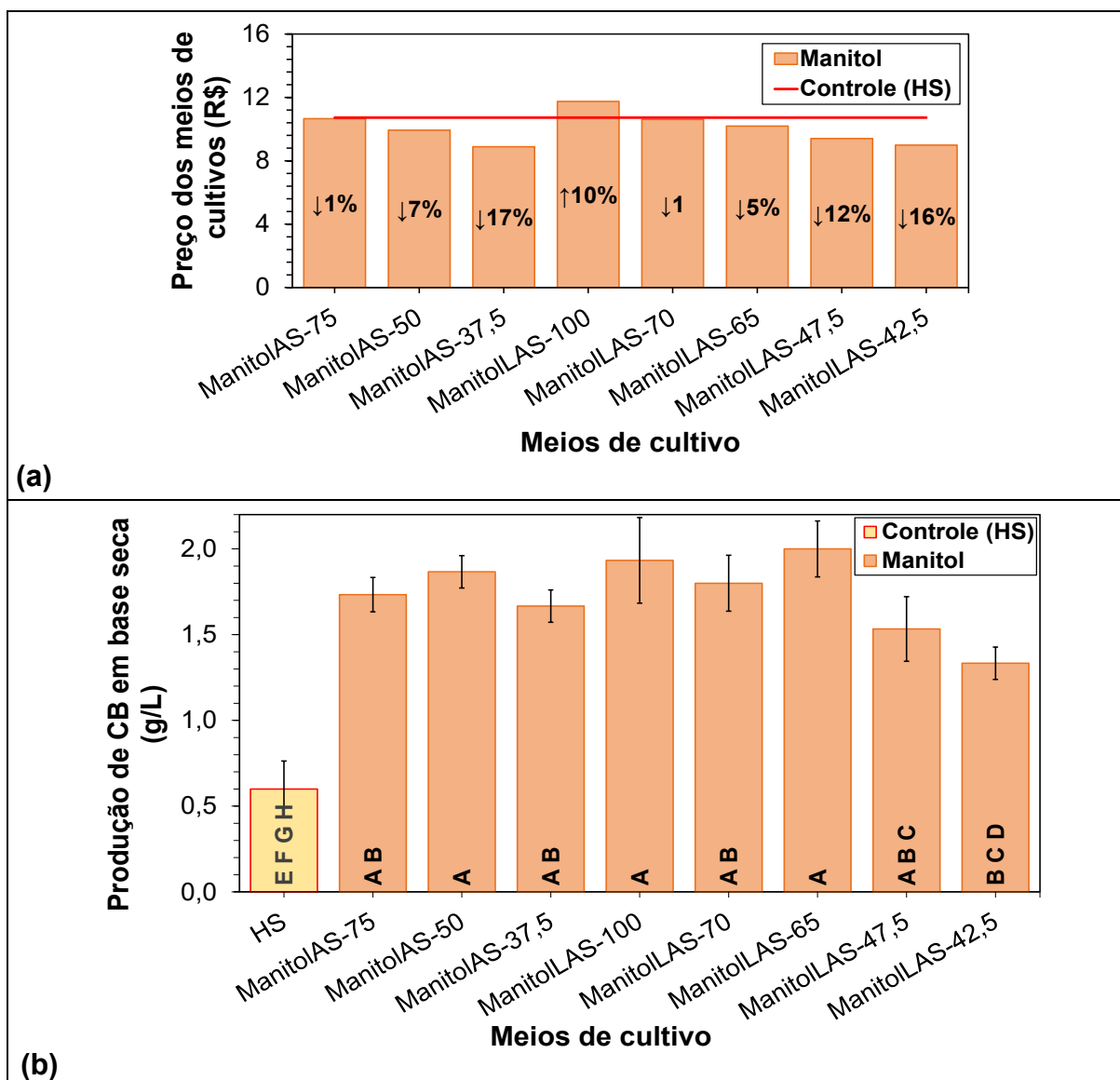
Além disso, em outros estudos da produção de CB utilizando diferentes substratos, porém, com a mesma cepa e tempo de cultivo, os autores atingiram produções inferiores as alcançadas neste estudo, evidenciando que os resultados obtidos foram satisfatórios (FANG; CATCHMARK, 2015; GOTTSCHALK et al., 2014; LIMA et al., 2017; NASCIMENTO, 2014; TURECK, 2017).

Por fim, esses achados são significativos para a melhoria contínua da síntese de celulose pelo *K. hansenii* (ATCC 23769) com implicações futuras da bioengenharia na produção de celulose em escala industrial.

4.1.1 Estimativa de custo dos meios de cultivo em escala laboratorial

Para viabilizar economicamente o processo, é importante não apenas o aumento da produtividade, mas também a redução de custos das matérias-primas (CAMPANO et al., 2016). Nesse sentido, sabendo que o principal limitante para a produção da CB é o alto custo do meio de cultivo padrão (HS), foi investigado o uso de outras fontes de nutrientes juntamente com os preços, visando reduzir os impactos financeiros relacionados a produção desse polímero para ser possível viabilizar o seu uso comercialmente. A Figura 13 ilustra a comparação da estimativa dos custos relacionados aos meios de cultivo entre o meio padrão HS e os meios otimizados (ManitolAS-75/50/37,5 e ManitolLAS-100/70/65/47,5/42,5) versus a produção das membranas obtidas.

Figura 13 – Estimativa de custo para obtenção de 1 L do meio HS e dos meios de cultivo otimizados (a) e produção em base seca dessas membranas (b). *Letras não compartilhadas no gráfico representam valores com diferença significativa pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$)



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Conforme visualizado na Figura 13, os meios de cultivo ManitolAS-75/50/37,5, ManitolLAS-70/65/47,5/42,5 mostraram-se viáveis economicamente em escala laboratorial, sendo 1, 7, 17, 1, 5, 12 e 16% mais baratos que o meio HS e em termos de produção alcançaram 188, 212, 178, 200, 233, 155 e 122% mais celulose do que a sintetizada no meio de referência, respectivamente. Logo, o emprego de amido solúvel e lactose tornaram o meio de cultivo mais barato, por serem substratos de baixo custo, essa redução do preço do meio de cultivo é de extrema relevância para tornar possível industrialmente o uso da CB. Além disso, esses substratos forneceram uma

grande quantidade de celulose em comparação ao meio padrão HS, principalmente para o meio ManitolLAS-65, o qual, portanto, se tornou mais promissor para a produção desse biopolímero e economicamente mais barato que o meio de referência, já que o custo (R\$/g de CB) foi de 5,1 e 17,9 para o meio ManitolLAS-65 e HS, respectivamente, apresentando 71% na redução do custo (R\$/g de CB).

Em virtude disso, o meio ManitolLAS-65 pode ser uma alternativa ao uso do meio HS, porém, salienta-se que também é possível utilizar os meios ManitolAS-50/37,5 e ManitolLAS-47,5 já que ambos os meios não tiveram diferença significativa em termos de produção, são mais baratos e alcançaram uma redução em cerca de 70% no custo (R\$/g de CB), tornando-se, portanto opções válidas também em termos de produção e custo, porém, faz-se necessário analisar se as propriedades estruturais estão adequadas para a aplicação desejada.

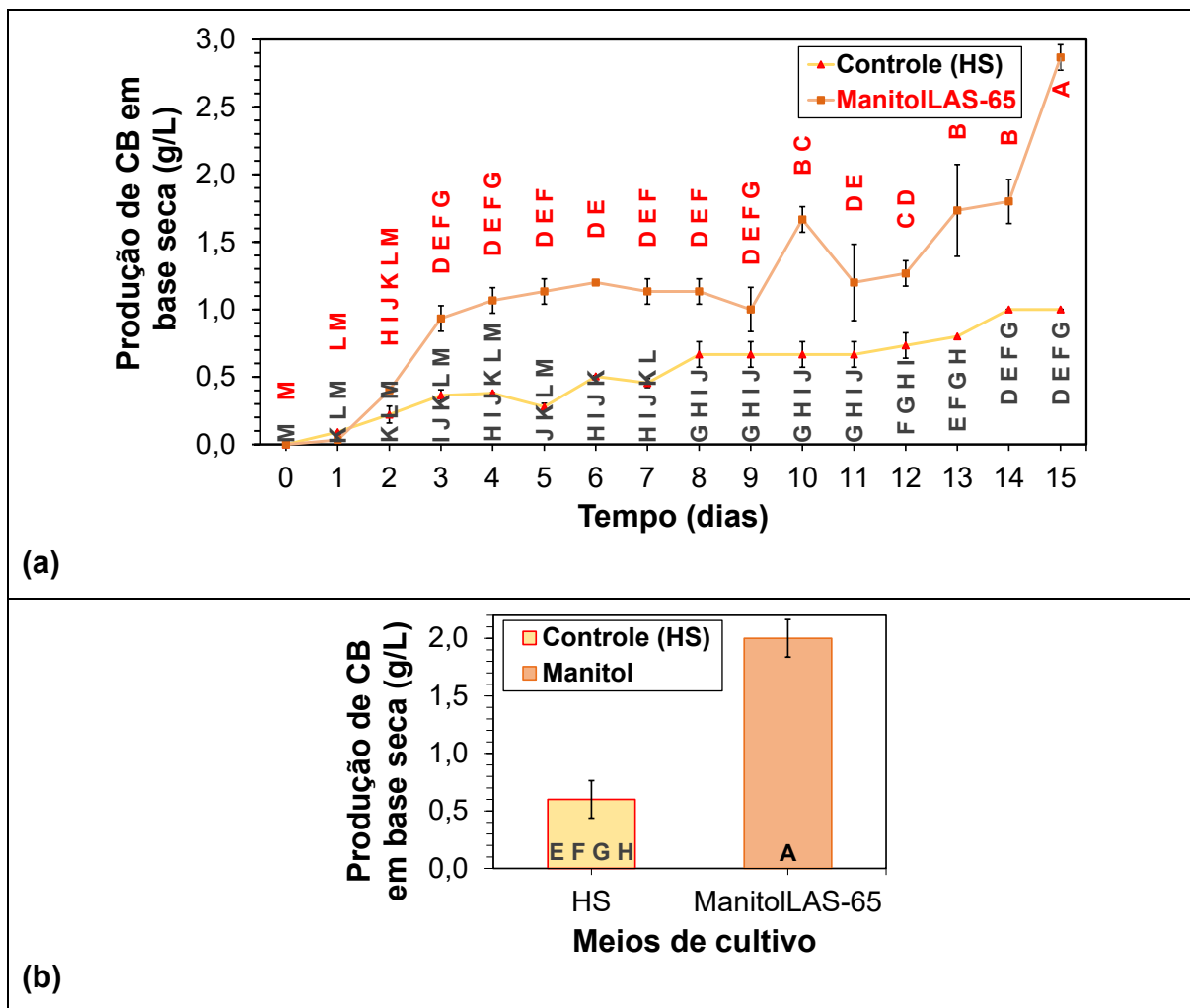
Além disso, no que tange o uso do amido, outra possibilidade para gerar mais economia para o processo e ter o custo zero desse substrato é avaliar a sua substituição por resíduo de casca de legumes, como por exemplo a casca da batata, o qual é descartada em grande quantidade todos os anos após o processamento industrial e ainda apresenta um valor expressivo de amido e de açúcares fermentáveis, sendo vantajoso para diversos processos biotecnológicos, além de reduzir o impacto ambiental causado pelo seu acúmulo no meio ambiente (ABDELRAOF; HASANIN; EL-SAIED, 2019). Nesse sentido, pesquisadores avaliaram a síntese da CB a partir da *K. xylinus* (ATCC 10.245) usando o hidrolisado de resíduos de casca de batata como meio de cultura sem suplementação adicional com pH 6 durante 4 dias de cultivo estático a 30 °C e investigaram o seu efeito nas propriedades da CB, dentre os resultados alcançados pelos autores destaca-se que os meios de cultivo com o hidrolisado de resíduos de casca de batata alcançaram uma produção de CB 2,2 vezes maior que o meio HS, pouca variação do pH inicial e final e uma melhor estabilidade térmica, corroborando com os nossos estudos (ABDELRAOF; HASANIN; EL-SAIED, 2019). Outros resultados satisfatórios foram encontrados na literatura empregando diferentes tipos de amido na biossíntese da CB em diferentes condições de cultura (pH, tempo de cultivo, cepas, meio de cultivo) (BÄCKDAHL et al., 2008; HESSLER; KLEMM, 2009; YANG et al., 2014).

Por fim, considerando que baixos custos para um bioprocessos são importantes para aplicação industrial, esse fato foi atingido nesse estudo (FURLAN et al., 2000).

4.1.2 Perfil de cultivo da biossíntese da CB dos meios HS e ManitolLAS-65

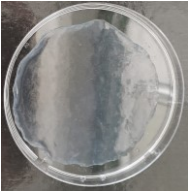
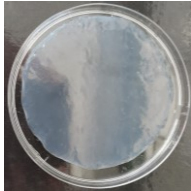
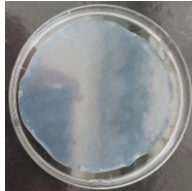
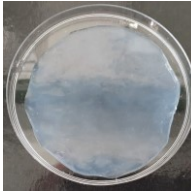
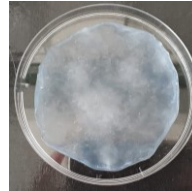
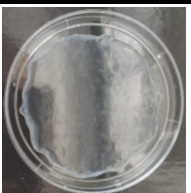
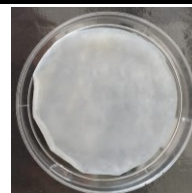
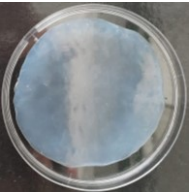
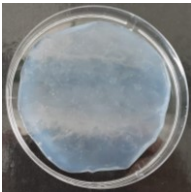
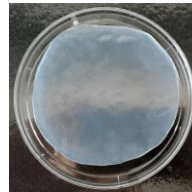
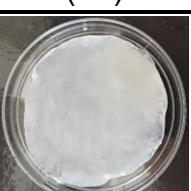
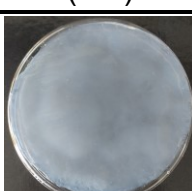
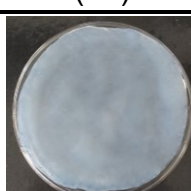
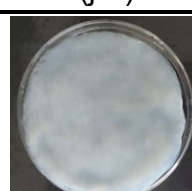
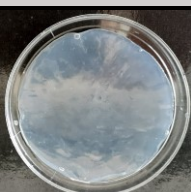
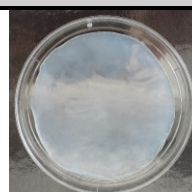
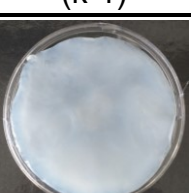
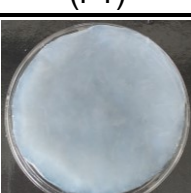
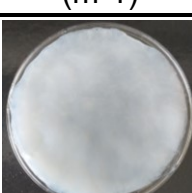
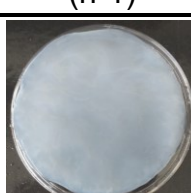
Outro critério para produzir esse polissacarídeo em larga escala, é que as condições de cultura devem ser otimizadas para produzir o máximo de celulose no menor tempo possível e com o custo mais econômico (HUTCHENS et al., 2007). Nesse sentido, o meio ManitolLAS-65 foi selecionado para comparar a sua cinética de produção com o meio HS, com o objetivo de verificar o melhor tempo de cultivo. Na Figura 14 são apresentadas a produção da CB em base seca (g/L) desses meios em diferentes tempos de cultivo e na Figura 15 suas imagens após a purificação evidenciando os seus aspectos físicos.

Figura 14 – Cinética de produção da CB por *K. hansenii* do meio HS e ManitolLAS-65 a 30 °C sob condição estática durante 15 dias (a) e em 7 dias de cultivo (b). *Letras não compartilhadas no gráfico representam valores com diferença significativa pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$)



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Figura 15 – Aspectos físicos das membranas de celulose úmida produzidas nos meios de cultivo HS (letras com final 1) e ManitoLAS-65 (letras com final 2) nos diferentes tempos de cultivo: (a) 1 dia, (b) 2 dias, (c) 3 dias, (d) 4 dias, (e) 5 dias, (f) 6 dias, (g) 7 dias, (h) 8 dias, (i) 9 dias, (j) 10 dias, (k) 11 dias, (l) 12 dias, (m) 13 dias, (n) 14 dias e (o) 15 dias

	1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias
HS					
	(a-1)	(b-1)	(c-1)	(d-1)	(e-1)
ManitoLAS-65					
	(a-2)	(b-2)	(c-2)	(d-2)	(e-2)
	6 dias	7 dias	8 dias	9 dias	10 dias
HS					
	(f-1)	(g-1)	(h-1)	(i-1)	(j-1)
ManitoLAS-65					
	(f-2)	(g-2)	(h-2)	(i-2)	(j-2)
	11 dias	12 dias	13 dias	14 dias	15 dias
HS					
	(k-1)	(l-1)	(m-1)	(n-1)	(o-1)
ManitoLAS-65					
	(k-2)	(l-2)	(m-2)	(n-2)	(o-2)

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Conforme visualizado na Figura 14 e 15, ocorreu uma grande diminuição na produção da CB em ambos os meios de cultivo testados quando verificou-se a sua produtividade ao longo de 15 dias de cultivo, a exemplo do meio HS e ManitolLAS-65 quando realizou-se o ensaio fixo com 7 dias de cultivo apresentado no item 4.1 (Figura 11a), o qual foi concluído em um momento anterior ao teste de 15 dias, fazendo um paralelo entre o cultivo fixo de 7 dias (item 4.1) e o cultivo durante 15 dias no tempo 7, nessa última houve uma redução 24 e 43% para o meio padrão e o ManitolLAS-65, respectivamente. Uma possível explicação para isso, pode ser em função do número de repiques feitos com a bactéria. Em um estudo sobre a produção desse polímero em cultura estática, os autores relataram que as células utilizadas na pesquisa foram transferidas no máximo três vezes após a cultura de uma única colônia para garantir a pureza da cultura inicial e, assim, obter com precisão a produção de CB e evitar a mutação de não produtores de celulose que podem afetar o rendimento do biopolímero, confirmando a hipótese de que o grande número de repiques acarretou na diminuição da produção de CB (FANG; CATCHMARK, 2015). Outros estudos revelaram que durante a síntese as células mutantes não produtoras de celulose ficam no meio de cultivo (parte líquida), enquanto que as células produtoras de CB ficam aprisionadas na membrana para obter oxigênio e nutrientes, sugerindo que ao decorrer dos repiques a parcela do inóculo que ia para o meio de cultivo (parte líquida) para síntese das membranas era composta especial por células não produtoras de celulose (COUCHERON, 1991; DENG et al., 2013; SCHRAMM; HESTRIN, 1954; VALLA; KJOSBAKKEN, 1982).

Esses estudos também corroboram com algumas hipóteses de que a *K. hansenii* apresenta instabilidade fisiológica ou genética, resultando numa incapacidade de produzir celulose depois de um período. Para controlar esse problema e evitar a mutação espontânea das bactérias e ter uma produção constante de CB as empresas que trabalham comercialmente com esse polímero, fazem modificação na bactéria para que ela não possua os genes não produtores de celulose (COUCHERON, 1991; DENG et al., 2013; FARAG et al., 2016). Essas empresas conseguiram reverter o problema de produção e se tornaram grandes empresas de sucesso, como a Activa Healthcare – Lohmann & Rauscher Company, Seven Indústria de Produtos

Biotecnológicos, Vuelo Pharma, Axcelon Biopolymers Corporation, Bowil Biotech, S2Medical AB, DePuy Synthes, JeNaCell GmbH, entre outras.

Apesar da diminuição da produção de celulose pela bactéria, os resultados deste estudo mostram claramente que a adição de amido solúvel e lactose acarretou em um aumento da produção de CB em comparação ao meio padrão HS, o que possibilitou diminuir o tempo de produção desse polímero de 11 dias do meio HS para um intervalo entre 5 a 7 dias em meio ManitolLAS-65. Nesses tempos, a produção do HS foi $0,67 \pm 0,09$ g/L (11 dias) e no ManitolLAS-65 foi $1,13 \pm 0,03$, $1,2 \pm 0,01$ e $1,13 \pm 0,03$ g/L nos dias 5, 6 e 7 respectivamente, o que favorece mais ainda a sua produção em larga escala. Além disso, o tempo de cultivo necessário para atingir uma concentração máxima de CB foi reduzido, já que ao final de 15 dias em meio HS a bactéria produziu $1 \pm 0,00$ g/L de celulose e no meio ManitolLAS-65 esse valor foi atingido em 3 dias de cultivo sem diferenças significativas estatisticamente. A redução do tempo de cultivo e o aumento de CB pela adição de amido solúvel e lactose implica que a adição desses substratos é um método de cultivo eficaz para a produção de CB em cultura estática. Nota-se ainda, que o perfil de produção a partir do segundo dia em ambos os meios de cultivo foram estatisticamente diferentes.

Ressalta-se que o tempo citado de 11 dias, refere-se ao trabalho de Molin et al. (2019), onde os autores produziram a CB com esse tempo de cultivo, esse estudo foi usado como referência já que se destina para a mesma aplicação que o escopo desse presente trabalho. Portanto, esse tempo de cultivo foi fixado para o meio HS.

Com base em todas as discussões desse estudo, fica claro que a otimização da síntese de CB para aplicações industriais requer primeiro a produção em pequena escala com protocolos de cultivo aprimorados para poder converter uma grande quantidade de celulose e cepas efetivas de produção de CB, sem mutações frequentes ao longo do tempo (HUANG et al., 2014; UL-ISLAM et al., 2017).

4.2 Caracterizações

4.2.1 Análise Termogravimétrica (TGA)

O comportamento da degradação térmica apresenta algumas evidências sobre as características estruturais e a pureza da CB (KHATTAK et al., 2015). Portanto, para identificar o comportamento da degradação térmica é realizado a análise termogravimétrica que fornecerá os dados da temperatura de início da degradação extrapolada (T_{onset}) que corresponde a temperatura que começa a perda de massa e a temperatura da taxa máxima de perda de massa ($T_{máx}$) que indica o ponto de maior taxa de alteração na curva de perda de massa, sendo calculada a partir da primeira derivada dos dados de TG (TEIXEIRA et al., 2019; VAZQUEZ et al., 2013). Para esse polímero o perfil de degradação térmica envolve 3 estágios de perda de massa, causadas inicialmente por desidratação, seguida pela decomposição da celulose e por último a decomposição dos resíduos carbonáceos (CHANDRASEKARAN; BARI; SINHA, 2017; EL-SAIED et al., 2008; GÜNDÜZ; AŞIK, 2018; KIZILTAS; KIZILTAS; GARDNER, 2015; TEIXEIRA et al., 2019; TYAGI; SURESH, 2016).

O primeiro evento térmico ocorre no intervalo de 30 °C a 150/200 °C e corresponde a perda por evaporação de água superficial em até 100 °C e das moléculas de águas ligadas por ligação de hidrogênio nas fibras da CB acima de 100 °C, evidenciando a elevada capacidade de adsorção de água da CB e o seu caráter higroscópico, fazendo com que a água presente na sua estrutura permaneça mesmo depois que as amostras foram desidratadas para essa análise (BARUD et al., 2007; EL-SAIED et al., 2008; FANG; CATCHMARK, 2015; GÜNDÜZ; AŞIK, 2018; KIZILTAS; KIZILTAS; GARDNER, 2015; MACHADO et al., 2018; VAZQUEZ et al., 2013). Uma perda de massa em até 7% foi observada nas amostras nesse primeiro estágio, estando de acordo com a literatura. A perda de massa relativamente maior nessa faixa de temperatura pode ser devido a sua maior capacidade de retenção de água (CRA) para todas as amostras sintetizadas com meios de cultivo alternativos, porém, essa hipótese ainda precisa ser confirmada pela análise de CRA (UL-ISLAM; KHAN; PARK, 2012a).

A segunda fase de degradação é o evento térmico mais importante e é caracterizado por uma acentuada perda de massa (60-80%) que acontece no intervalo de 200 a 400 °C, correspondente a degradação da celulose, que inclui a despolimerização da CB em pequenas unidades de glicose e desidratação (BARUD et al., 2007;

MACHADO et al., 2018; MOHAMMADKAZEMI; AZIN; ASHORI, 2015). O estágio para a CB controle foi marcado por T_{onset2} de 314 °C e $T_{máx2}$ de 349 °C, enquanto uma temperatura ligeiramente mais alta foi observada para as amostras Manitol, ManitolAS-37,5/25 e ManitolLAS-100/65 com T_{onset2} em 318, 329 325, 330 e 325 °C e $T_{máx2}$ 354, 355, 354, 356 e 351 °C, respectivamente, demonstrando que essas amostras sintetizadas a partir de meios de cultura alternativos começam a degradar em uma temperatura maior e apresentam uma melhor estabilidade térmica. A temperatura máxima de decomposição é um critério de estabilidade térmica e por sua vez, a estabilidade térmica de qualquer material é intrinsecamente dependente de parâmetros como massa molecular, cristalinidade e orientação/interação das fibras (CHANDRASEKARAN; BARI; SINHA, 2017; MOHAMMADKAZEMI; AZIN; ASHORI, 2015; STUMPF et al., 2013; VAZQUEZ et al., 2013). Em um estudo semelhante, os autores investigaram o meio HS suplementado com diferentes fontes de carbono e concluíram que a suplementação com manitol apresenta uma maior estabilidade térmica e maior cristalinidade, demonstrando que o manitol apresenta efeito positivo para síntese de CB e em termos térmicos (MOHAMMADKAZEMI; AZIN; ASHORI, 2015). Nessa fase foi observado um valor entre 70 a 82% de perda de massa para todas as amostras, corroborando com os resultados da literatura.

O terceiro evento representa a degradação de resíduos carbonáceos (cerca de 20%) que se estende até cerca de 800 °C (MACHADO et al., 2018; YAN et al., 2017). Os resultados encontrados nesse estudo estão dentro dessa faixa de temperatura e apresentaram um percentual de perda de massa em até 18% para todas as amostras.

No que tange o teor de resíduos ao final da degradação, ocorreu um percentual maior para as amostras Manitol e ManitolAS-75/50/37,5 com 7,75 e 12,04, 12,22 e 10,45%, respectivamente, em comparação ao meio HS. Esse fato pode estar associado aos resíduos oriundos do processo de síntese, principalmente para os meios ManitolAS que contém amido solúvel, evidenciando a afirmação encontrada em outros estudos que a inserção *in situ* de amido no meio de cultivo não é consumido pela bactéria e leva a produção de um compósito, criando uma rede com dupla estrutura, porém, essas afirmações ainda precisam ser confirmadas por análises de MEV (BENADUCCI; BRANCIFORTI, 2016; GRANDE et al., 2009).

Todos os resultados encontrados neste estudo corroboraram com os valores apresentados na literatura, revelando boa estabilidade térmica (acima de 300 °C)

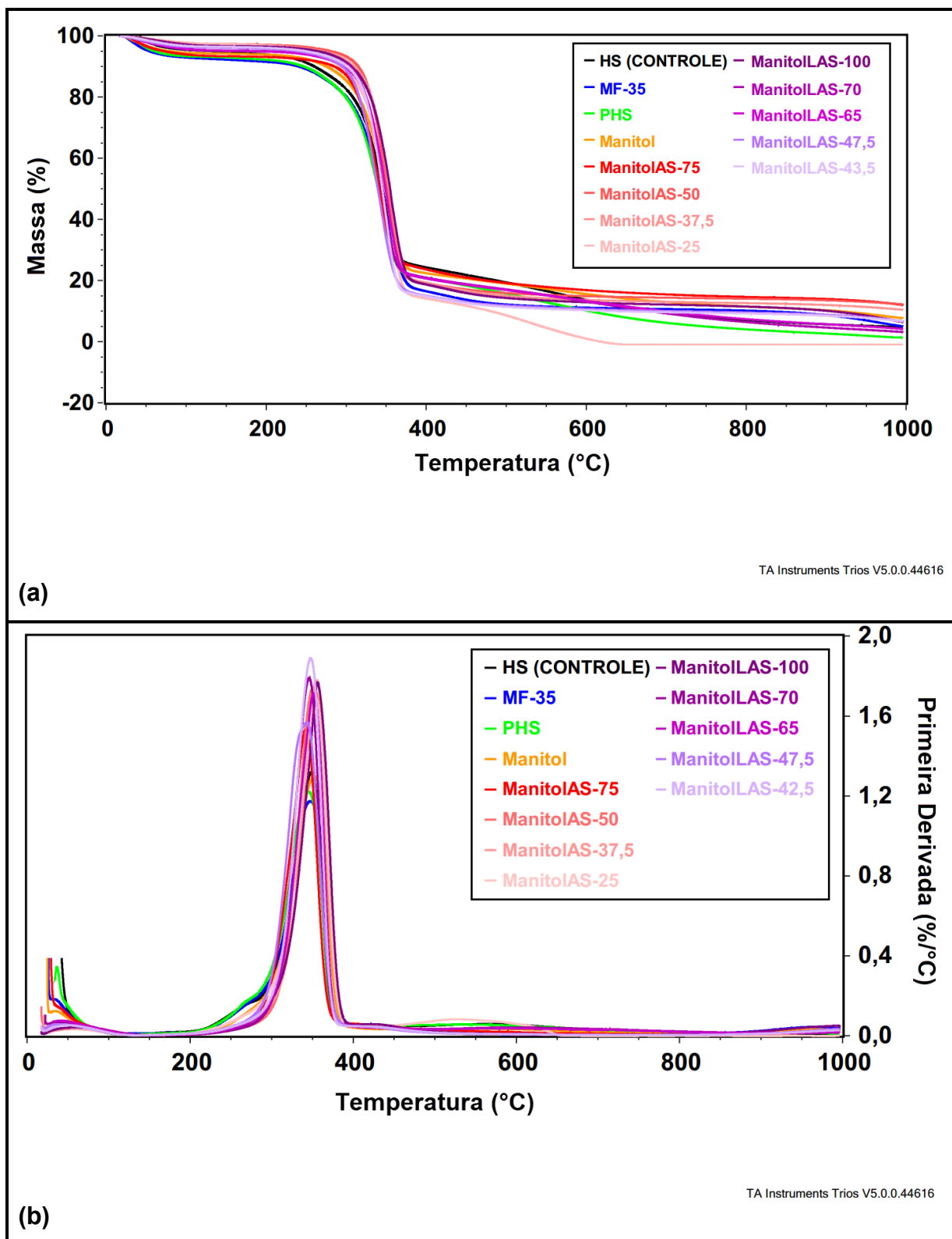
para todas as amostras em geral, porém, houve variação da estabilidade térmica em algumas amostras mas essa diferença foi pequena e só aconteceu acima de 300 °C. Logo, esse fator não interfere no seu uso como curativo já que essa aplicação não irá expor o polímero a elevadas temperaturas, estando apto, portanto, em contribuir e competir no campo de cicatrização de feridas em termos térmicos. No Quadro 3 estão relacionados os dados determinados a partir das curvas de TGA das amostras de CB controle e a CB com as melhores produções obtidas em meios de cultivo alternativos. A Figura 16 representa as curvas de TGA dessas amostras.

Quadro 5 – Dados obtidos da análise de TGA para as membranas de CB pura em meios HS, MF-35, PHS, Manitol, ManitolAS-75/50/37,5/25 e ManitolLAS-100/70/65/47,5/42,5. * nd = não determinado

Amostras	Perda de massa 1 (%)	T_{onset2} (°C)	Perda de massa 2 (%)	T_{máx2} (°C)	T_{onset3} (°C)	Perda de massa 3 (%)	T_{máx3} (°C)	Resíduo (%)
HS (CONTROLE)	4,73	314	70,17	349	529	17,09	566	4,80
MF-35	7,05	309	75,72	347	546	10,07	nd	5,06
PHS	6,61	306	71,59	345	477	16,98	544	1,36
Manitol	5,40	318	72,19	354	553	14,31	561	7,75
ManitolAS-75	6,14	319	69,85	342	567	12,72	nd	12,04
ManitolAS-50	2,2	326	78,15	349	554	6,86	nd	12,22
ManitolAS-37,5	2,6	329	77,54	355	529	8,83	nd	10,45
ManitolAS-25	2,53	325	82,31	354	483	15,3	532	0
ManitolLAS-100	3,02	330	78,07	356	547	11,86	nd	6,41
ManitolLAS-70	4,58	322	73,54	346	542	18,25	605	3,19
ManitolLAS-65	4,64	325	73,82	351	543	16,8	590	4,2
ManitolLAS-47,5	4,74	313	80,29	344	540	9,03	nd	6,68
ManitolLAS-42,5	3,26	322	81,16	348	535	8,33	nd	6,7

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Figura 16 – Curvas de análise termogravimétrica (TG) e termogravimétrica diferencial (DTG) obtidas por TGA, para as diferentes amostras de CB



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

4.2.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de FTIR é uma ferramenta importante para investigar os grupos funcionais e a natureza das ligações químicas presente em uma molécula (SHARMA; BHARDWAJ, 2019a). Portanto, os espectros das membranas de CB obtidos a partir de diferentes meios de cultivo foram realizados com a finalidade de determinar a ocorrência de novas bandas ou a alteração de qualquer banda que pudesse ser atribuída à interação entre os componentes do meio de cultivo e a celulose (TURECK, 2017). Esse biopolímero é formado a partir de moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas e ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, logo, espera-se encontrar ligações entre carbono e hidrogênio de alifáticos, entre carbono e oxigênio e entre carbono e O-H.

Além disso, através da FTIR observa-se os dois principais alomorfos deste biopolímero (celulose I e II). A celulose I é a forma dominante na natureza, consiste em um arranjo cristalino de cadeias lineares de β -(1 $\rightarrow$ 4) glucanas, todas orientadas paralelamente umas às outras com a mesma polaridade e a conformação de cadeia estendida de celulose I é responsável pela alta resistência mecânica, enquanto a celulose II é formada a partir da celulose I através de tratamentos químicos que alteram a estrutura do cristal (DAYAL et al., 2013).

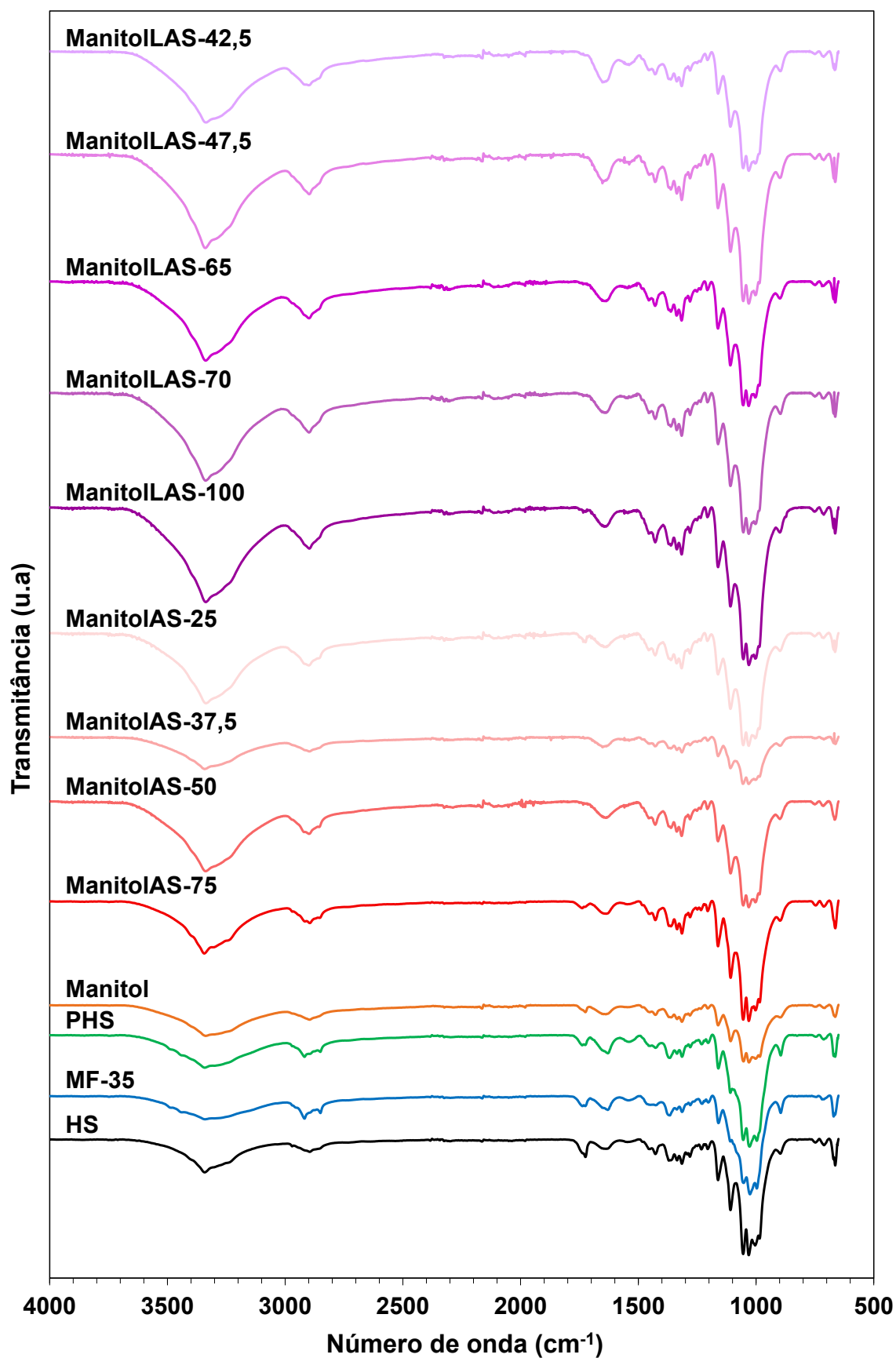
Os resultados de FTIR confirmaram a presença dos grupamentos funcionais característicos da CB, corroborando com a literatura (CESCA et al., 2020; DAYAL et al., 2013; MOOSAVI-NASAB; YOUSEFI, 2011; RANI; RASTOGI; APPAIAH, 2011; TURECK, 2017; VAZQUEZ et al., 2013; WANG et al., 2018). Tais bandas com as suas respectivas atribuições são apresentadas no Quadro 4 e na Figura 17 é visualizada a comparação entre os espectros das amostras de CB controle e CB's com as melhores produções.

Quadro 6 – Dados obtidos da análise de FTIR para as membranas de CB em meio padrão, MF-35, PHS, Manitol, ManitolAS-75, ManitolAS-50, ManitolAS-37,5, ManitolAS-25, ManitolLAS-100, ManitolLAS-70, ManitolLAS-65, ManitolLAS-47,5 e ManitolLAS-42,5. *U= estiramento; Ua= estiramento assimétrico; δ = deformação angular

TIPO DE LIGAÇÃO	Nº DE ONDA CARACTERÍSTICO	LITERATURA	HS	MF-35	PHS	Manitol	ManitolAS-75	ManitolAS-50	ManitolAS-37,5	ManitolAS-25	ManitolLAS-100	ManitolLAS-70	ManitolLAS-65	ManitolLAS-47,5	ManitolLAS-42,5
U(O-H) Celulose I (3-OH...O-5)	3100-3600	Cesca et al (2020), Dayal et al (2013), Vazquez et al (2013) e Wang et al (2018)	3341	3338	3338	3338	3343	3338	3342	3339	3338	3339	3339	3339	3339
U(CH); Ua(CH₂)	2898-2999	Dayal et al (2013), Moosavi-Nasab e Yousefi (2011), Vazquez et al (2013) e Wang et al (2018)	2899	2919	2918	2899	2899	2898	2898	2898	2899	2898	2898	2898	2898
H-O-H, flexão da água absorvida	1640	Rani, Rastogi e Appaiah (2011) e Wang et al (2018)	1640	1630	1630	1640	1640	1638	1648	1639	1640	1640	1640	1641	1639
CH₂, flexão simétrica	1428-1430	Castro et al (2011), Dayal et al (2013), Vazquez et al (2013) e Wang et al (2018)	1428	1428	1429	1428	1428	1428	1428	1428	1428	1428	1428	1428	1428
δ(CH)	1335-1336	Rani, Rastogi e Appaiah (2011) e Wang et al (2018)	1336	1336	1336	1336	1336	1336	1336	1336	1336	1336	1336	1336	1336
CH₂, vibração fora do plano	1315-1317	Castro et al (2011), Rani, Rastogi e Appaiah (2011) e Wang et al (2018)	1315	1315	1315	1315	1315	1315	1315	1315	1315	1315	1315	1315	1315
CH, flexão	1277-1281	Castro et al (2011), Rani, Rastogi e Appaiah (2011) e Wang et al (2018)	1281	1279	1279	1281	1281	1280	1280	1281	1281	1280	1281	1281	1280
Ua(C-O-H)	1160	Wang et al (2018)	1161	1160	1161	1161	1161	1161	1161	1161	1161	1161	1161	1161	1161
(C-C) da celulose	1108	Wang et al (2018)	1108	1108	1108	1108	1108	1108	1108	1108	1108	1108	1108	1108	1108
(C-O-C) de éteres	1058	Moosavi-Nasab e Yousefi (2011)	1055	1053	1055	1054	1055	1054	1056	1054	1054	1054	1054	1054	1054
(C-O), flexão	1031	Wang et al (2018)	1031	1027	1028	1031	1031	1031	1031	1031	1031	1031	1031	1031	1031
(C-O-C), alongamento	892-900	Dayal et al (2013)	897	896	896	896	896	897	897	896	897	896	896	897	896
(O-H), flexão fora de fase	600-670	Cesca et al (2020) e Wang et al (2018)	663	663	664	664	663	664	663	663	663	663	663	663	663

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Figura 17 – Espectros de FTIR obtidos para as membranas puras nos diferentes meios de cultivo



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

A partir dos dados elucidados para todas as amostras na Figura 17 e no Quadro 4 as principais bandas atribuídas a CB são descritas a seguir. Uma banda ampla foi encontrada no intervalo de 3100-3600 cm^{-1} referente à vibração do estiramento do grupo hidroxila em polissacarídeos e a presença da forte ligação de hidrogênio (intra e intermolecular) entre as cadeias de celulose I (u(O-H)) (CESCA et al., 2020; CHAGAS, 2018; DAYAL et al., 2013; VAZQUEZ et al., 2013; WANG et al., 2018). A banda em torno de 2900 cm^{-1} é relacionada à vibração de estiramento C-H e estiramento assimétrico CH_2 de alifáticos, sendo característica da banda de carboidratos e confirmando as propriedades amorfas da celulose (CHAGAS, 2018; DAYAL et al., 2013; MOOSAVI-NASAB; YOUSEFI, 2011; VAZQUEZ et al., 2013; WANG et al., 2018). Uma banda em torno de 1.640 cm^{-1} foi atribuída à vibração de flexão de H-O-H das moléculas de água absorvidas na celulose (RANI; RASTOGI; APPAIAH, 2011; WANG et al., 2018). Além disso, os espectros mostraram as bandas características da celulose I, com bandas em torno de 1.426 cm^{-1} referente à flexão simétrica de CH_2 ; 1108 cm^{-1} associado a ligações C-C das unidades monoméricas em polissacarídeos e uma banda em torno de 897 cm^{-1} atribuída ao alongamento de C-O-C na ligação β -(1 $\rightarrow$ 4) e é conhecida como banda de absorção "amorfa", tais bandas são típicas de polímeros com ligações de glicose (CASTRO et al., 2011; DAYAL et al., 2013; RANI; RASTOGI; APPAIAH, 2011; VAZQUEZ et al., 2013; WANG et al., 2018). Enquanto as bandas referentes a celulose II foram encontradas na faixa de 1335 cm^{-1} (deformação de CH), 1315 cm^{-1} (oscilação de CH_2), 1281 cm^{-1} (flexão C-H) (CASTRO et al., 2011; RANI; RASTOGI; APPAIAH, 2011; WANG et al., 2018). Na região espectral em torno de 1160 cm^{-1} , o aparecimento da banda foi associado ao estiramento assimétrico C-O-H na ligação β -(1 $\rightarrow$ 4) (WANG et al., 2018). A banda a 1058 cm^{-1} pode estar associada às funcionalidades éter nas ligações C-O-C (MOOSAVI-NASAB; YOUSEFI, 2011), enquanto que a banda em torno de 1.031 cm^{-1} é causada pelo alongamento de C-O (WANG et al., 2018). E a banda em torno de 663 cm^{-1} é atribuída a flexão fora de fase de O-H (CESCA et al., 2020; WANG et al., 2018). Além dessas bandas, outras bandas foram encontradas nas amostras analisadas, muitas delas relacionadas com ligações O-H e C-H (TURECK, 2017).

Por meio dos resultados obtidos da espectroscopia de FTIR, observou-se que as amostras sintetizadas nesse estudo eram compostas principalmente de celulose I (bandas em torno de 3340, 1428, 1160 e 900 cm^{-1}) e pouca celulose do tipo II (bandas em torno de 1336, 1315 e 1280 cm^{-1}) (CASTRO et al., 2011; RANI; RASTOGI;

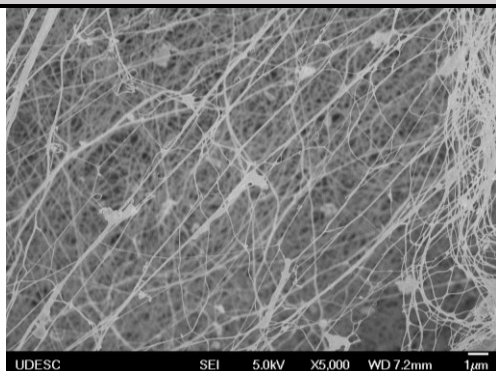
APPAIAH, 2011; WANG et al., 2018). A razão de intensidade da banda em 3240-3349 cm^{-1} no espectro de CB do meio MF-35 foi menor do que no espectro de celulose padrão, o que indicou que as ligações intermoleculares de hidrogênio da CB eram mais fracas em relação às do meio referência HS, enquanto que as ligações “mais fortes” foram encontradas para os meios ManitolLAS-100/47,5/65/70 em função da maior intensidade apresentada nessa banda (MOOSAVI-NASAB; YOUSEFI, 2011). A banda de absorção “amorfa” de FTIR em torno de 900 cm^{-1} , indicou que a CB com meio Manitol e ManitolAS-37,5 são as amostras menos amorfas entre as demais em função da menor intensidade da banda, enquanto que as amostras MF-35 e PHS são as mais amorfas, isso sugere o possível papel dos componentes do meio de cultivo na alteração da estrutura da celulose do domínio amorfo para o cristalino (DAYAL et al., 2013). No geral, a comparação do espectro de FTIR das amostras demonstraram similaridade, o que comprovou que as amostras produzidas por *K. hansenii* eram de celulose bacteriana.

4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

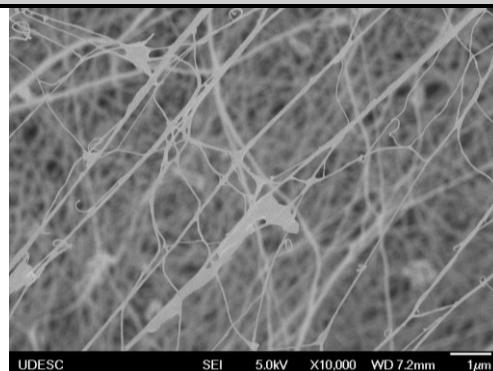
A caracterização morfológica de membranas de CB obtidas por diferentes meios de cultivo foi realizada por MEV com aumentos de 5000x, 10000x e 15000x. A Figura 18 mostra as micrografias das amostras produzida em meio controle e nos meios selecionados.

Figura 18 – Micrografias de CB obtidas com aumento de 5000x, 10000x e 15000x, respectivamente, para as membranas puras nos diferentes meios de cultivo: HS (a, b, c), ManitolAS-75 (d, e, f), ManitolLAS-70 (g, h, i) e ManitolLAS-65 (j, k, l)

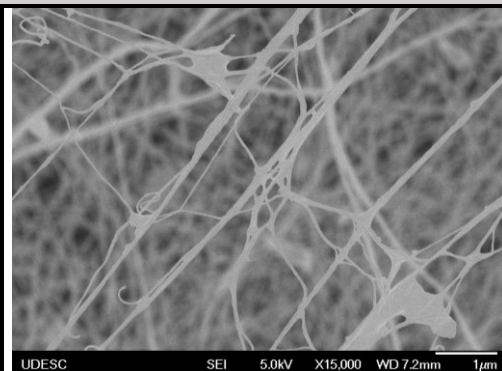
HS



(a)

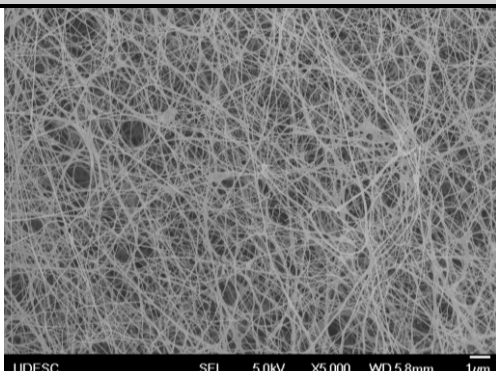


(b)

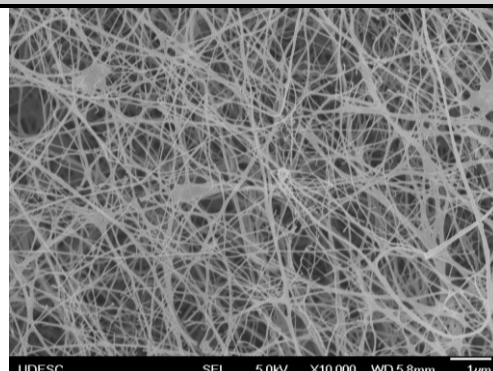


(c)

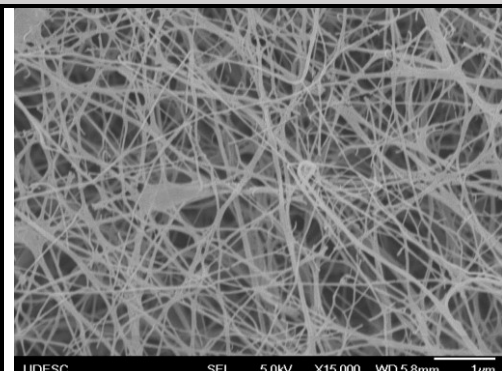
ManitolAS-75



(d)

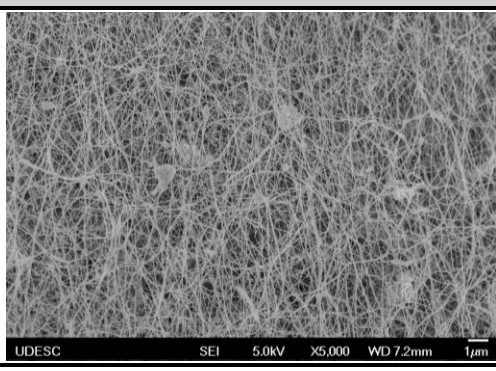


(e)

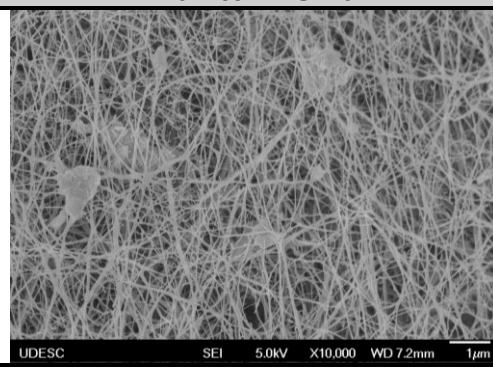


(f)

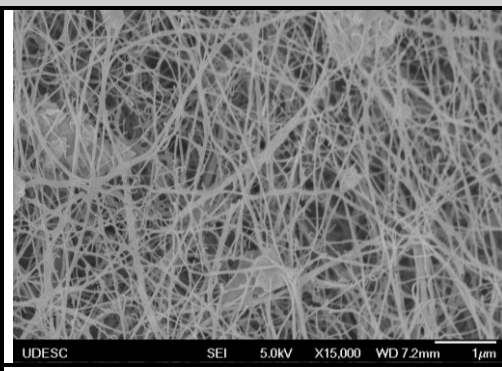
ManitolLAS-70



(g)

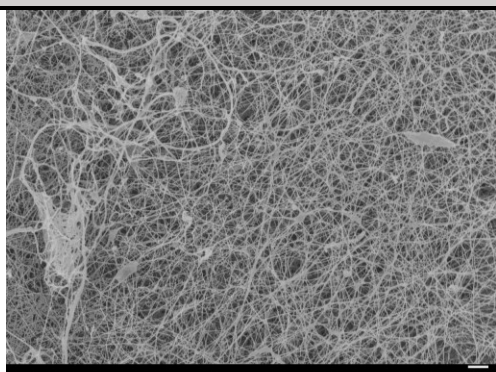


(h)

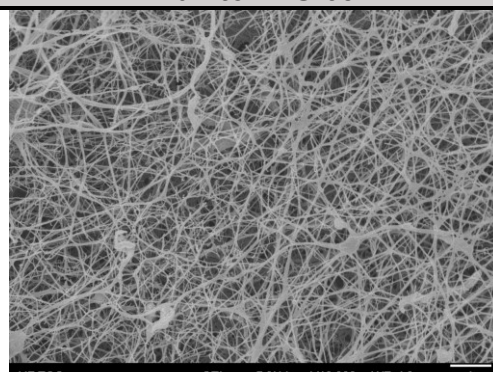


(i)

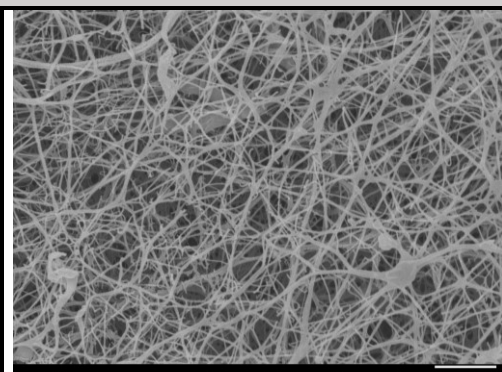
ManitolLAS-65



(j)



(k)



(l)

De um modo geral, as micrografias mostram uma estrutura em rede, formada por um emaranhado de fibras nanométricas aleatoriamente distribuídas e a existência de poros, característica da celulose bacteriana (FANG; CATCHMARK, 2015). Todas as membranas de CB apresentaram estrutura similar, porém o tamanho e a quantidade dos poros são diferentes, uma vez que a quantidade de celulose produzida foi maior. Essas diferenças podem influenciar a aplicação final desejada de celulose, onde pode ser necessário estruturas mais compactas ou porosas dependendo do uso escolhido (JOZALA et al., 2015).

Os resultados de MEV desse trabalho estão de acordo com outros trabalhos reportados na literatura envolvendo a síntese de CB sob diferentes condições de cultivo e tipo de amido (WANG et al., 2022; YANG et al., 2014).

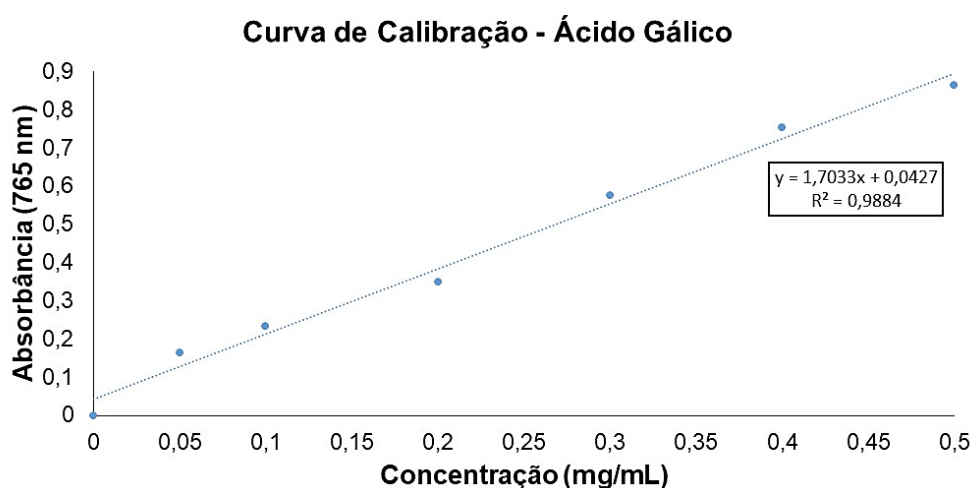
4.3 Membranas curativas (bioativas)

4.3.1 Caracterizações dos extratos pré-selecionados

4.3.1.1 Determinação dos compostos fenólicos totais dos extratos

As concentrações de compostos fenólicos totais (CFT) presentes nos extratos fluidos foram determinados por meio da técnica de turbidimetria utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. Para tanto, foi construída uma curva de calibração (Figura 19) tendo ácido gálico como padrão. Os resultados de CFT estão apresentados na Tabela 1.

Figura 19 – Curva de calibração do ácido gálico



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

A regressão linear dos dados analisados demonstrou um resultado para o coeficiente de linearidade (R^2) de 0,9884. Quando analisa-se a linearidade, quanto mais próximo do valor absoluto de 1,000 for o valor do coeficiente de linearidade, mais linear é a dispersão dos dados (BRITO et al., 2003). Portanto, o método analítico utilizado apresenta uma correlação fortíssima.

Tabela 1 – Fenólicos totais dos extratos fluidos. *Letras diferentes indicam diferenças nas colunas ($p \leq 0,05$)

Extrato	Concentração de fenólicos totais (mg EAG/g extrato seco)
Barbatimão	4,027 $\pm$ 0,548
Calêndula	1,410 $\pm$ 0,100 ^a
Girassol	0,222 $\pm$ 0,020 ^b
Ipê-roxo	1,390 $\pm$ 0,102 ^a
Picão-preto	1,400 $\pm$ 0,138 ^a
Urucum	0,281 $\pm$ 0,011 ^b

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

De acordo com os resultados, foram separados dois grupos com valores de CFT próximos para a análise de variância (ANOVA): calêndula, picão-preto e ipê-roxo; e urucum e girassol. Como demonstra a Tabela 1, os valores obtidos para os dois grupos são estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$).

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstraram que o barbatimão foi o extrato fluido com maior concentração de fenólicos totais. Essa CFT foi superior à reportada por Jacobson et al. (2005), que obtiveram valores entre 1,87 – 2,72 mg/g da casca de barbatimão, porém, inferior às concentrações obtidas por Santos et al. (2006), que avaliaram a variação sazonal dos teores de taninos em cascas de espécies de barbatimão, cujos resultados variavam de 32,3 a 181,5 mg/g.

Os extratos de calêndula, ipê-roxo e picão-preto apresentaram valores próximos entre si. A CFT obtida para a calêndula é inferior à relatada por Olennikov et al. (2017), que afirmaram que os grupos fenólicos básicos dos extratos das flores da planta foram flavonoides e fenilpropanoides, e apresentaram valores de 10,5 a 46,9 mg/g e 6,1 a 33,5 mg/g, respectivamente; o ipê-roxo apresentou menor CFT que a reportada por Mucha (2014 apud SUMARRIVA, 2019), que obteve 14,49 e 58,47 mg EAG/g; por sua vez, o extrato de picão-preto apresentou CFT superiores aos reportados por Cortés-Rojas et al. (2011) que, em um estudo para otimizar a extração de

compostos fenólicos da planta, obtiveram resultados variando de 0,4 a 1,24 mg EAG/g.

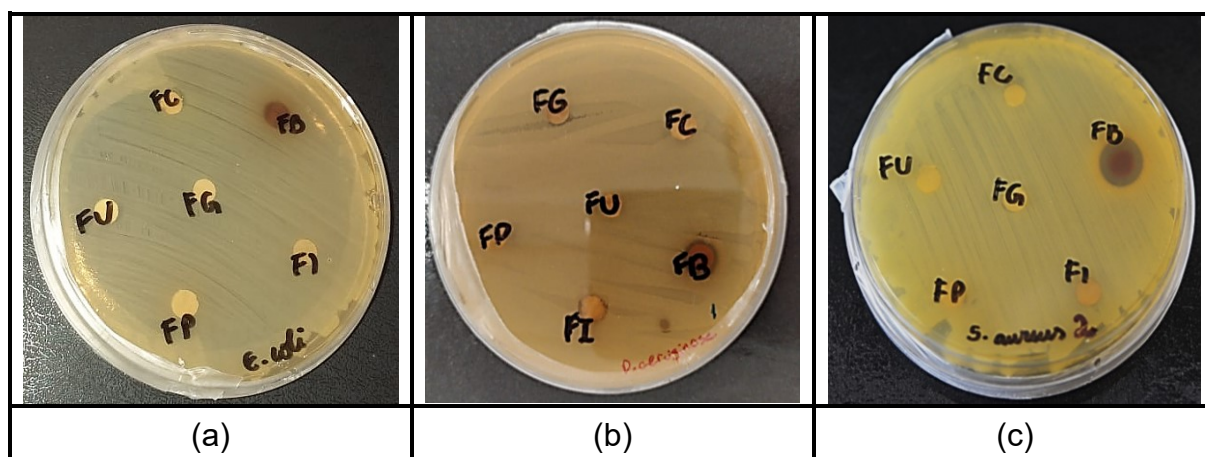
Dentre os seis extratos analisados, os extratos de girassol e urucum apresentaram as menores CFT. Giada (2006) reportou CFT de 13,4 mg/g para os compostos fenólicos extraídos do cotilédono das sementes de girassol; para amostras de extratos etanólico de urucum, Lemos et al. (2011) obtiveram valores de CFT de 2,978 a 4,509 mg EAG/g para suas amostras.

A diferença observada entre os resultados do presente trabalho e os obtidos pelos autores citados pode ser atribuída ao método de determinação de CFT empregado, ao método e tempo de extração, das espécies envolvidas e, ainda, das condições climáticas e do solo onde a planta foi cultivada (JACOBSON et al., 2005; LEMOS et al., 2011).

4.3.1.2 Atividade biológica (antimicrobiano) dos extratos

Na Figura 20 são apresentados os resultados de atividade antimicrobiana obtidos para os extratos fluidos de girassol (FG), urucum (FU), barbatimão (FB), ipê roxo (FI), picão-preto (FP) e calêndula (FC), utilizando as bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Figura 20 – Antimicrobiano dos extratos fluidos para (a) *E. coli*, (b) *P. aeruginosa* e (c) *S. aureus*



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Dentre todos os extratos fluidos testados, apenas o extrato de barbatimão apresentou efeito inibitório para *P. aeruginosa* e *S. aureus* (Figuras 20(b) e 20(c)), com halos de inibição com diâmetro médio de aproximadamente 8 mm e 11 mm, respectivamente.

De acordo com Ferreira et al. (2012) e Subashini e Rakshitha (2012), o girasol é capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* devido à presença de ácido linoleico em sua composição. Silva et al. (2018) relataram atividade antimicrobiana do urucum em cepas de *S. aureus*. Segundo Alves et al. (2000) e Soares et al. (2008), os extratos da casca de barbatimão apresentaram inibição para *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Para o ipê-roxo, Sousa (2017) reportou característica antimicrobiana sobre *S. aureus* e *P. aeruginosa*, sob diferentes métodos extrativos e sob diferentes concentrações. O extrato fluido de picão-preto teve atividade antimicrobiana reportada por Haida et al. (2007) sobre *E. coli* e *P. aeruginosa*, enquanto que Efstratiou et al. (2012) relataram que o extrato fluido de calêndula inibiu o crescimento das três bactérias utilizadas nesse trabalho.

Sabe-se que substâncias fenólicas e polifenóis (fenóis simples, flavonoides, taninos, entre outros) constituem uns dos principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas extraídos de plantas, além de óleos essenciais, lectinas, polipeptídeos, porém, a composição e a qualidade dos extratos são dependentes de vários fatores, como já citados no item anterior. Todos esses fatores, aliados ao tipo de teste antimicrobiano empregado e as cepas de micro-organismos utilizadas, podem gerar diferentes performances no estudo e validação de atividade antimicrobiana (GONÇALVES; ALVES FILHO; MENEZES, 2005; LIMA et al., 2019).

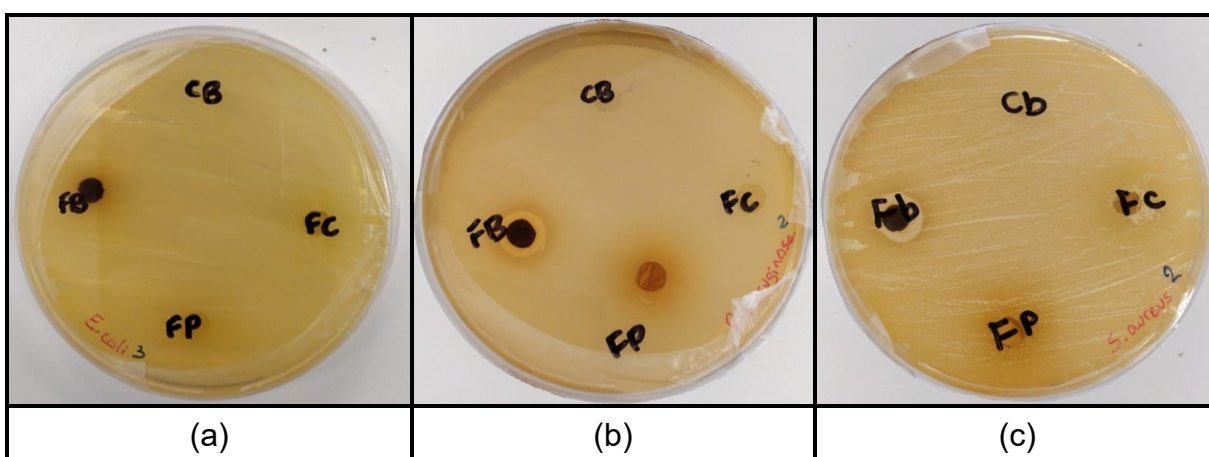
Levando em consideração os resultados obtidos na análise da determinação dos compostos fenólicos totais, supõe-se que as concentrações dos componentes responsáveis pela ação bactericida não foram suficientes para inibir o crescimento dos micro-organismos testados, excetuando-se o extrato fluido de barbatimão. Isto se justifica pois justamente o extrato que apresentou a maior concentração de compostos fenólicos foi o que apresentou a capacidade de inibir o desenvolvimento dos micro-organismos testes.

4.3.2 Caracterizações das membranas com os extratos selecionados

4.3.2.1 Atividade biológica (antimicrobiano) das CB/extratos selecionados

Com base nos resultados obtidos de CFT e antimicrobiano, foram escolhidos os extratos fluidos de barbatimão, por ter a maior concentração de compostos fenólicos e ter apresentado atividade bactericida contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*; calêndula e picão-preto, por apresentarem teor de fenólicos moderados em relação aos outros extratos. Na Figura 21 são apresentados os resultados do antimicrobiano obtidos para a CB pura e as membranas incorporadas com barbatimão (FB), picão-preto (FP) e calêndula (FC), utilizando as bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Figura 21 – Antimicrobiano das CBs incorporadas para (a) *E. coli*, (b) *P. aeruginosa* e (c) *S. aureus*



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Notou-se que não houve alteração da atividade antimicrobiana do extrato de barbatimão (FB) após ser incorporado à CB em relação ao extrato imerso em papel filtro, como demonstra a Figura 21. Os halos de inibição médios formados pela CB/FB foram de, aproximadamente, 9,5 mm para a *P. aeruginosa* (Figura 20b) e, aproximadamente, 11 mm para *S. aureus* (Figura 20c). Essa pequena diferença de halos entre o extrato de barbatimão em papel filtro (8 mm) e a CB/FB (9,5 mm) para a *P. aeruginosa* pode ser atribuída a uma menor absorção de extrato pelo papel filtro utilizado no teste em relação a quantidade absorvida pela CB, demonstrando que a

incorporação na CB foi mais efetiva. Esse resultado comprova que o extrato foi incorporado à membrana de celulose, mantendo sua característica antimicrobiana.

As membranas incorporadas com calêndula e picão-preto não apresentaram atividade antimicrobiana, como esperado. Portanto, para as demais análises foram avaliadas apenas as membranas incorporadas com barbatimão.

4.3.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

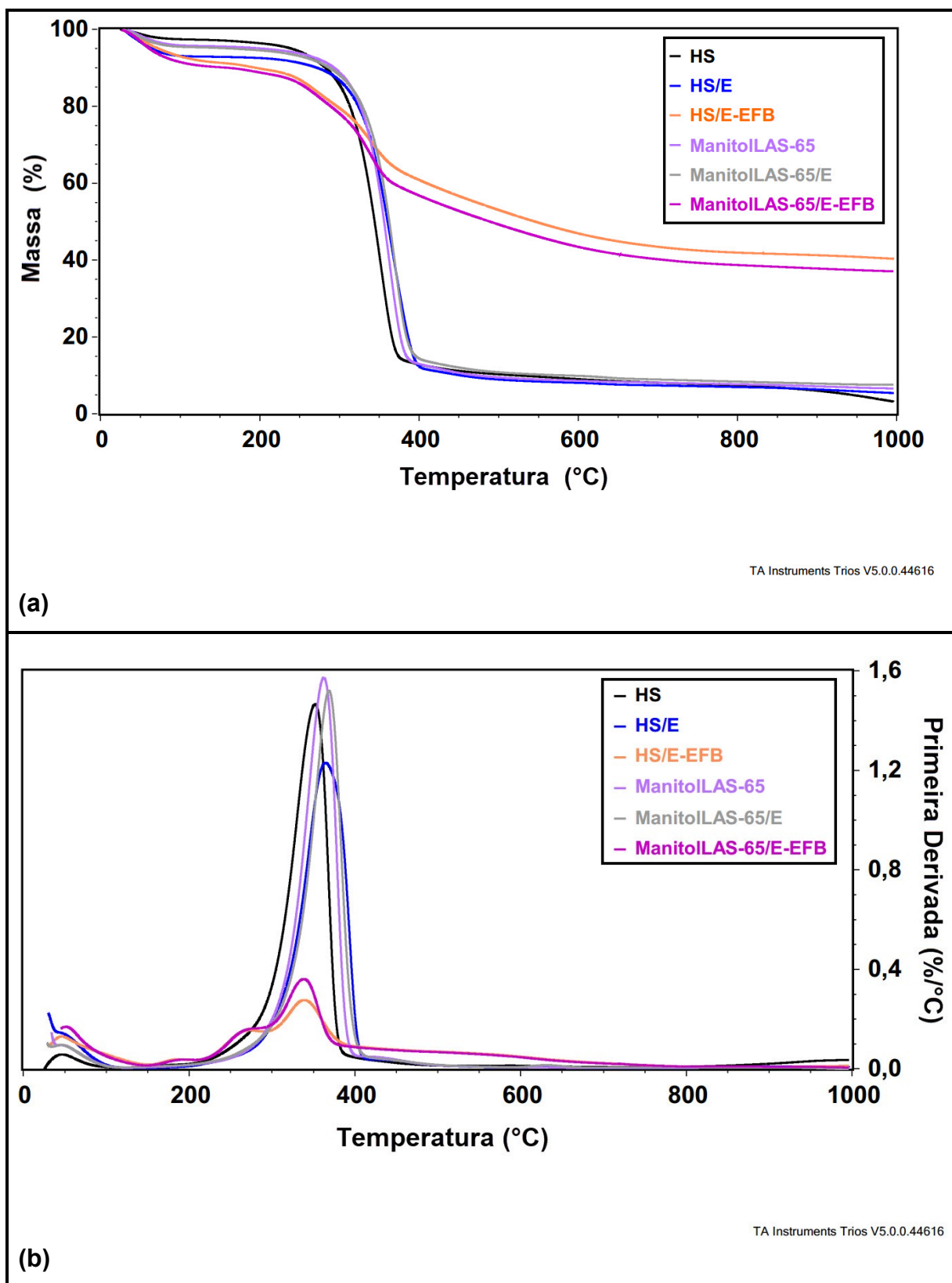
No Quadro 5 são apresentados os eventos térmicos das amostras obtidas a partir das curvas TG e DTG e na Figura 22 é apresentada uma comparação das curvas TG e DTG para a CB pura no meio HS e no meio selecionado (ManitolLAS-65), CB pura imersa em etanol (HS/E e ManitolLAS-65/E) e as membranas incorporadas com barbatimão (HS/E-EFB e ManitolLAS-65/E-EFB).

Quadro 7 – Dados obtidos da análise de TGA para as membranas de CB pura em meios HS e ManitolLAS-64, para membranas de CB imersas em etanol (HS/E e ManitolLAS-65/E) e as membranas incorporadas com extrato de barbatimão (HS/E-EFB e ManitolLAS-65/E-EFB). * nd = não determinado

Amostras	Perda de massa 1 (%)	T _{onset2} (°C)	Perda de massa 2 (%)	T _{máx2} (°C)	T _{onset3} (°C)	Perda de massa 3 (%)	T _{máx3} (°C)	T _{onset4} (°C)	Perda de massa 4 (%)	T _{máx4} (°C)	T _{onset5} (°C)	Perda de massa 5 (%)	T _{máx5} (°C)	Resíduo (%)
HS (CONTROLE)	2,49	313	85,03	353	594	5,01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,18
HS/E	7,08	326	82,46	364	465	4,67	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5,45
HS/E-EFB	8,42	173	1,74	183	243	8,80	267	319	22,36	341	465	16,18	554	40,34
ManitolLAS-65	4,48	328	82,69	362	558	5,10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	6,63
ManitolLAS-65/E	4,93	335	81,79	370	480	4,96	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	7,60
ManitolLAS-65/E-EFB	9,02	177	2,44	186	246	8,22	269	319	25,06	340	455	17,75	558	37,09

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Figura 22 – Curvas de análise termogravimétrica (TG) e termogravimétrica diferencial (DTG) obtidas por TGA, para as diferentes amostras de CB



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

O perfil de degradação térmica da CB pura (HS) apresentou três estágios de perda de massa, como mostrado na Figura 22. A primeira perda de massa ocorre entre 45 – 200 °C e pode ser atribuída a desidratação da celulose, como, por exemplo, evaporação de água adsorvida. Apesar de as membranas estarem liofilizadas, o caráter hidrofílico da CB faz com que a água se mantenha em sua estrutura. O segundo estágio é observado em uma temperatura de degradação máxima ($T_{máx2}$) de 353 °C, com uma acentuada perda de massa decorrente do processo de despolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas da celulose. O último estágio de degradação térmica apresentou perda de massa de 5%, referente à degradação de resíduos carbonáceos (LIMA et al., 2015; MACHADO et al., 2018; YAN et al., 2017), exibindo ainda, uma baixa quantidade de resíduos ao final da análise.

A amostra HS/E apresentou um perfil de degradação térmica bastante similar ao da CB pura, entretanto, com um maior percentual de perda de massa no primeiro estágio de degradação. Como a CB foi inicialmente imersa em etanol para facilitar a incorporação dos extratos fluidos nas membranas (BARUD et al., 2013), essa perda de massa pode ser atribuída à substituição de parte da água presente na estrutura da CB por etanol que, por ser mais volátil, foi removido em maior quantidade. Entretanto, a maior perda de massa foi no segundo estágio, decorrente da degradação da celulose, e ocorreu em uma maior temperatura quando comparado à CB pura, o que sugere o aumento de estabilidade térmica da CB com incorporação de etanol.

A amostra HS/E-EFB apresentou cinco estágios de degradação térmica, sendo o primeiro estágio atribuído a volatilização do etanol e da água que pode estar presente no extrato incorporado, com uma $T_{máx}$ de 47,22 °C e perda de 8,42% de sua massa. A partir do terceiro estágio iniciam-se os maiores percentuais de degradação. Segundo Cartaxo-Furtado et al. (2019), que estudaram o comportamento térmico do extrato seco de barbatimão, a partir de 200 °C inicia-se a degradação de macro e microconstituintes da amostra, como sais, proteínas e grupos carboxílicos. Essa degradação é finalizada no quarto estágio, onde é atingido o maior percentual de perda de massa, como é observado para a CB/FB, onde houve uma degradação de 22,36% da amostra. Além disso, as perdas de massa sob altas temperaturas ainda estão relacionadas à degradação dos componentes da celulose em si (BARUD et

al., 2013). Ao final da análise a amostra apresentou uma grande quantidade de resíduos evidenciando a incorporação do extrato na CB.

Além disso, vale destacar que os compostos fenólicos presentes nas amostras incorporadas possuem diversos graus de volatilidade, o que explica o aumento de estágios de degradação e a consequente diminuição da estabilidade térmica. As perdas desses compostos sob altas temperaturas resultam da evaporação e da decomposição química (HAMAMA; NAWAR, 1991).

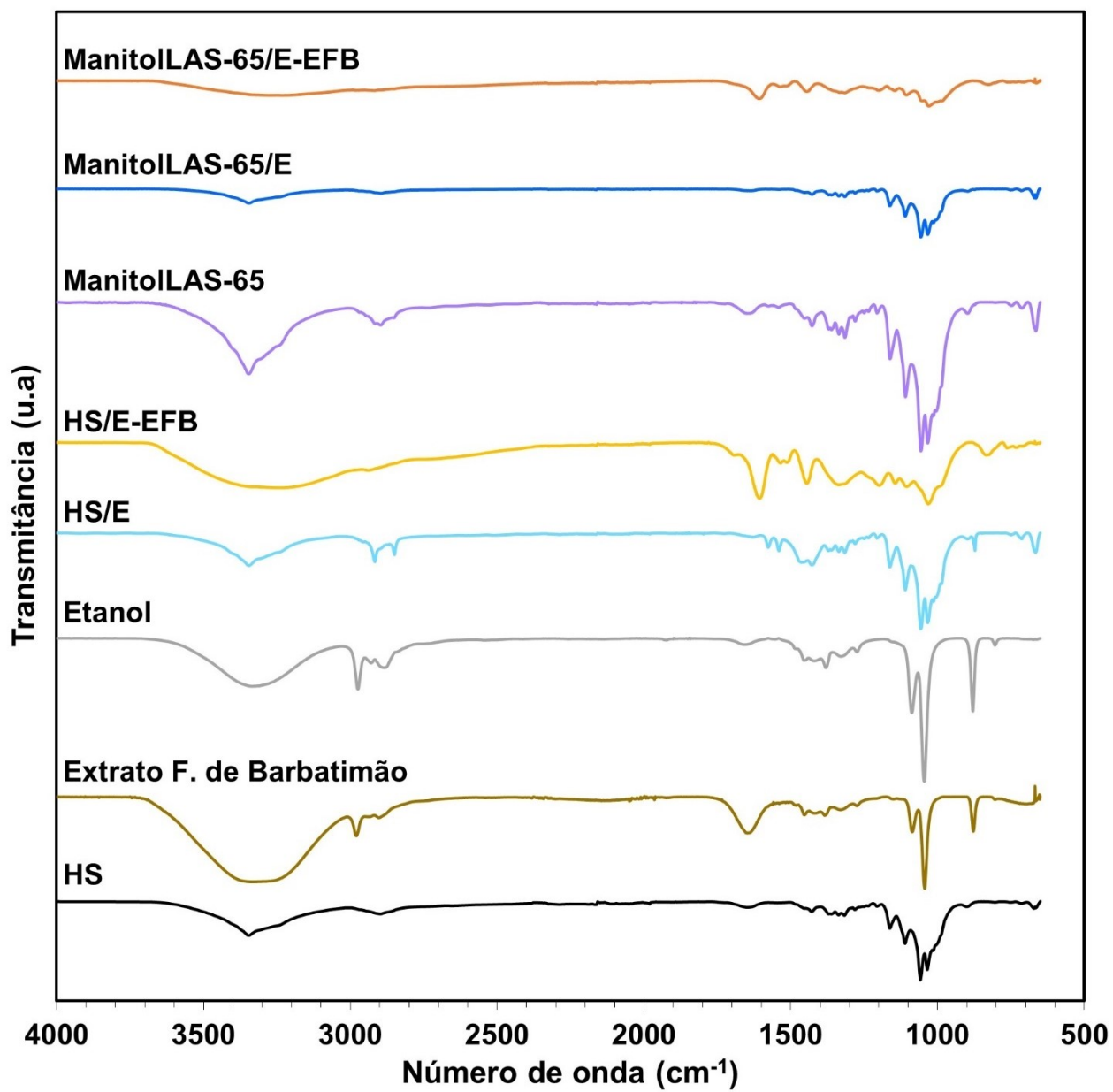
Quando se analisa as amostras ManitoLAS-65 se observa um comportamento térmico bastante similar ao da CB em meio HS tanto para CB pura como para as CB imersas em etanol e as incorporadas com extrato de barbatimão, entretanto, uma maior estabilidade térmica foi encontrada nessas amostras.

Todavia, o tipo de aplicação almejado para o material não o expõe a altas temperaturas, portanto, a redução na estabilidade térmica da CB após a incorporação no caso das amostras HS não as inviabilizam para a utilização como curativos, porém as membranas ManitoLAS-65 se mostraram mais atrativas por apresentarem uma margem de segurança maior caso o material necessite passar por algum tratamento envolvendo temperaturas elevadas.

4.3.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR estão apresentados na Figura 23. Enquanto que as principais bandas obtidas para as amostras da CB pura (HS e ManitoLAS-65) e da CB pura imersa em etanol (HS/E e ManitoLAS-65/E), etanol, dos extratos fluidos de barbatimão e CB's incorporadas com barbatimão (HS/E-EFB e ManitoLAS-65/E-EFB) encontram-se no Quadro 6.

Figura 23 – Espectros de FTIR obtidos para as amostras



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Quadro 8 – Dados obtidos da análise de FTIR para as membranas de CB puras (HS e ManitolLAS-65), CB imersas em etanol (HS/E e ManitolLAS-65/E), CB incorporadas com extrato de barbatimão (HS/E-EFB e ManitolLAS-65/E-EFB) e do extrato fluído de barbatimão (EFB). *U= estiramento; Ua= estiramento assimétrico; Us= estiramento simétrico; δ = deformação angular; EFB= extrato fluído de barbatimão

(continua)

TIPO DE LIGAÇÃO	Nº DE ONDA CARACTERÍSTICO	LITERATURA	HS	Etanol	HS/E	EFB	HS/E- EFB	Manitol- LAS-65	Manitol- LAS-65/E	ManitolLAS- 65/E-EFB
U(O-H) Celulose I (3-OH...O-5)	3100-3600	Cesca et al. (2020), Dayal et al. (2013), Vazquez et al. (2013) e Wang et al. (2018)	3346	3339	3345	3338	3237	3346	3346	3238
U(CH); Ua(CH₂)	2898-2999	Dayal et al. (2013), Moosavi-Nasab e Yousefi (2011), Vazquez et al. (2013) e Wang et al (2018)	2898	2930	2916	2979	-	2896	-	-
Ua(CH₃)	2976-2977	Elangovan et al. (2015), Jadhav et al. (2017) e Sangeetha et al. (2020)		2974						
Us(CH₂)	2876-2887	Jadhav et al. (2017) e Sangeetha et al. (2020)		2885	2850				2851	
H-O-H, flexão da água absorvida	1640	Rani, Rastogi e Appaiah (2011) e Wang et al (2018)	1647		-	1648	-	1648	-	-
U das ligações C=C de anéis aromáti- cos	1446-1606	Costa et al. (2013) e Borges et al. (2015)				1453	1606, 1445		-	1607, 1445
U das vibrações de anéis aromáticos	1539	Borges et al. (2015)			1540		1534		-	1534
CH₂, flexão simétri- ca	1428-1430	Castro et al (2011), Dayal et al (2013), Vazquez et al (2013) e Wang et al (2018)	1427		-	-	-	1428	-	-
δ(CH)	1335-1378	Rani, Rastogi e Appaiah (2011) e Wang et al (2018)	-		1372	1384	1335	1336	-	-
CH₂, vibração fora do plano	1315-1317	Castro et al (2011), Rani, Rastogi e Appaiah (2011) e Wang et al (2018)	1316		1316	-	1315	1315	1316	1316
CH, flexão	1277-1281	Castro et al (2011), Rani, Rastogi e Appaiah (2011) e Wang et al (2018)	-		1279	1279	1281	1281	-	-
Ua(C-O-H)	1160	Wang et al (2018)	1162		1160	-	1199	1161	1162	-
O-H aromático	1146-1147	Gorinstein et al. (2009); Borges et al. (2015)	-		-	-	1144			-
(C-C) da celulose	1108	Wang et al (2018)	1110		1110	1086	1105	1109	1110	1108
(C-O-C) de éteres	1058	Moosavi-Nasab e Yousefi (2011)	1059		1057	1044	-	1056	1057	-
(C-O), flexão	1031	Wang et al (2018)	1035		1033	-	1031	1033	1033	1030
(C-O-C), alonga- mento	892-900	Dayal et al (2013)	-		-	-	-	897	-	
δ de C-H fora do plano	870-900	Aldiyarov et al. (2009)	-	880, 804	872	878	-		873	

Quadro 9 – Dados obtidos da análise de FTIR para as membranas de CB puras (HS e ManitolLAS-65), CB imersas em etanol (HS/E e ManitolLAS-65/E), CB incorporadas com extrato de barbatimão (HS/E-EFB e ManitolLAS-65/E-EFB) e do extrato fluído de barbatimão (EFB). *U= estiramento; Ua= estiramento assimétrico; Us= estiramento simétrico; δ = deformação angular; EFB= extrato fluído de barbatimão

(conclusão)

TIPO DE LIGAÇÃO	Nº DE ONDA CARACTERÍSTICO	LITERATURA	HS	Etanol	HS/E	EFB	HS/E-EFB	Manitol-LAS-65	Manitol-LAS-65/E	ManitolLAS-65/E-EFB
δ fora do plano de C-H de alcenos	827-830	Gorinstein et al. (2009) e Fonseca et al. (2017)	-		-	-	833			826
Deformação fora do plano das ligações C-H	675-900	Silverstein, Webster, Kiemle (2007)	-		-	695	-			
Vibração C-H	781	Schulz e Baranska (2007)	-		713	-	762	712		754
(O-H), flexão fora de fase	600-670	Cesca et al (2020) e Wang et al (2018)	666		666	-	-	665	665	665

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Observando a Figura 23 e o Quadro 6, todas as amostras apresentaram bandas com alta intensidade em 3338 cm^{-1} , que pode ser atribuída ao estiramento axial dos grupos hidroxila, característicos de compostos orgânicos (RICCI et al., 2015).

As bandas características do etanol aparecem nas seguintes interações intramoleculares e intermoleculares: em 3339 cm^{-1} referente a ligação O-H; em $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ associado as ligações CH; em $1300\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ referente as ligações CH e OH; em $1049\text{--}1085\text{ cm}^{-1}$ associado ao estiramento U(C-O)/ (C-C-O) e em $800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ referente as vibrações deformacionais da ligações CH (ALDIYAROV et al., 2009; ELANGO VAN et al., 2015; JADHAV et al., 2017; SANGEETHA et al., 2020).

Devido à semelhança entre os grupamentos presentes na celulose e o etanol, não houve grande diferença entre os espectros entre as amostras de CB e CB/E. Entretanto, na amostra incorporada com etanol, a presença do etanol foi confirmada pela ocorrência do aumento de intensidade das bandas em algumas regiões, como nas bandas referentes ao estiramento de CH_2 em 2850 e 2851 cm^{-1} para as amostras HS/E e ManitolLAS-65/E, respectivamente; e nas bandas na região entre 1200 e 1000 cm^{-1} , com bandas referentes ao estiramento de C-O (1162 cm^{-1} , 1057 cm^{-1} e 1033 cm^{-1}) e estiramento C-C (1057 cm^{-1}). Além disso, na HS/E, houve o surgimento de uma banda de baixa intensidade em 2916 cm^{-1} , atribuída a vibração de CH_3 ou $-\text{CH}_2$; em 1372 cm^{-1} , também de baixa intensidade, atribuída a deformação C-H de grupos metila; nas deformações das ligações C-H (873 e 872 cm^{-1}) para as amos-

tras ManitoLLAS-65/E e HS/E, respectivamente; e em 713 cm^{-1} , atribuída a vibração de C-H, demonstrando a modificação das ligações da CB pela interação do etanol (BORGES et al., 2015; FALCÃO; ARAÚJO, 2013; GINDRI et al., 2020; KAČURÁKOVÁ et al., 2002; PECORARO et al., 2008; RAHMALIA; FABRE; MOULOOUNGUI, 2015; SCHULZ; BARANSKA, 2007).

Nas amostras incorporadas com os extratos vegetais surgiram bandas que podem ser atribuídas a taninos, como as bandas características de ligações C=C de anéis aromáticos em torno de 1606 , 1534 , 1445 cm^{-1} para HS/E-EFB e as bandas 1607 , 1534 , 1445 cm^{-1} para as amostras ManitoLLAS-65/E-EFB.

Foram observadas bandas de C-O em torno de 1110 cm^{-1} e 1030 cm^{-1} que, para as amostras com extratos, podem ser atribuídas aos anéis aromáticos de taninos hidrolisáveis e estiramento de taninos, respectivamente, como reportado por Falcão e Araújo (2013), Ricci et al. (2015) e Borges et al. (2015). Entretanto, essas bandas são comuns para os tipos de materiais obtidos nesse trabalho e também aparecem nas amostras de CB puras e CB imersas em etanol, portanto não há confirmação de que essas bandas realmente sejam atribuídas a taninos. Por outro lado, várias bandas que podem ser atribuídas a compostos fenólicos foram observadas nas amostras após o processo de imersão com extratos, confirmando a incorporação dos mesmos.

CONCLUSÃO

O emprego de diferentes fontes de nutrientes foi utilizado para entender a biossíntese da celulose bacteriana pela *Komagataeibacter hansenii* (ATCC 23769) frente aos substratos e conseguir otimizar a sua produção visando viabilizar o seu uso real industrialmente, já que o meio nutriente para a produção da CB é um dos vários gargalos que precisam ser superados para a produção em larga escala. Nesse primeiro momento foram analisados os substratos empiricamente, a utilização de ferramentas para a reconstrução metabólica frente a esses substratos para fornecer um melhor entendimento torna-se necessário, visto que esse tipo de análise para essa bactéria específica é bem escasso na literatura, bem como análise de modelos estatísticos para otimizar mais ainda a produção da CB.

Dentre as fontes nutricionais analisadas o uso do amido solúvel combinado ou não com a lactose no meio manitol (ManitolAS e ManitolLAS) conseguiu atingir os resultados mais expressivos de produção, alcançando cerca de 2,2 a 3,3 vezes mais celulose que o meio controle (HS), com destaque para o meio ManitolLAS-65, o qual obteve a melhor condição de cultivo e uma redução de 71% nos custos relacionados ao meio nutricional e a celulose (R\$/g de CB).

Os resultados de FTIR indicaram que, quimicamente, todas as membranas produzidas eram de fato celulose bacteriana e eram compostas principalmente de celulose I (bandas em torno de 3340, 1428, 1160 e 900 cm^{-1}) e pouca celulose do tipo II (bandas em torno de 1336, 1315 e 1280 cm^{-1}).

As análises de TGA indicaram que todas as membranas analisadas possuíam comportamento térmico similar, sendo que as mais estáveis termicamente foram Manitol (354 °C), ManitolAS-37,5 (355 °C), ManitolAS-25 (354 °C), ManitolLAS-100 (356 °C) e ManitolLAS-65 (351 °C).

Todas as membranas de CB apresentaram estrutura similar e com as características esperadas para esse material nas análises de MEV, porém o tamanho e a quantidade dos poros são diferentes, uma vez que a quantidade de celulose produzida foi diferente.

Diante de todos os resultados, conclui-se que a otimização da produção da CB utilizando meios de cultivo alternativos foi possível, bem como reduzir os custos, favorecendo a aplicabilidade para uma escala industrial, já que otimização e redução de custos são pré-requisitos tecnológicos a serem adotados em larga escala. Além disso, o material atende as propriedades morfológicas, térmicas e químicas esperadas para a aplicação desejada.

Quanto a parte do estudo referente aos extratos vegetais e a produção de membranas incorporadas com os extratos, conclui-se que dentre os seis extratos fluidos testados antes da incorporação, apenas o extrato de barbatimão apresentou resultados favoráveis quanto a inibição de micro-organismos presentes em feridas. A característica antimicrobiana do barbatimão sobre *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* manteve-se após a incorporação na membrana de CB, o que demonstra a facilidade do biopolímero em absorver substâncias com diversos princípios ativos e tornando a CB com extrato de barbatimão um excelente candidato para atuar no campo de curativos para tratamento de feridas contaminadas. Por outro lado, os outros extratos não tiveram atividade antimicrobiana devido à baixa concentração de compostos fenólicos totais em suas composições.

O resultado positivo da atividade antimicrobiana apresentada para o barbatimão demonstrou que as membranas absorveram com sucesso os extratos, fato esse comprovado pelas análises de FTIR, onde bandas características de compostos fenólicos foram observadas.

Verificou-se a diminuição da estabilidade térmica da CB após as incorporações, que pode ser atribuída aos compostos fenólicos presentes nas amostras, porém as membranas ManitolLAS-65 apresentaram uma estabilidade térmica maior quando comparadas com as membranas HS. Entretanto, essa redução não interfere na sua utilização como curativo, já que essa aplicação não irá expor o polímero a elevadas temperaturas, estando apto, portanto, em contribuir e competir no campo de cicatrização de feridas em termos térmicos.

Dessa forma, a incorporação de extratos vegetais em membranas de CB mostrou-se promissora para aplicações na área biomédica como curativo em feridas contaminadas, considerando as diversas propriedades interessantes da CB, como

biodegradabilidade, atoxicidade, biocompatibilidade e a sua fácil obtenção. Somando essas características a otimização da produção nos quesitos de aumento da produção e de redução de preço e de tempo da produção esse material se torna ainda mais promissor para o âmbito industrial.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Ainda existe muitas possibilidades para aprofundamento de trabalhos futuros envolvendo esse estudo, a seguir algumas sugestões:

- Análise da eficiência do uso de substrato com quantificação dos açúcares e nitrogênio iniciais e finais para determinar o consumo dos nutrientes ao final do cultivo;
- Determinação dos ácidos orgânicos (glucônico, acético e láctico) formados ao final do cultivo para verificar quais ácidos foram formados e se eles interferiram na produção da CB;
- Caracterizar as amostras obtidas por meio de teste de tração para conhecer as propriedades mecânicas;
- Testar a atividade antimicrobiana das membranas incorporadas com extratos e os extratos com outros micro-organismos;
- Avaliar a cinética de liberação dos compostos fenólicos;
- Testar novos extratos e fazer combinações de com diferentes tipos de extratos para avaliar se as propriedades foram melhoradas;
- Realizar análise de citotoxicidade;
- Testes *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ABDELRAOF, M.; HASANIN, M. S.; EL-SAIED, H. Ecofriendly green conversion of potato peel wastes to high productivity bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 211, p. 75–83, 2019.
- ABEER, M. M.; AMIN, M. C. I. M.; MARTIN, C. A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: their biochemistry, current approaches and future prospects. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1047–1061, 2014.
- ABUBAKAR, A. A.; MAIYE, J. A.; YAKUBU, A. S.; SAIDU, B.; ADAMU, U.; SAHABI, S. Comparative effect of diclofenac sodium and dexamethasone on incisional wound healing in dogs. **Scientific Journal of Veterinary Advances**, v. 1, n. 4, p. 94–100, 2012.
- ADEPU, S.; KHANDELWAL, M. Bacterial cellulose with microencapsulated antifungal essential oils: A novel double barrier release system. **Materialia**, v. 9, p. 1–13, 2020.
- AKASH, M. S. H.; REHMAN, K.; FIAYYAZ, F.; SABIR, S.; KHURSHID, M. Diabetes-associated infections: development of antimicrobial resistance and possible treatment strategies. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 5, p. 1–13, 2020.
- ALBLAS, J. G.; ANDRIESSEN, A.; KLICKS, R. J.; WIERSEMA, A. M.; DOORN, J. Van; ELZINGA, G.; SPITS, H.; POST, A.; GENT, M. Van. Clinical evaluation of a PHMB- impregnated biocellulose dressing on paediatric lacerations. **Journal of Wound Care**, v. 20, n. 6, p. 2–6, 2011.
- ALBUQUERQUE, R. M. B.; MEIRA, H. M.; SILVA, I. D. L.; SILVA, C. J. G.; ALMEIDA, F. C. G.; AMORIM, J. D. P.; VINHAS, G. M.; COSTA, A. F. S.; SARUBBO, L. A. Production of a bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) blend activated with clove essential oil for food packaging. **Polymers and Polymer Composites**, p. 1–12, 2020.
- ALDIYAROV, A.; ARYUTKINA, M.; DROBYSHEV, A.; KAIKANOV, M.; KURNOSOV, V. Investigation of dynamic glass transitions and structural transformations in cryovacuum condensates of ethanol. **Low Temperature Physics**, v. 35, n. 4, p. 251–255, 2009.
- ALMEIDA, H. C.; SILVEIRA, C. B. Da; ERNANI, P. R.; CAMPOS, M. L.; ALMEIDA, D. Composição química de um resíduo alcalino da indústria de papel e celulose (DREGS). **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1669–1672, 2007.
- ALMEIDA, I. F.; PEREIRA, T.; SILVA, N. H. C. S.; GOMES, F. P.; SILVESTRE, A. J. D.; FREIRE, C. S. R.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. C. Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: An in vivo skin compatibility study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 3, p. 332–336, 2014.
- ALTIOK, D.; ALTIOK, E.; TIHMINLIOGLU, F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 7, p.

2227–2236, 2010.

ALVARADO-GOMEZ, E.; PEREZ-DIAZ, M.; VALDEZ-PEREZ, D.; RUIZ-GARCIA, J.; MAGAÑA-AQUINO, M.; MARTINEZ-CASTAÑON, G.; MARTINEZ-GUTIERREZ, F. Adhesion forces of biofilms developed in vitro from clinical strains of skin wounds. **Materials Science & Engineering C**, v. 82, n. 1, p. 336–344, 2018.

ALVAREZ, O. M.; PATEL, M.; BOOKER, J.; MARKOWITZ, L. Effectiveness of a biocellulose wound dressing for the treatment of chronic venous leg ulcers: results of a single center randomized study involving 24 patients. **Wounds**, v. 16, n. 7, p. 224–233, 2004.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. de F. A.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367–373, 2000.

AMORIM, J. D. P.; S. JUNIOR, C. J. G.; COSTA, A. F. S.; NASCIMENTO, H. A.; VINHAS, G. M.; SARRUBO, L. A. BioMask, a polymer blend for treatment and healing of skin prone to acne. **Chemical Engineering Transactions**, v. 79, p. 205–210, 2020. a.

AMORIM, J. D. P.; SOUZA, K. C.; DUARTE, C. R.; DUARTE, I. S.; RIBEIRO, F. A. S.; SILVA, G. S.; FARIAS, P. M. A.; STINGL, A.; COSTA, A. F. S.; VINHAS, G. M.; SARUBBO, L. A. Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 3, p. 851–869, 2020. b.

ANTONIO, F.; GUILLEM, R.; SONIA, T.; CLARA, M.; PIERGIORGIO, G.; VALERIA, C.; GIANLUCA, C.; TZANKO, T. Cross-linked collagen sponges loaded with plant polyphenols with inhibitory activity towards chronic wound enzymes. **Biotechnology Journal**, v. 6, n. 10, p. 1208–1218, 2011.

ARAÚJO, L. C. G. **Organização, sistemas e métodos e as modernas ferramentas de gestão organizacional: arquitetura, benchmarking, empowerment, gestão pela qualidade total, reengenharia**. 5. ed. São Paulo: Editora Atlas, 2011.

ARAÚJO JÚNIOR, A. M.; SILVA, A. A. B.; BARUD, H. S.; FERREIRA, M. E. T.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y. **BIOCURATIVO DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA OBTIDO A PARTIR DE BIOCELULOSE E EXTRATO DE PRÓPOLIS, BEM COMO SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO E APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS**, Titular: APIS FLORA INDUSTRIAL E COMERCIAL LTDA. BR 1PI 1100760-5 A2. Depósito: 07 jan. 2011. Concessão: 11 fev. 2014., 2014.

ARIS, F. A. F.; FAUZI, F. N. A. M.; TONG, W. Y.; ABDULLAH, S. S. S. Interaction of silver sulfadiazine with bacterial cellulose via ex-situ modification method as an alternative diabetic wound healing. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 101332, 2019.

ASHTAVINAYAK, P.; ELIZABETH, H. A. Review: Gram Negative Bacteria in Brewing. **Advances in Microbiology**, v. 06, n. 03, p. 195–209, 2016.

ASHWLAYAN, V. D.; KUMAR, A.; VERMA, M.; GARG, V. K.; GUPTA, S. K. Therapeutic Potential of *Calendula officinalis*. **Pharmacy & Pharmacology International Journal**, v. 6, n. 2, p. 149–155, 2018.

ATAIDE, J. A.; CARVALHO, N. M.; REBELO, M. A.; CHAUD, M. V.; GROTO, D.; GERENUTTI, M.; RAI, M.; MAZZOLA, P. G.; JOZALA, A. F. Bacterial Nanocellulose Loaded with Bromelain: Assessment of Antimicrobial, Antioxidant and Physical-Chemical Properties. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 18031, 2017.

ATCC - AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **Gluconacetobacter hansenii (Gossele et al.) Yamada et al. (ATCC® 23769™)**. 2020. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/all/23769.aspx#culturemethod>>. Acesso em: 17 jun. 2020.

ÁVILA, H. M.; SCHWARZ, S.; FELDMANN, E.-M.; MANTAS, A.; BOMHARD, A. Von; GATENHOLM, P.; ROTTER, N. Biocompatibility evaluation of densified bacterial nanocellulose hydrogel as an implant material for auricular cartilage regeneration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 7423–7435, 2014.

AZIZ, F. M.; DARWEESH, M. J.; RAHI, F. A.; SAEED, R. T. In vivo and in vitro Studies of a Polar Extract of *Helianthus annuus* (Sunflower) Seeds in Treatment of Napkin Dermatitis. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 24, n. 2, p. 1–3, 2014.

BACAKOVA, L.; PAJOROVA, J.; BACAKOVA, M.; SKOGBERG, A.; KALLIO, P.; KOLAROVA, K.; SVORCIK, V. Versatile Application of Nanocellulose: From Industry to Skin Tissue Engineering and Wound Healing. **Nanomaterials**, v. 9, n. 2, p. 1–39, 2019.

BÄCKDAHL, H.; ESGUERRA, M.; DELBRO, D.; RISBERG, B.; GATENHOLM, P. Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 2, n. 6, p. 320–330, 2008.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 27–51, 2005.

BARROS, N. R. De; HEREDIA-VIEIRA, S. C.; BORGES, F. A.; BENITES, N. M.; REIS, C. E. Dos; MIRANDA, M. C. R.; CARDOSO, C. A. L.; HERCULANO, R. D. Natural rubber latex biodevice as controlled release system for chronic wounds healing. **Biomedical Physics & Engineering Express**, v. 4, n. 3, p. 1–25, 2018.

BARUD, H. da S.; JÚNIOR, A. M. de A.; SASKA, S.; MESTIERI, L. B.; CAMPOS, J. A. D. B.; FREITAS, R. M. De; FERREIRA, N. U.; NASCIMENTO, A. P.; MIGUEL, F. G.; VAZ, M. M. de O. L. L.; BARIZON, E. A.; MARQUELE-OLIVEIRA, F.; GASPAR, A. M. M.; RIBEIRO, S. J. L.; BERRETTA, A. A. Antimicrobial Brazilian Propolis (EPP-AF) Containing Biocellulose Membranes as Promising Biomaterial for Skin Wound Healing. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–10, 2013.

BARUD, H. G. de O.; SILVA, R. R.; BARUD, H. da S.; TERCJAK, A.; GUTIERREZ,

J.; LUSTRI, W. R.; OLIVEIRA JR, O. B.; RIBEIRO, S. J. L. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 406–420, 2016.

BARUD, H. S. **Novos materiais multifuncionais baseados em celulose bacteriana**. 2010. Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2010.

BARUD, H. S.; RIBEIRO, C. A.; CRESPI, M. S.; MARTINES, M. A. U.; DEXPERT-GHYS, J.; MARQUES, R. F. C.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Thermal characterization of bacterial cellulose–phosphate composite membranes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, n. 3, p. 815–818, 2007.

BASTA, A. H.; EL-SAIED, H. Performance of improved bacterial cellulose application in the production of functional paper. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 2098–2107, 2009.

BASU, A.; VADANAN, S. V.; LIM, S. Rational design of a scalable bioprocess platform for bacterial cellulose production. **Carbohydrate Polymers**, v. 207, p. 684–693, 2019.

BATAIN, F.; GABRIEL, G.; ALVES, T. F. R.; REBELO, M. A.; SANTOS, C. A.; SOUZA, J. F.; AMARAL, V. A.; RIOS, A. C.; CRESCENCIO, K. M. M.; SOEIRO, V. S.; BARROS, C. T.; JOZALA, A. F.; CHAUD, M. V. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FISIOMECÂNICAS DA MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA INCORPORADA COM EXTRATO VEGETAL PADRONIZADO DE ALOE VERA. In: 15° CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS (CBPOL) 2019, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Anais do 15° CBPol, 2019.

BATTAD-BERNARDO, E.; MCCRINDLE, S. L.; COUPERWHITE, I.; NEILAN, B. A. Insertion of an *E. coli* lacZ gene in *Acetobacter xylinus* for the production of cellulose in whey. **FEMS Microbiology Letters**, v. 231, n. 2, p. 253–260, 2004.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY TESTING BY A STANDARDIZED SINGLE DISK METHOD. **The American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493–496, 1966.

BENADUCCI, D.; BRANCIFORTI, M. C. Estudo da estabilidade térmica e propriedades mecânicas de nanocompósitos de poliamida 6,6 com nanofibras de celulose. **Revista Matéria**, v. 21, n. 4, p. 898–905, 2016.

BERNARDI, L. A. **Manual de Plano de Negócios: fundamentos, processos e estruturação**. 2. ed. São Paulo: Atlas, 2014.

BIELECKI, S.; KRYSTYNOWICZ, A.; TURKIEWICZ, M.; KALINOWSKA, H. Bacterial Cellulose. In: VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. (Eds.). **Biopolymers Online**. Belgium: Wiley, 2005. v. 1p. 37–46.

BISWAL, T.; BADJENA, S. K.; PRADHAN, D. Sustainable biomaterials and their applications: A short review. **Materials Today: Proceedings**, p. 1–9, 2020.

BLANCO, A.; MONTE, M. C.; CAMPANO, C.; BALEA, A.; MERAYO, N.; NEGRO, C.

Nanocellulose for Industrial Use: Cellulose Nanofibers (CNF), Cellulose Nanocrystals (CNC), and Bacterial Cellulose (BC). In: CHAUDHERY MUSTANSAR HUSSAIN (Ed.). **Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications**. Amsterdam: Elsevier, 2018. p. 74–126.

BOATENG, J.; CATANZANO, O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing — A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Nova York, v. 104, n. 11, p. 3653–3680, 2015.

BORGES, F. A.; BOLOGNESI, L. F. C.; TRECCO, A.; DRAGO, B. de C.; ARRUDA, L. B. De; FILHO, P. N. L.; PIERRI, E. G.; GRAEFF, C. F. de O.; SANTOS, A. G. Dos; MIRANDA, M. C. R.; HERCULANO, R. D. Natural Rubber Latex: Study of a Novel Carrier for Casearia sylvestris Swartz Delivery. **ISRN Polymer Science**, v. 2014, n. 1, p. 1–5, 2014.

BORGES, F. A.; SIGUEMATSU, P. R.; HERCULANO, R. D.; SANTOS, C. Dos. Novel sustained-release of Stryphnodendron obovatum leaves extract using natural rubber latex as carrier. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 3, p. 379–384, 2015.

BOWLER, P. G.; DUERDEN, B. I.; ARMSTRONG, D. G. Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 244–269, 2001.

BRANDES, R.; BOGADO, M.; CARMINATTI, C. A.; PEZZIN, A. P.; SACCHELLI, C. M.; ANTÔNIO, R. V.; RECOUVREUX, D. O. S. NANOCOMPÓSITO BÍOSSORVENTE DE QUITOSANA E NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA PARA A REMOÇÃO DE CONTAMINANTES DE EFLUENTES INDUSTRIAIS. In: 23º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS (CBECIMAT) 2018, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Anais do 23º CBECiMat, 2018.

BRANDES, R.; CARMINATTI, C.; MIKOWSKI, A.; AL-QURESHI, H.; RECOUVREUX, D. A Mini-Review on the Progress of Spherical Bacterial Cellulose Production. **Journal of Nano Research**, v. 45, p. 142–154, 2017.

BRASIL. **Manual de condutas para úlceras neurotróficas e traumáticas / Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BRASIL. **RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**, 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>

BRASIL. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRASSOLATTI, P.; BOSSINI, P. S.; OLIVEIRA, M. C. D.; ALMEIDA-LOPES, L.; ZANARDI, L. M.; NAPOLITANO, M. A.; AVÓ, L. R. S.; ARAÚJO-MOREIRA, F. M.; PARIZOTTO, N. A. Bacterial cellulose-based biomaterials on third-degree burns in rats. **International Journal of Advances in Medical Biotechnology - IJAMB**, v. 1,

n. 2, p. 31–36, 2018.

BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J. A. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6, n. 2, p. 127–139, 2011.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: ESTRATÉGIA E DISCUSSÃO. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129–146, 2003. Disponível em: <<http://revistas.ufpr.br/pesticidas/article/view/3173>>

BROWN, A. J. On an acetic ferment which forms cellulose. **J. Chem. Soc., Trans.**, v. 49, n. 432, p. 432–439, 1886.

BROWN JR., R. M. The biosynthesis of cellulose. **Food Hydrocolloids**, v. 1, n. 5–6, p. 345–351, 1987.

BROWN JR., R. M. Bacterial cellulose. **CELLULOSE: STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ASPECTS**, p. 145–151, 1989.

BROWN JR., R. M. The Biosynthesis of Cellulose. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry Publication**, v. 33, n. 10, p. 1345–1373, 1996.

BROWN JR., R. M. **Microbial Cellulose: A New Resource for Wood, Paper, Textiles, Food and Specialty Products**, 2004.

BRUNKEN, G. M. T. C.; SOUZA, I. A.; LIMA, L. S. G. L.; SILVA, W. E. **COMPOSIÇÃO À BASE DE BIOCELULOSE E AGENTES BIOATIVOS PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS**, Titular: Universidade Federal de Pernambuco. BR 10 2012 026425-0 A2. Depósito: 16 out. 2012. Concessão: 30 set. 2014., 2014.

CACICEDO, M. L.; CASTRO, M. C.; SERVETAS, I.; BOSNEA, L.; BOURA, K.; TSAFRAKIDOU, P.; DIMA, A.; TERPOU, A.; KOUTINAS, A.; CASTRO, G. R. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 172–180, 2016.

CACICEDO, M. L.; ISLAN, G. A.; DRACHEMBERG, M. F.; ALVAREZ, V. A.; BARTEL, L. C.; BOLZÁN, A. D.; CASTRO, G. R. Hybrid bacterial cellulose-pectin films for delivery of bioactive molecules. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 9, p. 7457–7467, 2018.

CAI, Z.; KIM, J. Preparation and Characterization of Novel Bacterial Cellulose/Gelatin Scaffold for Tissue Regeneration Using Bacterial Cellulose Hydrogel. **Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine**, v. 1, n. 2, p. 1–6, 2010.

CAI, Z.; YANG, G. Bacterial cellulose/collagen composite: Characterization and first evaluation of cytocompatibility. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 120, n. 5, p. 2938–2944, 2011.

CAMPANO, C.; BALEA, A.; BLANCO, A.; NEGRO, C. Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review. **Cellulose**, v. 23,

n. 1, p. 57–91, 2016.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Wound healing. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 20, n. 1, p. 51–58, 2007.

CAPELLA, S. O.; TILLMANN, M. T.; FÉLIX, A. O. C.; FONTOURA, E. G.; FERNANDES, C. G.; FREITAG, R. A.; SANTOS, M. A. Z.; FÉLIX, S. R.; NOBRE, M. O. Potencial cicatricial da *Bixa orellana* L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 1, p. 104–112, 2016.

CARTAXO-FURTADO, N. A. O.; BRANDÃO, D. O.; RAMOS JÚNIOR, F. J. L.; SILVA, K. M. A.; MACÊDO, R. O. Investigation of thermal and kinetic behavior of the *Stryphnodendron adstringens* dry extract with antimicrobial activity. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 138, n. 5, p. 3781–3788, 2019.

CARVALHO, F. A.; UCHINA, H. S.; BORGES, F. A.; OYAFUSO, M. H.; HERCULANO, R. D.; GREMIÃO, M. P. D.; SANTOS, A. G. Natural membranes of *Hevea brasiliensis* latex as delivery system for *Casearia sylvestris* leaf components. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 1, p. 102–110, 2018.

CASTRO, C.; ZULUAGA, R.; PUTAUX, J.-L.; CARO, G.; MONDRAGON, I.; GAÑÁN, P. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 96–102, 2011.

CAVALCANTI, L. M.; PINTO, F. C. M.; OLIVEIRA, G. M.; LIMA, S. V. C.; AGUIAR, J. L. D. A.; LINS, E. M. Efficacy of bacterial cellulose membrane for the treatment of lower limbs chronic varicose ulcers: a randomized and controlled trial. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v. 44, n. 1, p. 72–80, 2017.

CESCA, K.; NETTO, M. S.; ELY, V. L.; DOTTO, G. L.; FOLETTO, E. L.; HOTZA, D. Synthesis Of Spherical Bacterial Nanocellulose As A Potential Silver Adsorption Agent For Antimicrobial Purposes. **CELLULOSE CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**, v. 54, n. 3–4, p. 285–290, 2020.

CESCA, K.; RUFINO, I.; GODINHO, J.; PORTO, L. M. MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA E ALOE VERA COMO SISTEMA DE ENTREGA DE AGENTES TERAPÊUTICOS. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA (COBEC) 2014, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Anais do XX COBEC, 2014.

CHAGAS, B. S. **PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA EM MEIO À BASE DE MELAÇO DE SOJA EM CULTIVO ESTÁTICO**. 2018. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, 2018.

CHANDRASEKARAN, P. T.; BARI, N. K.; SINHA, S. Enhanced bacterial cellulose production from *Gluconobacter xylinus* using super optimal broth. **Cellulose**, v. 24, n. 10, p. 4367–4381, 2017.

CHANG, W.-S.; CHEN, H.-H. Physical properties of bacterial cellulose composites for wound dressings. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 75–83, 2016.

CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Microbial cellulose: Fermentative production and applications (Review). **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107–124, 2009.

CHEN, G.; WU, G.; CHEN, L.; WANG, W.; HONG, F. F.; JÖNSSON, L. J. Performance of nanocellulose-producing bacterial strains in static and agitated cultures with different starting pH. **Carbohydrate Polymers**, v. 215, p. 280–288, 2019. a.

CHEN, J.; CHEN, C.; LIANG, G.; XU, X.; HAO, Q.; SUN, D. In situ preparation of bacterial cellulose with antimicrobial properties from bioconversion of mulberry leaves. **Carbohydrate Polymers**, v. 220, p. 170–175, 2019. b.

CHEN, X.; CHEN, J.; YOU, T.; WANG, K.; XU, F. Effects of polymorphs on dissolution of cellulose in NaOH/urea aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 125, p. 85–91, 2015.

CHOUHAN, D.; DEY, N.; BHARDWAJ, N.; MANDAL, B. B. Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: Current status and advances. **Biomaterials**, v. 216, p. 119267, 2019.

COELHO, J. M.; ANTONIOLLI, A. B.; SILVA, D. N.; CARVALHO, T. M. M. B.; PONTES, E. R. J. C.; ODASHIRO, A. N. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, n. 1, p. 045–051, 2010.

COIMBRA, C. G. O. **Produção de celulose bacteriana por *Gluconacetobacter xylinus* e elaboração de filmes comestíveis**. 2016. 139 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, 2016.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Optimisation of the extraction of phenolic compounds and antioxidant activity from aerial parts of *Bidens pilosa* L. using response surface methodology. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 11, p. 2420–2427, 2011.

CÔRTEZ, S. M. dos S. **AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO ESTIMULADA POR ACELERADORES, EM PACIENTES ADULTOS COM HANSENÍASE, PORTADORES DE ÚLCERAS PLANTARES**. 2008. Universidade de Brasília, 2008.

COSTA, A. F. S.; ALMEIDA, F. C. G.; VINHAS, G. M.; SARUBBO, L. A. Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* Using Corn Steep Liquor As Nutrient Sources. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–12, 2017.

COSTA, A. F. S.; AMORIM, J. D. P.; ALMEIDA, F. C. G.; LIMA, I. D.; PAIVA, S. C.; ROCHA, M. A. V.; VINHAS, G. M.; SARUBBO, L. A. Dyeing of bacterial cellulose films using plant-based natural dyes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 580–587, 2019.

COSTA, D. F. G.; FRANCA, J. R.; RIBEIRO, T. G.; KAPLAN, M. A. C.; FARACO, A. A. G.; CASTILHO, R. O. Development and characterization of polymeric nanoparticles as Barbatimão (*Stryphnodendron obovatum*) standardized fraction carrier. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 04, n. 01, p. 89–92, 2013.

COSTA, N. N.; LOPES, L. de F.; FERREIRA, D. F.; PRADO, E. M. L. De; SEVERI, J. A.; RESENDE, J. A.; CARETA, F. de P.; FERREIRA, M. C. P.; CARREIRA, L. G.; SOUZA, S. O. L. De; COTRIM, M. A. P.; BOEING, T.; ANDRADE, S. F. De; ORÉFICE, R. L.; JANAI. Polymeric films containing pomegranate peel extract based on PVA/ starch/ PAA blends for use as wound dressing: In vitro analysis and physicochemical evaluation. **Materials Science & Engineering C**, v. 109, p. 1–13, 2020.

COUCHERON, D. H. An *Acetobacter xylinum* insertion sequence element associated with inactivation of cellulose production. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 18, p. 5723–5731, 1991.

CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN JR., R. M. The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2007.

CZAJA, W.; KRYSZYŃOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN JR., R. M. Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145–151, 2006.

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.

DAVIDSON, J. R. Current Concepts in Wound Management and Wound Healing Products. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 45, n. 3, p. 537–564, 2015.

DAYAL, M. S.; GOSWAMI, N.; SAHAI, A.; JAIN, V.; MATHUR, G.; MATHUR, A. Effect of media components on cell growth and bacterial cellulose production from *Acetobacter acetii* MTCC 2623. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 12–16, 2013.

DEMIDOVA-RICE, T. N.; HAMBLIN, M. R.; HERMAN, I. M. Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 25, n. 7, p. 304–314, 2012.

DENG, Y.; NAGACHAR, N.; XIAO, C.; TIEN, M.; KAO, T. Identification and Characterization of Non-Cellulose-Producing Mutants of *Gluconacetobacter hansenii* Generated by Tn5 Transposon Mutagenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 22, p. 5072–5083, 2013.

DONINI, Í. A. N. **Desenvolvimento de métodos de cultivo de *Gluconacetobacter xylinus* para obtenção de compósitos à base de celulose bacteriana e colágeno tipo I adicionado in situ**. 2011. 105 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Instituto de Química da Universidade

Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho,” Araraquara, 2011.

DONINI, Í. a N.; SALVI, D. T. B. De; FUKUMOTO, F. K.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S.; MARCHETTO, R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Ecletica Química**, v. 35, n. 4, p. 165–178, 2010.

DORNELAS, J. C. A. **No Empreendedorismo: Transformando Idéias em Negócio**. 2. ed. São Paulo: Elsevier, 2005.

DUCHEMIN, B. J. C.; MATHEW, A. P.; OKSMAN, K. All-cellulose composites by partial dissolution in the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium chloride. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 40, n. 12, p. 2031–2037, 2009.

DUDMAN, W. F. Cellulose Production by Acetobacter Strains in Submerged Culture. **Journal of general microbiology**, v. 22, p. 25–39, 1960.

DUTRA, J. A. P.; CARVALHO, S. G.; ZAMPIROLI, A. C. D.; DALTOÉ, R. D.; TEIXEIRA, R. M.; CARETA, F. de P.; COTRIM, M. A. P.; ORÉFICE, R. L.; VILLANOVA, J. C. O. Papain wound dressings obtained from poly (vinyl alcohol)/ calcium alginate blends as new pharmaceutical dosage form: Preparation and preliminary evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 113, n. 1, p. 11–23, 2017.

EDWARDS, R.; HARDING, K. G. Bacteria and wound healing Colonisation Contamination. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 91–96, 2004.

EFSTRATIOU, E.; HUSSAIN, A. I.; NIGAM, P. S.; MOORE, J. E.; AYUB, M. A.; RAO, J. R. Antimicrobial activity of Calendula officinalis petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 18, n. 3, p. 173–176, 2012.

EL-HOSEN, S. M.; BASMAJI, P.; OLYVEIRA, G. M.; COSTA, L. M. M.; ALWAHEDI, A. M.; OLIVEIRA, J. D. C.; FRANCOZO, G. B. Natural ECM-Bacterial Cellulose Wound Healing—Dubai Study. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 06, n. 04, p. 237–246, 2015.

EL-SAIED, H.; EL-DIWANY, A. I.; BASTA, A. H.; ATWA, N. A.; EL-GHWAS, D. E. Production and characterization of economical bacterial cellulose. **BioResources**, v. 3, n. 4, p. 1196–1217, 2008.

EL-WAKIL, N. A.; HASSAN, E. A.; HASSAN, M. L.; EL-SALAM, S. S. A. Bacterial cellulose/phytochemical's extracts biocomposites for potential active wound dressings. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 26529–26541, 2019.

ELANGO, A.; SHANMUGAM, R.; ARIVAZHAGAN, G.; MAHENDRAPRABU, A.; KARTHICK, N. K. Intermolecular forces in acetonitrile + ethanol binary liquid mixtures. **Chemical Physics Letters**, v. 639, p. 161–165, 2015.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M.; HALL, R. P. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 3, p. 514–525, 2007.

ESGUERRA, M.; FINK, H.; LASCHKE, M. W.; JEPPSSON, A.; DELBRO, D.; GATENHOLM, P.; MENDER, M. D.; RISBERG, B. Intravital fluorescent microscopic evaluation of bacterial cellulose as scaffold for vascular grafts. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 93A, n. 1, p. 140–149, 2010.

FALCÃO, L.; ARAÚJO, M. E. M. Tannins characterization in historic leathers by complementary analytical techniques ATR-FTIR, UV-Vis and chemical tests. **Journal of Cultural Heritage**, v. 14, n. 6, p. 499–508, 2013.

FANG, L.; CATCHMARK, J. M. Characterization of cellulose and other exopolysaccharides produced from *Gluconacetobacter* strains. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 663–669, 2015.

FARAG, S.; ASKER, M. M. S.; MAHMOUD, M. G.; IBRAHIM, H.; AMR, A. Comparative Study for Bacterial Cellulose Production Using Egyptian *Achromobacter* sp. **Research Journal of Pharmaceutical , Biological and Chemical Sciences**, v. 7, n. 6, p. 954–969, 2016.

FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Nanobiotecnologia: plataforma tecnológica para biomateriais e aplicação biológica de nanoestruturas. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 32–53, 2012.

FARIA, T. Y. F.; SANTOS, T. R. A. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO PRODUTIVO ARTESANAL DE RAPADURA ORGÂNICA ATRAVÉS DA METODOLOGIA 5S. **Revista Latino-Americana de Inovação e Engenharia de Produção**, v. 9, n. 15, p. 203-221, 2021.

FARRAG, A. A.; SALEH, A. K.; SOLIMAN, N. A.; IBRAHIM, M. M.; EL-SHINNAWY, N. A.; ABDEL-FATTAH, Y. R. Biocellulose Production by *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769: Application of Statistical Experimental Designs and Cellulose Membrane Characterization. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 62, n. 11, p. 2077–2092, 2019.

FELTZ, A. V.; CORDEIRO, C. L. V.; NEVES, E. Z.; GARCIA, M. C. F.; APATI, G. P.; PEZZIN, A. P. T.; SCHNEIDER, A. L. S. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA INCORPORADAS COM EXTRATO DE PRÓPOLIS. In: 23º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS (CBECIMAT) 2018, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Anais do 23º CBECiMat, 2018.

FERREIRA, A. M.; SOUZA, B. M. V.; RIGOTTI, M. A.; LOUREIRO, M. R. D. Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 46, n. 3, p. 752–760, 2012.

FILHO, A. B. N. **Projeto e Desenvolvimento de Produtos**. São Paulo: Atlas, 2009.

FLEISCHER, T. C.; AMEADE, E. P. K.; MENSAH, M. L. K.; SAWER, I. K. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 1–2, p. 136–138, 2003.

FLETCHER, J. Differences between acute and chronic wounds and the role of. **Nursing Standard**, v. 22, n. 24, p. 62–68, 2008.

FONSECA, P. Da; LIBRANDI, A. P. L. Avaliação das características físico-químicas e fitoquímicas de diferentes tinturas de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 271–277, 2008.

FONSECA, T. N.; TEIXEIRA, P. S.; MOURA, E. De; GERALDO, Á. B. C. STUDY OF BIXIN OXIDATION BY IONIZING IRRADIATION. In: INTERNATIONAL NUCLEAR ATLANTIC CONFERENCE (INAC) 2017, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Anais do INAC, 2017.

FONTANA, J. D.; JOERKE, C. G.; BARON, M.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, A. G.; TORRIANI, I.; SOUZA, A. M.; SOARES, M. B.; FONTANA, M. A.; GUIMARAES, M. F. Acetobacter cellulosic biofilms search for new modulators of cellulogenesis and native membrane treatments. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63–65, n. 1, p. 327–338, 1997.

FONTANA, J. D.; SOUZA, A. M.; FONTANA, C. K.; TORRIANI, I. L.; MORESCHI, J. C.; GALLOTTI, B. J.; SOUZA, S. J.; NARCISCO, G. P.; BICHARA, J. A.; FARAH, L. F. X. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24–25, n. 1, p. 253–264, 1990.

FRAJÁCOMO, S. C. L. **Utilização de diferentes composições de meios e variações de condições de cultivo visando à otimização da produção de celulose bacteriana para uso em medicina**. 2017. Universidade de Araraquara (UNIARA), 2017.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432–1442, 2013.

FURLAN, S. A.; SCHNEIDER, A. L. S.; MERKLE, R.; CARVALHO-JONAS, M. D. F.; JONAS, R.; KAWAGUTI, H. Y.; MANRICH, E.; FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Formulation of a lactose-free, low-cost culture medium for the production of β -D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 7, p. 589–593, 2000.

GALÁRRAGA, J. C. V.; BARUD, H. S.; SANTOS, F. K.; DAVANSO, M.; PAZ-CEDEÑO, F. R.; DE PAULA, A. V.; MONTI, R.; MASARIN, F. MULTIPOINT IMMOBILIZATION AND STABILIZATION OF AMINED PEROXIDASES FROM SOYBEAN HULL AND CHAYOTE EMPLOYING BACTERIAL CELLULOSE AS SUPPORT. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 54, n. 3–4, p. 275–283, 2020.

GANGAWANE, A. K.; BHATT, B.; SUNMEET, M. Skin Infections in Diabetes: A Review. **Journal of Diabetes & Metabolism**, v. 7, n. 2, p. 2–5, 2016.

GARMS, B. C.; BORGES, F. A.; BARROS, N. R. De; MARCELINO, M. Y.; LEITE, M. N.; ARCO, M. C. Del; SALVADOR, S. L. de S.; PEGORIN, G. S.; OLIVEIRA, K. S. M.; FRADE, M. A. C.; HERCULANO, R. D. Novel polymeric dressing to the treatment of infected chronic wound. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 1, p. 4767–4778, 2019.

GATENHOLM, P.; KLEMM, D. Bacterial Nanocellulose as a Renewable Material for Biomedical Applications. **MRS Bulletin**, v. 35, n. 3, p. 208–213, 2010.

GEA, S.; REYNOLDS, C. T.; ROOHPUR, N.; WIRJOSENTONO, B.; SOYKEABKAEW, N.; BILOTTI, E.; PEIJS, T. 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, 2011.

GHASEMI-MOBARAKEH, L.; KOLAHREEZ, D.; RAMAKRISHNA, S.; WILLIAMS, D. Key terminology in biomaterials and biocompatibility. **Current Opinion in Biomedical Engineering**, v. 10, p. 45–50, 2019.

GIADA, M. L. R. **Avaliação da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos do cotilédono da semente de girassol (*Helianthus annuus* L.) rajada**. 2006. 233 f. Tese (Doutorado em Nutrição Experimental) - Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2006.

GINDRI, D. M.; COELHO, C. M. M.; UARROTA, V. G.; REBELO, A. M. Herbicidal bioactivity of natural compounds from *Lantana camara* on the germination and seedling growth of *Bidens pilosa*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 50, p. 1–12, 2020. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-40632020000100203&lng=en>

GODINHO, J. F.; BERTI, F. V.; MÜLLER, D.; RAMBO, C. R.; PORTO, L. M. Incorporation of *Aloe vera* extracts into nanocellulose during biosynthesis. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 545–555, 2016.

GOMES, F. P. A. **Biossíntese de Celulose Bacteriana a partir de Resíduos Industriais**. 2011. Universidade de Aveiro, 2011.

GOMES, F. S. L.; CARVALHO, D. V. TRATAMENTO DE FERIDA: REVISÃO DA LITERATURA. **Revista Mineira de Enfermagem**, v. 6, n. 1/2, p. 67–72, 2002.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 353–358, 2005.

GORINSTEIN, S.; PARK, Y.-S.; HEO, B.-G.; NAMIESNIK, J.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; HAM, K.-S.; CHO, J.-Y.; KANG, S.-G. A comparative study of phenolic compounds and antioxidant and antiproliferative activities in frequently consumed raw vegetables. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 6, p. 903–911, 2009.

GOTTSCHALK, L. M. F.; BARBOSA, I. R.; SOUZA, E. F.; BRÍGIDA, A. I. S.; PENHA,

E. M.; OLIVEIRA, E. M. M. AVALIAÇÃO DE DIFERENTES RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA POR *GLUCONACETOBACTER HANSENI*. In: VII WORKSHOP DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO 2014, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Anais do VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, 2014.

GOTTSCHALK, L. M. F.; BRÍGIDA, A. I. S.; PENHA, E. M.; SILVA, J. P. L.; SOUZA, E. F.; TERZI, S. C.; VIANA, L. A. N.; OLIVEIRA, E. M. M. AVALIAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA PELA CEPA *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 1431 EM MEIO SINTÉTICO. In: XIX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS (SINAFERM) E X SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS (SHEB) 2013, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Anais do XIX SINAFERM e X SHEB, 2013.

GRANDE, C. J.; TORRES, F. G.; GOMEZ, C. M.; TRONCOSO, O. P.; CANET-FERRER, J.; MARTÍNEZ-PASTOR, J. Development of self-assembled bacterial cellulose–starch nanocomposites. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 4, p. 1098–1104, 2009.

GRIFFITH, L. G. Polymeric biomaterials. **Biomaterials: Principles and Applications**, v. 48, n. 1, p. 263–277, 2000.

GULLO, M.; LA CHINA, S.; PETRONI, G.; DI GREGORIO, S.; GIUDICI, P. Exploring K2G30 Genome: A High Bacterial Cellulose Producing Strain in Glucose and Mannitol Based Media. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 58, p. 1–12, 2019.

GULLO, M.; SOLA, A.; ZANICHELLI, G.; MONTORSI, M.; MESSORI, M.; GIUDICI, P. Increased production of bacterial cellulose as starting point for scaled-up applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 22, p. 8115–8127, 2017.

GÜNDÜZ, G.; AŞIK, N. Production and Characterization of Bacterial Cellulose with Different Nutrient Source and Surface–Volume Ratios. **Drvna industrija**, v. 69, n. 2, p. 141–148, 2018.

GUSTAITE, S.; KAZLAUSKE, J.; BOBOKALONOV, J.; PERNI, S.; DUTSCHK, V.; LIESIENE, J.; PROKOPOVICH, P. Characterization of cellulose based sponges for wound dressings. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 480, p. 336–342, 2015.

HA, T. L. B.; QUAN, T. M.; AND, D. N. V.; SI, D. M. Naturally Derived Biomaterials: Preparation and Application. In: ANDRADE, J. A. (Ed.). **Regenerative Medicine and Tissue Engineering**. London: INTECH, 2013. p. 247–274.

HAIDA, K. S.; PARZIANELLO, L.; WERNER, S.; GARCIA, D. R.; INÁCIO, C. V. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 11, n. 3, p. 185–192, 2007.

HALBERT, A. R.; STACEY, M. C.; ROHR, J. B.; JOPP-MCKAY, A. THE EFFECT OF BACTERIAL COLONIZATION ON VENOUS ULCER HEALING. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 33, n. 2, p. 75–80, 1992.

HAMAMA, A. A.; NAWAR, W. W. Thermal decomposition of some phenolic antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 6, p. 1063–1069, 1991.

HAMEDI, S.; SHOJAOSADATI, S. A.; NAJAFI, V.; ALIZADEH, V. A novel double-network antibacterial hydrogel based on aminated bacterial cellulose and schizophyllan. **Carbohydrate Polymers**, v. 229, p. 1–9, 2020.

HAN, G.; CEILLEY, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. **Advances in Therapy**, v. 34, n. 3, p. 599–610, 2017.

HASAN, N.; BIAK, D. R. A.; KAMARUDIN, S. Application of Bacterial Cellulose (BC) in Natural Facial Scrub. **International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology**, v. 2, n. 4, p. 272–275, 2012.

HELENIUS, G.; BÄCKDAHL, H.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; GATENHOLM, P.; RISBERG, B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 76A, n. 2, p. 431–438, 2006.

HESS, C. T. Practice Points Checklist for Factors Affecting Wound Healing. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 24, n. 4, p. 192–192, 2011.

HESSLER, N.; KLEMM, D. Alteration of bacterial nanocellulose structure by in situ modification using polyethylene glycol and carbohydrate additives. **Cellulose**, v. 16, n. 5, p. 899–910, 2009.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. **Biochemical Journal**, v. 58, n. 2, p. 345–352, 1954.

HIRAI, A.; TSUJI, M.; HORII, F. TEM study of band-like cellulose assemblies produced by *Acetobacter xylinum* at 4 °C. **Cellulose**, v. 9, n. 2, p. 105–113, 2002.

HOBIZAL, K. B.; WUKICH, D. K. Diabetic foot infections: current concept review Kimberlee. **Diabetic Foot & Ankle**, v. 3, n. 1, p. 1–8, 2012.

HODEL, K. V. S.; FONSECA, L. M. S.; SANTOS, I. M. S.; CERQUEIRA, J. C.; SANTOS-JÚNIOR, R. E.; NUNES, S. B.; BARBOSA, J. D. V.; MACHADO, B. A. S. Evaluation of Different Methods for Cultivating *Gluconacetobacter hansenii* for Bacterial Cellulose and Montmorillonite Biocomposite Production: Wound-Dressing Applications. **Polymers**, v. 12, n. 2, p. 267, 2020.

HOLZAPFEL, B. M.; REICHERT, J. C.; SCHANTZ, J.-T.; GBURECK, U.; RACKWITZ, L.; NÖTH, U.; JAKOB, F.; RUDERT, M.; GROLL, J.; HUTMACHER, D. W. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 4, p. 581–603, 2013.

HOSPITAL SANTA CLARA. **Saiba mais sobre o pé diabético**. 2014. Disponível em: <<https://hospitalsantaclara.com.br/saiba-mais-sobre-o-pe-diabetico/>>. Acesso em: 20 mar. 2020.

HU, W.; CHEN, S.; YANG, J.; LI, Z.; WANG, H. Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1043–1060,

2014.

HUANG, Y.; ZHU, C.; YANG, J.; NIE, Y.; CHEN, C.; SUN, D. Recent advances in bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 21, n. 1, p. 1–30, 2014.

HUTCHENS, S. A.; LEÓN, R. V.; O'NEILL, H. M.; EVANS, B. R. Statistical analysis of optimal culture conditions for *Gluconacetobacter hansenii* cellulose production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 175–180, 2007.

IBÁ - INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **Cenários IBÁ – 4º Trimestre de 2021**. 2021. Disponível em: <https://iba.org/datafiles/publicacoes/cenarios/68cenarios_2.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2022.

IDF. **IDF Diabetes Atlas 2021**. 10. ed. Brussels, Belgium: Federação Internacional de Diabetes, 2021.

IGUCHI, M.; MITSUHASHI, S.; ICHIMURA, K.; NISHI, Y.; URYU, M.; YAMANAKA, S.; WATANABE, K. **Bacterial cellulose-containing molding material having high dynamic strength** 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.

IQBAL, H. M. N.; KYAZZE, G.; TRON, T.; KESHAVARZ, T. Laccase-assisted grafting of poly(3-hydroxybutyrate) onto the bacterial cellulose as backbone polymer: Development and characterisation. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 131–137, 2014.

JACEK, P.; RYNGAJŁŁO, M.; BIELECKI, S. Structural changes of bacterial nanocellulose pellicles induced by genetic modification of *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 13, p. 5339–5353, 2019.

JACOBSON, T. K. B.; GARCIA, J.; SANTOS, S. C.; DUARTE, J. B.; FARIAS, J. G.; KLIEMANN, H. J. INFLUÊNCIA DE FATORES EDÁFICOS NA PRODUÇÃO DE FENÓIS TOTAIS E TANINOS DE DUAS ESPÉCIES DE BARBATIMÃO. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 3, p. 163–169, 2005.

JADHAV, D. L.; KARTHICK, N. K.; KANNAN, P. P.; SHANMUGAM, R.; ELANGO VAN, A.; ARIVAZHAGAN, G. Molecular interaction forces in acetone + ethanol binary liquid solutions: FTIR and theoretical studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1130, p. 497–502, 2017.

JII, S.; UDHAYAKUMAR, S.; ROSE, C.; MURALIDHARAN, C.; KADIRVELU, K. Thymol enriched bacterial cellulose hydrogel as effective material for third degree burn wound repair. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 452–460, 2019.

JONAS, R.; FARAH, L. F. Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1–3, p. 101–106, 1998.

JOZALA, A. F.; LENCASTRE-NOVAES, L. C.; LOPES, A. M.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; MAZZOLA, P. G.; PESSOA-JR, A.; GROTO, D.; GERENUTTI, M.; CHAUD, M. V. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2063–2072, 2016.

JOZALA, A. F.; PÉRTILE, R. A. N.; SANTOS, C. A.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; SECKLER, M. M.; GAMA, F. M.; PESSOA JR, A. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1181–1190, 2015.

JUGEND, D.; SILVA, S. L. **Inovação e Desenvolvimento de Produtos - Práticas de Gestão e Casos Brasileiros**. São Paulo: LTC, 2013.

JUNG, H.-I.; JEONG, J.-H.; LEE, O.-M.; PARK, G.-T.; KIM, K.-K.; PARK, H.-C.; LEE, S.-M.; KIM, Y.-G.; SON, H.-J. Influence of glycerol on production and structural-physical properties of cellulose from *Acetobacter* sp. V6 cultured in shake flasks. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 10, p. 3602–3608, 2010.

KAČURÁKOVÁ, M.; SMITH, A. C.; GIDLEY, M. J.; WILSON, R. H. Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 12, p. 1145–1153, 2002.

KAMAMOTO, F.; CARVALHO, V. F. Utilização de terapia por pressão negativa tópica em feridas complexas. In: MALAGUTTI, W.; KAKIHARA, C. T. (Eds.). **Curativos, Estomia e Dermatologia: uma abordagem multiprofissional**. 2. ed. São Paulo: Martinari, 2011.

KARATHANOS, V. T.; KANELLOPOULOS, N. K.; BELESSIOTIS, V. G. Development of porous structure during air drying of agricultural plant products. **Journal of Food Engineering**, v. 29, n. 2, p. 167–183, 1996.

KAYRA, N.; AYTEKIN, A. Ö. Synthesis of Cellulose-Based Hydrogels: Preparation, Formation, Mixture, and Modification. In: MONDAL, I. H. (Ed.). **Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels**. Berlin: Springer, 2019. p. 407–434.

KESHK, S. M. A. S. Vitamin C enhances bacterial cellulose production in *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 98–100, 2014.

KHALID, A.; ULLAH, H.; UL-ISLAM, M.; KHAN, R.; KHAN, S.; AHMAD, F.; KHAN, T.; WAHID, F. Bacterial cellulose–TiO₂ nanocomposites promote healing and tissue regeneration in burn mice model. **RSC Advances**, v. 7, n. 75, p. 47662–47668, 2017.

KHAN, S.; UL-ISLAM, M.; KHATTAK, W. A.; ULLAH, M. W.; PARK, J. K. Bacterial cellulose-titanium dioxide nanocomposites: nanostructural characteristics, antibacterial mechanism, and biocompatibility. **Cellulose**, v. 22, n. 1, p. 565–579, 2015.

KHANAFARI, A.; ZANGENEH, G. Y. N.; SHARIFNIA, F. Combined Application of Microbial Cellulose and Papaver macrostomum Extract on Bedsore Microorganisms. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 220–225, 2013.

KHATTAK, W. A.; KHAN, T.; UL-ISLAM, M.; WAHID, F.; PARK, J. K. Production, Characterization and Physico-mechanical Properties of Bacterial Cellulose from Industrial Wastes. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 23, n. 1, p. 45–53, 2015.

KIM, B.-S.; BAEZ, C. E.; ATALA, A. Biomaterials for tissue engineering. **World Journal of Urology**, v. 18, p. 2–9, 2000.

KIM, J.; CAI, Z.; LEE, H. S.; CHOI, G. S.; LEE, D. H.; JO, C. Preparation and characterization of a Bacterial cellulose/Chitosan composite for potential biomedical application. **Journal of Polymer Research**, v. 18, n. 4, p. 739–744, 2011.

KINGKAEW, J.; KIRDPONPATTARA, S.; SANCHAVANAKIT, N.; PAVASANT, P.; PHISALAPHONG, M. Effect of molecular weight of chitosan on antimicrobial properties and tissue compatibility of chitosan-impregnated bacterial cellulose films. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 19, n. 3, p. 534–544, 2014.

KIRDPONPATTARA, S.; PHISALAPHONG, M.; KONGRUANG, S. Gelatin-bacterial cellulose composite sponges thermally cross-linked with glucose for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 177, p. 361–368, 2017.

KIZILTAS, E. E.; KIZILTAS, A.; GARDNER, D. J. Synthesis of bacterial cellulose using hot water extracted wood sugars. **Carbohydrate Polymers**, v. 124, p. 131–138, 2015.

KLEMM, D.; CRANSTON, E. D.; FISCHER, D.; GAMA, M.; KEDZIOR, S. A.; KRALISCH, D.; KRAMER, F.; KONDO, T.; LINDSTRÖM, T.; NIETZSCHE, S.; PETZOLD-WELCKE, K.; RAUCHFUSS, F. Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science: Today's state. **Materials Today**, v. 21, n. 7, p. 720–748, 2018.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.-P.; BOHN, A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.

KLEMM, D.; KRAMER, F.; MORITZ, S.; LINDSTRÖM, T.; ANKERFORS, M.; GRAY, D.; DORRIS, A. Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 24, p. 5438–5466, 2011.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; KRAMER, F.; HESSLER, N.; HORNUNG, M.; SCHMAUDER, H.-P.; MARSCH, S. Nanocelluloses as Innovative Polymers in Research and Application. In: KLEMM, D. O. (Ed.). **Advances in Polymer Science**. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2006. v. 205p. 49–96.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1561–1603, 2001.

KOEHLER, J.; BRANDL, F. P.; GOEPFERICH, A. M. Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds. **European Polymer Journal**, v. 100, p. 1–11, 2018.

KORRAPATI, P. S.; BABU, M. Collagen based dressings - a review. **BURNS**, v. 26, n. 1, p. 54–62, 2000.

KRISHNAN, A.; THOMAS, S. Recent advances on herb-derived constituents-incorporated wound-dressing materials: A review. **Polymers Advanced Technologies**, v. 30, n. 4, p. 1–16, 2019.

LACRUZ, J. A. **Plano de negócio: passo a passo**. Rio de Janeiro: Qualitymark, 2008.

LAZARINI, S. C.; AQUINO, R.; AMARAL, A. C.; CORBI, F. C. A.; CORBI, P. P.; BARUD, H. S.; LUSTRI, W. R. Characterization of bilayer bacterial cellulose membranes with different fiber densities: a promising system for controlled release of the antibiotic ceftriaxone. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 737–748, 2016.

LEE, K.; BULDUM, G.; MANTALARIS, A.; BISMARCK, A. More Than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Biosynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, n. 1, p. 10–32, 2014.

LEISINGER, T.; WIEMKEN, A.; ETTLINGER, L. Über cellulosefreie Mutanten von *Acetobacter xylinus*. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 54, n. 1, p. 21–36, 1966.

LEITE, L. R. V. **FARMACOLOGIA DAS FERIDAS: UMA REVISÃO DE LITERATURA**. 2018. 58 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Cuité, 2018.

LEMO, A. R.; RÊGO JÚNIOR, N. O.; JOSÉ, A. R. S.; PEREIRA, M. L. A.; SILVA, M. V. Atividade antioxidante e correlação com fenólicos totais em genótipos de Urucum (*Bixa orellana* L.). **Revista Do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 1, p. 62–68, 2011.

LI, Y.-Y.; WANG, B.; MA, M.-G.; WANG, B. Review of Recent Development on Preparation, Properties, and Applications of Cellulose-Based Functional Materials. **International Journal of Polymer Science**, v. 2018, p. 1–18, 2018.

LI, Y.; JIANG, H.; ZHENG, W.; GONG, N.; CHEN, L.; JIANG, X.; YANG, G. Bacterial cellulose-hyaluronan nanocomposite biomaterials as wound dressings for severe skin injury repair. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 17, p. 3498–3507, 2015.

LIAKOS, I.; RIZZELLO, L.; HAJIALI, H.; BRUNETTI, V.; CARZINO, R.; POMPA, P. P.; ATHANASSIOU, A.; MELE, E. Fibrous wound dressings encapsulating essential oils as natural antimicrobial agents. **Journal of Materials Chemistry B: Materials for biology and medicine**, v. 3, n. 1, p. 1583–1589, 2015.

LIMA, H. L. S.; NASCIMENTO, E. S.; ANDRADE, F. K.; BRÍGIDA, A. I. S.; BORGES, M. F.; CASSALES, A. R.; MUNIZ, C. R.; SOUZA FILHO, M. S. M.; MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F. Bacterial Cellulose Production by *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 Using Sisal Juice - An Agroindustry Waste. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 3, p. 671–680, 2017.

LIMA, L. L.; TAKETA, T. B.; BEPPU, M. M.; SOUSA, I. M. O.; FOGLIO, M. A.; MORAES, Â. M. Coated electrospun bioactive wound dressings: Mechanical properties and ability to control lesion microenvironment. **Materials Science and Engineering: C**, v. 100, p. 493–504, 2019.

LIMA, L. R.; SANTOS, D. B.; SANTOS, M. V.; BARUD, H. S.; HENRIQUE, M. A.; PASQUINI, D.; PECORARO, E.; RIBEIRO, S. J. L. NANOCRISTAIS DE CELULOSE A PARTIR DE CELULOSE BACTERIANA. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1140–1147, 2015.

LIN, S.-B.; CHEN, C.-C.; CHEN, L.-C.; CHEN, H.-H. The bioactive composite film prepared from bacterial cellulose and modified by hydrolyzed gelatin peptide. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 29, n. 10, p. 1428–1438, 2015. a.

LIN, S.-P.; CALVAR, I. L.; CATCHMARK, J. M.; LIU, J.-R.; DEMIRCI, A.; CHENG, K.-C. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 20, n. 5, p. 2191–2219, 2013. a.

LIN, S.; CHEN, L.; CHEN, H. PHYSICAL CHARACTERISTICS OF SURIMI AND BACTERIAL CELLULOSE COMPOSITE GEL. **Journal of Food Process Engineering**, v. 34, p. 1363–1379, 2011.

LIN, W.; LIEN, C.; YEH, H.; YU, C.; HSU, S. Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 603–611, 2013. b.

LIN, Y.-C.; WEY, Y.-C.; LEE, M.-L.; LIN, P.-C. **Cosmetic composition containing fragments of bacterial cellulose film and method for manufacturing thereof**, US 20150216784A1, 2015. b.

LINDMAN, B.; KARLSTRÖM, G.; STIGSSON, L. On the mechanism of dissolution of cellulose. **Journal of Molecular Liquids**, v. 156, n. 1, p. 76–81, 2010.

LIU, M.; ZENG, X.; MA, C.; YI, H.; ALI, Z.; MOU, X.; LI, S.; DENG, Y.; NONGYUE, H. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. **Bone Research**, v. 5, p. 1–20, 2017.

LONGO, W. P. Ciência e Tecnologia: evolução, inter-relação e perspectivas. In: 9º ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO (ENEGEP) 1989, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Anais 9º ENEGEP, 1989.

LOPES, P. V. **PREPARO E ENSAIO ANTIMICROBIANO DE BIOPOLÍMERO FORMADO POR MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA ASSOCIADA A NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO**. 2019. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2019.

LYNCH, K. M.; ZANNINI, E.; WILKINSON, S.; DAENEN, L.; ARENDT, E. K. Physiology of Acetic Acid Bacteria and Their Role in Vinegar and Fermented Beverages. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 3, p. 587–625, 2019.

MACHADO, E. **PLANO DE NEGÓCIOS: UMA ABORDAGEM BASEADA NA GESTÃO DO CONHECIMENTO**. 2012. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Gestão do Conhecimento) - Programa de Pós-graduação em Engenharia e Gestão do Conhecimento, Universidade Federal de Santa Catarina para (UFSC), Florianópolis, 2012.

MACHADO, R. T. A.; MENEGUIN, A. B.; SÁBIO, R. M.; FRANCO, D. F.; ANTONIO, S. G.; GUTIERREZ, J.; TERCJAK, A.; BERRETTA, A. A.; RIBEIRO, S. J. L.; LAZARINI, S. C.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S. Komagataeibacter rhaeticus grown in sugarcane molasses-supplemented culture medium as a strategy for enhancing bacterial cellulose production. **Industrial Crops and Products**, v. 122, n. June, p. 637–646, 2018.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MAICZUK, J; ANDRADE JÚNIOR, P. P. Aplicação de ferramentas de melhoria de qualidade e produtividade nos processos produtivos: um estudo de caso. **Qualitas Revista Eletrônica**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2013.

MANDELBAUM, S. H.; SANTIS, É. P. Di; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393–410, 2003. a.

MANDELBAUM, S. H.; SANTIS, É. P. Di; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Part II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 5, p. 525–542, 2003. b.

MANERA, A. P.; ORES, J. C.; RIBEIRO, V. A.; RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J.; MAUGERI FILHO, F. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 2, p. 155–161, 2011.

MARKET RESEARCH. **Global Microbial and Bacterial Cellulose Market Growth 2021-2026**. 2021. Disponível em: <<https://www.marketresearch.com/LP-Information-Inc-v4134/Global-Microbial-Bacterial-Cellulose-Growth-14811744/>>. Acesso em: 12 mar. 2022.

MARKETS AND MARKETS. **Biomaterials Market worth \$207 billion by 2024**. 2019. Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/global-biomaterials.asp>>. Acesso em: 20 feb. 2020.

MARQUELE-OLIVEIRA, F.; BARUD, H. S.; TORRES, E. C.; MACHADO, R. T. A.; CAETANO, G. F.; LEITE, M. N.; FRADE, M. A. C.; RIBEIRO, S. J. L.; BERRETTA, A. A. Development, characterization and pre-clinical trials of an innovative wound healing dressing based on propolis (EPP-AF®)-containing self-microemulsifying formulation incorporated in biocellulose membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 570–578, 2019.

MASAOKA, S.; OHE, T.; SAKOTA, N. Production of cellulose from glucose by

Acetobacter xylinum. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 1, p. 18–22, 1993.

MICHALSKI, E. Z.; MENEGOL, D.; REIS, L.; CAMASSOLA, M.; PINHEIRO, A. J.; DILLON. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE PRODEX NA PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES POR *PENICILLIUM ECHINULATUM* EM CULTIVOS EM ESTADO SÓLIDO. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS 2008, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Anais do Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2008.

MIKKELSEN, D.; FLANAGAN, B. M.; DYKES, G. A.; GIDLEY, M. J. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 2, p. 576–583, 2009.

MOCANU, A.; ISOPENCU, G.; BUSUIOC, C.; POPA, O.-M.; DIETRICH, P.; SOCACIU-SIEBERT, L. Bacterial cellulose films with ZnO nanoparticles and propolis extracts: Synergistic antimicrobial effect. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 176–187, 2019.

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. A novel biomaterial: bacterial cellulose and its new era applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 101–110, 2014.

MOLIN, M. L.; SEGAT, B.; NEVES, E. Z.; GARCIA, M. C. F.; APATI, G. P.; SILVEIRA, M. L. L.; PEZZIN, A. P. T.; SCHNEIDER, A. L. S. Desenvolvimento e caracterização de membrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de hamamélis. In: 15º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS (CBPOL) 2019, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Anais do 15º CBPol, 2019.

MONA, S.; BAJAR, S.; DEEPAK, B.; KIRAN, B.; KAUSHIK, A. Microbial cellulose: production and application. In: GRUMEZESCU, V.; GRUMEZESCU, A. M. (Eds.). **Materials for Biomedical Engineering**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 309–322.

MOOSAVI-NASAB, M.; YOUSEFI, A. Biotechnological production of cellulose by *Gluconacetobacter Xylinus* from agricultural waste. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 94–101, 2011.

MORAES, P. R. F. de S.; SASKA, S.; BARUD, H. S.; LIMA, L. R.; MARTINS, V. da C. A.; PLEPIS, A. M. de G.; RIBEIRO, S. J. L.; GASPAR, A. M. M. Bacterial Cellulose/Collagen Hydrogel for Wound Healing. **Materials Research**, v. 19, n. 1, p. 106–116, 2016.

MORAES, P. R. F. S.; RIBEIRO, S. J. L.; GASPAR, A. M. M. Bacterial cellulose/phytotherapeutic hydrogels as dressings for wound healing. **Material Science & Engineering International Journal**, v. 3, n. 5, p. 162–173, 2019.

MORAIS, D. C. M.; BARROS, P. O.; TAMOS, E. F.; ZUIM, N. R. B. AÇÃO CICATRIZANTE DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS: d-PANTENOL, ÓLEO DE GIRASSOL, PAPAÍNA, PRÓPOLIS E FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS. **Foco**, v. 4, n. 4, p. 83–98, 2013.

MORAIS, L. S. De; GUIMARÃES, G. S.; ELIAS, C. N. Liberação de íons por biomateriais metálicos. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 12, n. 6, p. 48–53, 2007.

MOREIRA, V. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; MORAES, M. O. B.; JOSÉ, A. R. S.; SILVA, M. V. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE URUCUM (Bixa orellana L.) IN NATURA E ENCAPSULADO. **Revista Iberoamericana de Tecnologia Postcosecha**, v. 15, n. 2, p. 201–209, 2014.

MORESCHI, D. A. B.; LEITE-MELLO, E. V. S.; BUENO, F. G. AÇÃO CICATRIZANTE DE PLANTAS MEDICINAIS: UM ESTUDO DE REVISÃO. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 22, n. 1, p. 63–69, 2018.

MUALLA, S. A.; FARAHAT, R.; BASMAJI, P.; OLYVEIRA, G. M.; COSTA, L. M. M.; OLIVEIRA, J. D. C.; FRANCOZO, G. B. Study of Nanoskin ECM-Bacterial Cellulose Wound Healing/United Arab Emirates. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 07, n. 02, p. 109–117, 2016.

MUANGMAN, P.; PUNDEE, C.; OPASANON, S.; MUANGMAN, S. A prospective, randomized trial of silver containing hydrofiber dressing versus for the treatment of partial thickness burns. **International Wound Journal**, v. 7, n. 4, p. 271–276, 2010.

MURPHY, P. S.; EVANS, G. R. D. Advances in Wound Healing : A Review of Current Wound Healing Products. **Plastic Surgery International**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

MUTHUMANICKAM, A.; SUBRAMANIAN, S.; SATHIYARAJ, M.; PREETHI, P.; ASHWINI, M. Materials Today: Proceedings Development of herb based (Nigella sativa) eri silk nanofibrous mat for biomedical applications. **Materials Today: Proceedings**, v. 16, p. 8–11, 2019.

NAPAVICHAYANUN, S.; AMPAWONG, S.; HARNSILPONG, T.; ANGSPATT, A.; ARAMWIT, P. Inflammatory reaction, clinical efficacy, and safety of bacterial cellulose wound dressing containing silk sericin and polyhexamethylene biguanide for wound treatment. **Archives of Dermatological Research**, v. 310, n. 10, p. 795–805, 2018.

NASCIMENTO, E. S. **EXTRATO DE ALGAROA COMO FONTE ALTERNATIVA PARA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA**. 2014. Universidade Federal do Ceará, 2014.

NASCIMENTO, E. S.; LIMA, H. L. S.; ANDRADE, F. K.; BRÍGIDA, A. I. S.; ROSA, M. F.; BORGES, M. F. EXTRATO DE ALGAROA COMO FONTE ALTERNATIVA PARA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA. In: 2 ° ENCONTRO NORDESTE DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE POLÍMEROS 2014, Salvador. **Anais...** Salvador: Anais do 2° Encontro Nordeste de Ciência e Tecnologia de Polímeros, 2014.

NEVES, E. Z.; GARCIA, M. C. F.; APATI, G. P.; PEZZIN, A. P. T.; SCHNEIDER, A. L. S. Desenvolvimento de membranas de celulose bacteriana com incorporação de extrato vegetal. In: 23º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS (CBECIMAT) 2018, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Anais do 23º CBECiMat, 2018.

NGUYEN, V. T.; FLANAGAN, B.; GIDLEY, M. J.; DYKES, G. A. Characterization of Cellulose Production by a Gluconacetobacter xylinus Strain from Kombucha. **Current Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 449–453, 2008.

NGUYEN, X. T. **Process for preparing microcrystalline cellulose**, 7005514, 2006.

NONAKA, I.; TAKEUCHI, H. **Criação de conhecimento na empresa: como as empresas japonesas geram a dinâmica da inovação**. 13. ed. Rio de Janeiro: Campus, 1997.

OECD. **Manual de Oslo: diretrizes para coleta e interpretação de dados sobre inovação**. 3. ed. Paris: OECD Publications, 2005.

OIKAWA, T.; OHTORI, T.; AMEYAMA, M. Production of Cellulose from D-Mannitol by Acetobacter xylinum KU-1. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 2, p. 331–332, 1995.

OLENNIKOV, D. N.; KASHCHENKO, N. I.; CHIRIKOVA, N. K.; AKOBIRSHOEVA, A.; ZILFIKAROV, I. N.; VENNOS, C. Isorhamnetin and Quercetin Derivatives as Anti-Acetylcholinesterase Principles of Marigold (*Calendula officinalis*) Flowers and Preparations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1–17, 2017.

OLIVEIRA, A. L. D.; SANTOS JR, V.; LIOTTI, R. G.; ZILIOI, E.; SPINOSA, W. A.; RIBEIRO-PAES, J. T. Estudo de bactérias do gênero gluconobacter: Isolamento, purificação, identificação fenotípica e molecular. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 106–112, 2010.

OVINGTON, L. G. Advances in wound dressings. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 33–38, 2007.

OWENS, N. Use of pressure dressings in the treatment of burns and other wounds. **Surgical Clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 1354–19966, 1943.

PACHECO, G.; DE MELLO, C. V.; CHIARI-ANDRÉO, B. G.; ISAAC, V. L. B.; RIBEIRO, S. J. L.; PECORARO, É.; TROVATTI, E. Bacterial cellulose skin masks—Properties and sensory tests. **Journal of Cosmetic Dermatology**, 2018. a.

PACHECO, G.; MELLO, C. V.; CHIARI-ANDRÉO, B. G.; ISAAC, V. L. B.; RIBEIRO, S. J. L.; PECORARO, É.; TROVATTI, E. Bacterial cellulose skin masks-Properties and sensory tests. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 17, n. 5, p. 840–847, 2018. b.

PALSSON, B. O.; BHATIA, S. N. **Tissue Engineering**. 1. ed. Upper Saddle River:

Prentice Hall, 2003.

PANERARI, A. D.; COSTA, H. O.; SOUZA, F. C.; CASTRO, M.; SILVA, L.; SOUSA NETO, O. M. Tracheal inflammatory response to bacterial cellulose dressing after surgical scarification in rabbits. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 74, n. 4, p. 512–522, 2008.

PARENTE, L. M. L.; SILVA, M. S. B.; BRITO, L. A. B.; LINO-JÚNIOR, R. S.; PAULA, J. R.; TREVENZOL, L. M. F.; ZATTA, D. T.; PAULO, N. M. Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 383–391, 2009.

PARK, J. K.; JUNG, J. Y.; PARK, Y. H. Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 24, p. 2055–2059, 2003.

PARK, J. K.; PARK, Y. H.; JUNG, J. Y. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK isolated from rotten apple. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, n. 2, p. 83–88, 2003.

PARK, S. U.; LEE, B. K.; KIM, M. S.; PARK, K. K.; SUNG, W. J.; KIM, H. Y.; HAN, D. G.; SHIM, J. S.; LEE, Y. J.; KIM, S. H.; KIM, I. H.; PARK, D. H. The possibility of microbial cellulose for dressing and scaffold materials. **International Wound Journal**, v. 11, n. 1, p. 35–43, 2014.

PASSARETTI, T.; GUARNIERI, A. P.; FILIPINI, R.; ALVES, B. C. A.; FONSECA, F. L. A. Eficácia do uso do Barbatimão (*Stryhnodendron barbatiman*) no processo de cicatrização em lesões: uma revisão de literatura. **ABCS Health Sciences**, v. 41, n. 1, p. 51–54, 2016.

PECORARO, É.; MANZANI, D.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. 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.

PEREIRA, R.; CARVALHO, A.; VAZ, D. C.; GIL, M. H.; MENDES, A.; BÁRTOLO, P. Development of novel alginate based hydrogel films for wound healing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, p. 221–230, 2013.

PERUGINI, P.; BLEVE, M.; REDONDI, R.; CORTINOVIS, F.; COLPANI, A. In vivo evaluation of the effectiveness of biocellulose facial masks as active delivery systems to skin. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 19, n. 3, p. 725–735, 2020.

PHANTHONG, P.; REUBROYCHAROEN, P.; HAO, X.; XU, G.; ABUDULA, A.; GUAN, G. Nanocellulose: Extraction and application. **Carbon Resources Conversion**, v. 1, n. 1, p. 32–43, 2018.

PHUYAL, N.; JHA, P. K.; RATURI, P. P.; RAJBHANDARY, S. Total Phenolic, Flavonoid Contents, and Antioxidant Activities of Fruit, Seed, and Bark Extracts of *Zanthoxylum armatum* DC. **The Scientific World Journal**, v. 2020, p. 1–7, 2020.

PIAIA, L.; PAES, C. Q.; PORTO, L. M. Viability of human dermal fibroblasts cultured on bacterial cellulose and Aloe vera composites. **BMC Proceedings**, v. 8, n. S4, p. 61–62, 2014.

PICCHI, J. B. **Preparo e caracterização físico-química e biológica de um biocompósito à base de celulose associada à própolis**. 2010. Universidade de São Paulo (USP), 2010.

PICOLOTTO, A.; PERGHER, D.; PEREIRA, G. P.; MACHADO, K. G.; BARUD, H. S.; ROESCH-ELY, M.; GONZALEZ, M. H.; TASSO, L.; FIGUEIREDO, J. G.; MOURA, S. Bacterial cellulose membrane associated with red propolis as phytomodulator: Improved healing effects in experimental models of diabetes mellitus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 112, p. 108640, 2019.

PINEDA, L. D. C.; MESA, L. A. C.; RIASCOS, C. A. M. Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. **Ingeniería y Ciencia**, v. 8, n. 16, p. 307–335, 2012.

PINTO, J. V. T. **ESTUDO DA VELOCIDADE DE DIFUSÃO DA ALOÍNA EM MEIO AQUOSO E EM MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA**. 2012. 133 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2012.

PITANGUY, I.; SALGADO, F.; MARACAJÁ, P. F. UTILIZAÇÃO DE PELÍCULA DE CELULOSE (BIOFILL®) COMO CURATIVO BIOLÓGICO. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v. 78, n. 5, p. 317–326, 1988.

POLETTI, N. A. A.; CALIRI, M. H. L.; SIMÃO, C. D. S. R.; JULIANI, K. B.; TÁCITO, V. E. Feridas malignas: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 411–417, 2002.

PONRASU, T.; SUGUNA, L. Efficacy of Annona squamosa on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Wound Journal**, v. 9, n. 6, p. 613–623, 2012.

PORTELA, R.; LEAL, C. R.; ALMEIDA, P. L.; SOBRAL, R. G. Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 586–610, 2019.

POURALI, P.; RAZAVIANZADEH, N.; KHOJASTEH, L.; YAHYAEI, B. Assessment of the cutaneous wound healing efficiency of acidic, neutral and alkaline bacterial cellulose membrane in rat. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 29, n. 7, p. 90, 2018.

POURALI, P.; YAHYAEI, B. The healing property of a bioactive wound dressing prepared by the combination of bacterial cellulose (BC) and Zingiber officinale root aqueous extract in rats. **3 Biotech**, v. 9, n. 59, p. 1–9, 2019.

POWERS, J. G.; HIGHAM, C.; BROUSSARD, K.; PHILLIPS, T. J. Wound healing and treating wounds - Chronic wound care and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 4, p. 607–625, 2016.

QIU, K.; NETRAVALI, A. N. A Review of Fabrication and Applications of Bacterial Cellulose Based Nanocomposites. **Polymer Reviews**, v. 54, n. 4, p. 598–626, 2014.

QUEEN, D.; GAYLOR, J. D. S.; EVANS, J. H.; COURTNEY, J. M.; REID, W. H. The preclinical evaluation of the water vapour transmission rate through burn wound dressings. **Biomaterials**, v. 8, n. 5, p. 367–371, 1987.

RAGHAVAN, D. Characterization of biodegradable plastics. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 34, n. 1, p. 41–63, 1995.

RAGHUNATHAN, D. Original Research Article Production of Microbial Cellulose from the New Bacterial Strain Isolated From Temple Wash Waters. **Internation Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, n. 12, p. 275–290, 2013.

RAHMALIA, W.; FABRE, J.-F.; MOULOUGUI, Z. Effects of Cyclohexane/Acetone Ratio on Bixin Extraction Yield by Accelerated Solvent Extraction Method. **Procedia Chemistry**, v. 14, p. 455–464, 2015.

RAHMAN, M. M.; RICHARDSON, A.; SOFIAN-AZIRUN, M. Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 18, p. 1872–1878, 2010.

RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M.; KUMBHAR, J. V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 6, p. 2491–2511, 2015.

RAMANA, K. V.; TOMAR, A.; SINGH, L. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *acetobacter xylinum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 245–248, 2000.

RAMBO, C. R.; RECOUVREUX, D. O. S.; ANTÔNIO, R. V.; PITLOVANCIV, A. K.; PORTO, L. M.; CARMINATTI, C. A. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 4, p. 549–554, 2007.

RAMESH, N.; MORATTI, S. C.; DIAS, G. J. Hydroxyapatite-polymer biocomposites for bone regeneration: A review of current trends. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 106, n. 5, p. 2046–2057, 2018.

RANGASWAMY, B. E.; VANITHA, K. P.; HUNGUND, B. S. Microbial Cellulose Production from Bacteria Isolated from Rotten Fruit. **International Journal of Polymer Science**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

RANI, M. U.; RASTOGI, N. K.; APPAIAH, K. A. A. Statistical Optimization of Medium Composition for Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 Using Coffee Cherry Husk Extract – an Agro-Industry Waste. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 7, p. 739–745, 2011.

RECOUVREUX, D. O. S. **Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos**. 2008. 145 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de Pós-

graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2008.

REICH, L.; STIVALA, S. S. **Elements of Polymer Degradation**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1971.

REVIN, V.; LIYASKINA, E.; NAZARKINA, M.; BOGATYREVA, A.; SHCHANKIN, M. Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 151–159, 2018.

RICACZESKI, C. C. **APLICAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA PRODUZIDA POR *Gluconacetobacter hansenii* PARA REMOÇÃO DO CORANTE AMARELO REATIVO B2R**. 2017. 58 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Ponta Grossa, 2017.

RICCI, A.; OLEJAR, K. J.; PARPINELLO, G. P.; KILMARTIN, P. A.; VERSARI, A. Application of Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy in the Characterization of Tannins. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 50, n. 5, p. 407–442, 2015.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 35–58, 1991.

RUKA, D. R.; SIMON, G. P.; DEAN, K. M. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 613–622, 2012.

RYNGAJŁŁO, M.; KUBIAK, K.; JĘDRZEJCZAK-KRZEPKOWSKA, M.; JACEK, P.; BIELECKI, S. Comparative genomics of the *Komagataeibacter* strains—Efficient bionanocellulose producers. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 5, p. 7–31, 2019.

SAFAEE-ARDAKANI, M. R.; HATAMIAN-ZARMI, A.; SADAT, S. M.; MOKHTARI-HOSSEINI, Z. B.; EBRAHIMI-HOSSEINZADEH, B.; RASHIDIANI, J.; KOOSHKI, H. Electrospun Schizophyllan/ polyvinyl alcohol blend nano fibrous scaffold as potential wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 127, p. 27–38, 2019.

SAHANA, T. G.; REKHA, P. D. Biopolymers: Applications in wound healing and skin tissue engineering. **Molecular Biology Reports**, v. 45, n. 1, p. 2857–2867, 2018.

SAIBUATONG, O.; PHISALAPHONG, M. Novo aloe vera–bacterial cellulose composite film from biosynthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 455–460, 2010.

SAJJAD, W.; KHAN, T.; UL-ISLAM, M.; KHAN, R.; HUSSAIN, Z.; KHALID, A.; WAHID, F. Development of modified montmorillonite-bacterial cellulose nanocomposites as a novel substitute for burn skin and tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 206, p. 548–556, 2019.

SANCHAVANAKIT, N.; SANGRUNGRAUNGROJ, W.; KAOMONGKOLGIT, R.; BANAPRASERT, T.; PAVASANT, P.; PHISALAPHONG, M. Growth of Human

Keratinocytes and Fibroblasts on Bacterial Cellulose Film. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 4, p. 1194–1199, 2006.

SANCHEZ, F. **Avaliação do processo de reparação tecidual em úlceras crônicas utilizando curativos de celulose bacteriana associados ou não à laserterapia**. 2012. Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (EESC/USP), São Carlos, 2012.

SANGEETHA, T.; KANNAN, P. P.; KARTHICK, N. K.; MAHENDRAPRABU, A.; ARIVAZHAGAN, G. Classical/non-classical hydrogen bonds in m-xylene - ethanol solution: FTIR and theoretical approach. **Journal of Molecular Liquids**, v. 312, p. 113406, 2020.

SANI, A.; DAHMAN, Y. Improvements in the production of bacterial synthesized biocellulose nanofibres using different culture methods. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 151–164, 2010.

SANTOS, C. P.; REIS, I. N.; MOREIRA, J. E. B.; BRASILEIRO, L. B. Papel: Como se fabrica? **Química Nova na Escola**, v. 14, p. 1–5, 2001.

SANTOS, J. .; CURY, J. . Picão-preto: uma planta daninha especial em solos tropicais. **Planta Daninha**, v. 29, p. 1159–1172, 2011.

SANTOS, S. C.; COSTA, W. F.; BATISTA, F.; SANTOS, L. R.; FERRI, P. H.; FERREIRA, H. D.; SERAPHIN, J. C. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 552–556, 2006.

SANTOS, S. M.; CARBAJO, J. M.; QUINTANA, E.; IBARRA, D.; GOMEZ, N.; LADERO, M.; EUGENIO, M. E.; VILLAR, J. C. Characterization of purified bacterial cellulose focused on its use on paper restoration. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 173–181, 2015.

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.

SAVOJI, H.; GODAU, B.; HASSANI, M. S.; AKBARI, M. Skin Tissue Substitutes and Biomaterial Risk Assessment and Testing. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, n. 86, p. 1–18, 2018.

SCHMITZ, M.; EBERLEIN, T.; ANDRIESSEN, A. Wound treatment costs comparing a bio-cellulose dressing with moist wound healing dressings and conventional dressings. **Wound Medicine**, v. 6, p. 11–14, 2014.

SCHOLZ, E. B. **ESTUDO CINÉTICO DE *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 A PARTIR DE FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO E NITROGÊNIO VISANDO A SÍNTESE DE β -GALACTOSIDASE**. 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado em

Engenharia de Processos) - Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville (Univille), Joinville, 2011.

SCHRAMM, M.; GROMET, Z.; HESTRIN, S. Role of Hexose Phosphate in Synthesis of Cellulose by *Acetobacter Xylinum*. **Nature**, v. 179, n. 4549, p. 28–29, 1957.

SCHRAMM, M.; HESTRIN, S. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. **Journal of general microbiology**, v. 11, n. 1, p. 123–129, 1954.

SCHULZ, H.; BARANSKA, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 43, n. 1, p. 13–25, 2007.

SCHUMANN, D. A.; WIPPERMANN, J.; KLEMM, D. O.; KRAMER, F.; KOTH, D.; KOSMEHL, H.; WAHLERS, T.; SALEHI-GELANI, S. Artificial vascular implants from bacterial cellulose: preliminary results of small arterial substitutes. **Cellulose**, v. 16, n. 5, p. 877–885, 2009.

SHAH, N.; UL-ISLAM, M.; KHATTAK, W. A.; PARK, J. K. Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1585–1598, 2013.

SHARMA, C.; BHARDWAJ, N. K. Biotransformation of fermented black tea into bacterial nanocellulose via symbiotic interplay of microorganisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 166–177, 2019. a.

SHARMA, C.; BHARDWAJ, N. K. Bacterial nanocellulose: Present status, biomedical applications and future perspectives. **Materials Science and Engineering: C**, v. 104, p. 1–18, 2019. b.

SHARMA, C.; BHARDWAJ, N. K. Fabrication of natural-origin antibacterial nanocellulose films using bio-extracts for potential use in biomedical industry. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 914–925, 2020.

SHEYKHNAZARI, S.; TABARSA, T.; ASHORI, A.; SHAKERI, A.; GOLALIPOUR, M. Bacterial synthesized cellulose nanofibers; Effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1187–1191, 2011.

SHODA, M.; SUGANO, Y. Recent advances in bacterial cellulose production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2005.

SILVA, N. H. C. S.; DRUMOND, I.; ALMEIDA, I. F.; COSTA, P.; ROSADO, C. F.; NETO, C. P.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D. Topical caffeine delivery using biocellulose membranes: a potential innovative system for cellulite treatment. **Cellulose**, v. 21, n. 1, p. 665–674, 2014.

SILVA, S. O.; CARVALHO, J. M.; PEREIRA, E. C.; MELO, L. M. C. L.; ARAÚJO, R. S. Atividade antimicrobiana e caracterização físico-química de urucum (*Bixa orellana* L.) em diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Produtos**

Agroindustriais, v. 20, n. 1, p. 49–57, 2018.

SILVEIRA, V. F.; NEVES, E. Z.; GARCIA, M. C. F.; APATI, G. P.; SCHNEIDER, A. L. dos S.; KUREK, A. P.; PEZZIN, A. P. T. Avaliação dos diferentes processos de purificação nas propriedades da celulose bacteriana. In: 15° CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS (CBPOL) 2019, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Anais do 15° CBPol, 2019.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMÕES, D.; MIGUEL, S. P.; RIBEIRO, M. P.; COUTINHO, P.; MENDONÇA, A. G.; CORREIA, I. J. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 127, n. 6, p. 130–141, 2018.

SOARES, S. P.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre micro-organismos da cárie dental. **Revista Odonto Ciência**, v. 23, n. 2, p. 141–144, 2008.

SON, H.; HEO, M.; KIM, Y.; LEE, S. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 33, p. 1–5, 2001.

SOUSA, J. A. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de ipê roxo (*Handroanthus impetiginosus*) em *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa***. 2017. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

SOUZA, A. C. P. **Extração de compostos fenólicos de subprodutos do processamento de sementes de girassol**. 2013. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, 2013.

SOUZA, S. J. **COMPOSIÇÃO TÓPICA DE BIOCELULOSE EM FORMA DE GEL, SPRAY-AEROSOL, CREME E OU SUSPENSÃO AQUOSA PARA TRATAMENTO DE LESÕES EPITELIAIS**, PI 0601330-9 A, 2007.

SOUZA, S. O. L.; COTRIM, M. A. P.; ORÉFICE, R. L.; CARVALHO, S. G.; DUTRA, J. A. P.; CARETA, F. de P.; RESENDE, J. A.; VILLANOVA, J. C. O. Electrospun poly (ϵ -caprolactone) matrices containing silver sulfadiazine complexed with β -cyclodextrin as a new pharmaceutical dosage form to wound healing : preliminary physicochemical and biological evaluation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 29, n. 5, p. 1–17, 2018.

SOUZA, S. S. **BIOLOGIA SISTÊMICA DA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA ATRAVÉS DA RECONSTRUÇÃO METABÓLICA DA *Gluconacetobacter hansenii***. 2014. 144 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2014.

SOUZA, S. S.; BERTI, F. V.; OLIVEIRA, K. P. V.; PITTELLA, C. Q. P.; CASTRO, J. V.; PELISSARI, C.; RAMBO, C. R.; PORTO, L. M. Nanocellulose biosynthesis by *Komagataeibacter hansenii* in a defined minimal culture medium. **Cellulose**, v. 26, n. 3, p. 1641–1655, 2019.

SOUZA, S. S.; CASTRO, J. V.; PORTO, L. M. MODELING THE CORE METABOLISM OF *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 TO EVALUATE NANOCELLULOSE BIOSYNTHESIS. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 3, p. 869–886, 2018.

STASIAK-RÓŻAŃSKA, L.; PŁOSKA, J. Study on the Use of Microbial Cellulose as a Biocarrier for 1,3-Dihydroxy-2-Propanone and Its Potential Application in Industry. **Polymers**, v. 10, n. 4, p. 438–448, 2018.

STUMPF, T. R.; PÉRTILE, R. A. N.; RAMBO, C. R.; PORTO, L. M. Enriched glucose and dextrin mannitol-based media modulates fibroblast behavior on bacterial cellulose membranes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 8, p. 4739–4745, 2013.

SUARATO, G.; BERTORELLI, R.; ATHANASSIOU, A. Borrowing From Nature: Biopolymers and Biocomposites as Smart Wound Care Materials. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, p. 137, 2018.

SUBASHINI, R.; RAKSHITHA, S. U. Phytochemical screening, antimicrobial activity and in vitro antioxidant investigation of methanolic extract of seeds from *Helianthus annuus* L. **Chemical Science Review and Letters**, v. 1, n. 1, p. 30–34, 2012.

SUKHTEZARI, S.; ALMASI, H.; PIRSA, S.; ZANDI, M.; PIROUZIFARD, M. Development of bacterial cellulose based slow-release active films by incorporation of *Scrophularia striata* Boiss. extract. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 340–350, 2017.

SULAEVA, I.; HENNIGES, U.; ROSENAU, T.; POTTHAST, A. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications. A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1547–1571, 2015.

SUMARRIVA, N. L. C. **Capacidad antioxidante, polifenoles y efecto citotóxico en líneas celulares del extracto hidroalcohólico de *Handroanthus obscurus* (Bureau & K. Schum.) Mattos “tahuari negro.”** 2019. 98 f. Tese (Doutorado em Farmácia e Bioquímica) - Programa de Pós-graduação em Farmácia e Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, 2019.

SWITZER, C. Time for change: empowering organizations to succeed in the knowledge economy. **Journal of Knowledge Management**, v. 12, n. 2, p. 18–28, 2008.

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.

TABAI, M. J.; EMTIAZI, G. Transparent nontoxic antibacterial wound dressing based

on AgNPs/bacterial cellulose nano composite synthesized by tripolyphosphate. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 44, p. 244–253, 2018.

TANG, J.; LI, X.; BAO, L.; CHEN, L.; HONG, F. F. Comparison of two types of bioreactors for synthesis of bacterial nanocellulose tubes as potential medical prostheses including artificial blood vessels. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 92, n. 6, p. 1218–1228, 2017.

TANG, W.; JIA, S.; JIA, Y.; YANG, H. The influence of fermentation conditions and post-treatment methods on porosity of bacterial cellulose membrane. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 125–131, 2010.

TEIXEIRA, S. R. Z.; REIS, E. M.; APATI, G. P.; MEIER, M. M.; NOGUEIRA, A. L.; GARCIA, M. C. F.; SCHNEIDER, A. L. S.; PEZZIN, A. P. T.; PORTO, L. M. Biosynthesis and Functionalization of Bacterial Cellulose Membranes with Cerium Nitrate and Silver Nanoparticles. **Materials Research**, v. 22, n. suppl 1, p. 1–13, 2019.

TRECCO, A.; BORGES, F. A.; PIERRI, E. G.; SANTOS, A. G. Dos; CHIN, C. M.; HERCULANO, R. D. Liberação de componentes do extrato de *Casearia sylvestris* Swartz empregando membranas de látex natural como suporte. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 35, n. 1, p. 89–95, 2014.

TSOUKO, E.; KOURMENTZA, C.; LADAKIS, D.; KOPSAHELIS, N.; MANDALA, I.; PAPANIKOLAOU, S.; PALOUKIS, F.; ALVES, V.; KOUTINAS, A. Bacterial Cellulose Production from Industrial Waste and by-Product Streams. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 14832–14849, 2015.

TURECK, B. C. **EFEITO DO MEIO DE CULTIVO E DO TRATAMENTO DE PURIFICAÇÃO NAS PROPRIEDADES TÉRMICAS E QUÍMICAS DA CELULOSE BACTERIANA**. 2017. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville (Univille), Joinville, 2017.

TWUM-DANSO, K.; GRANT, C. S.; SULEIMAN, A.; ABDEL-KHADER, S.; AL-AWAMI, M. S.; AL-BREIKI, H.; TAHA, S. A.; ASHOOR, A. A. J.; WOSORNU, L. Microbiology of postoperative wound infection: prospective study of 1770 wounds. **Journal of Hospital Infection**, v. 21, n. 1, p. 29–37, 1992.

TYAGI, N.; SURESH, S. Production of cellulose from sugarcane molasses using *Gluconacetobacter intermedius* SNT-1: optimization & characterization. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 71–80, 2016.

UL-ISLAM, M.; KHAN, T.; PARK, J. K. Nanoreinforced bacterial cellulose-montmorillonite composites for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1189–1197, 2012. a.

UL-ISLAM, M.; KHAN, T.; PARK, J. K. Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 596–603, 2012. b.

UL-ISLAM, M.; ULLAH, M. W.; KHAN, S.; SHAH, N.; PARK, J. K. Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 1166–1173, 2017.

ULLAH, H.; WAHID, F.; SANTOS, H. A.; KHAN, T. Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 330–352, 2016.

UZYOL, H. K.; SAÇAN, M. T. Bacterial cellulose production by *Komagataeibacter hansenii* using algae-based glucose. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 12, p. 11154–11162, 2017.

VALERO-VALDIVIESO, M. F.; ORTEGÓN, Y.; USCATEGUI, Y. Biopolímeros: Avances y perspectivas. **Dyna**, v. 80, n. 181, p. 171–180, 2013.

VALLA, S.; KJOSBAKKEN, J. Cellulose-negative Mutants of *Acetobacter xylinum*. **Journal of G**, v. 128, n. 7, p. 1401–1408, 1982.

VAZQUEZ, A.; FORESTI, M. L.; CERRUTTI, P.; GALVAGNO, M. Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by *Gluconacetobacter xylinus*. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 2, p. 545–554, 2013.

VELÁSQUEZ-RIAÑO, M.; BOJACÁ, V. Production of bacterial cellulose from alternative low-cost substrates. **Cellulose**, v. 24, n. 7, p. 2677–2698, 2017.

VILAR, D. A.; VILAR, M. S. A.; MOURA, T. F. A. L.; RAFFIN, F. N.; OLIVEIRA, M. R.; FRANCO, C. F. O.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M. Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of *Bixa orellana* L.: A Review. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

WANG, F.-P.; LI, B.; SUN, M.-Y.; WAHID, F.; ZHANG, H.-M.; WANG, S.-J.; XIE, Y.-Y.; JIA, S.-R.; ZHONG, C. In situ regulation of bacterial cellulose networks by starch from different sources or amylose/amylopectin content during fermentation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 195, p. 59–66, 2022.

WANG, S.-S.; HAN, Y.-H.; CHEN, J.-L.; ZHANG, D.-C.; SHI, X.-X.; YE, Y.-X.; CHEN, D.-L.; LI, M. Insights into Bacterial Cellulose Biosynthesis from Different Carbon Sources and the Associated Biochemical Transformation Pathways in *Komagataeibacter* sp. W1. **Polymers**, v. 10, n. 9, p. 963–983, 2018.

WATANABE, K.; TAKEMURA, H.; TABUCHI, M.; TAHARA, N.; TOYOSAKI, H.; MORINAGA, Y.; TSUCHIDA, T.; YANO, H.; YOSHINAGA, F. **NOVEL CELLULOSE-PRODUCING BACTERIA**, EP 0 831 101 B1, 2003.

WATERHOUSE, A. L. Determination of Total Phenolics. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, Hoboken, NJ, USA, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2002.

WEI, B.; YANG, G.; HONG, F. Preparation and evaluation of a kind of bacterial cellulose dry films with antibacterial properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 533–538, 2011.

WEN, C.; CHEN, H.; YANG, N. Developing Phytocompounds from Medicinal Plants

as Immunomodulators. In: SHYUR, L.-F.; LAU, A. S. (Eds.). **Recent Trends in Medicinal Plants Research**. [s.l.] : Elsevier Ltd., 2012. v. 62p. 197–272.

WILLIAMS, D. F. Biomaterials and tissue engineering in reconstructive surgery. **Sadhana**, v. 28, p. 563–574, 2003.

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941–2953, 2008.

WILLIAMS, E. **Plano de Negócio: 25 princípios para um planejamento consistente**. São Paulo: Publifolha, 2002.

WINTER, G. D. Formation of the Scab and the Rate of Epithelization of Superficial Wounds in the Skin of the Young Domestic Pig. **Nature**, v. 193, p. 293–294, 1962.

WOLCOTT, R. D.; RHOADS, D. D.; DOWD, S. E. Biofilms and chronic wound inflammation. **Journal of Wound Care**, v. 17, n. 8, p. 333–341, 2008.

WOODFORD, N.; LIVERMORE, D. M. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. **Journal of Infection**, v. 59, n. S1, p. S4–S16, 2009.

WU, J.; ZHENG, Y.; WEN, X.; LIN, Q.; CHEN, X.; WU, Z. Silver nanoparticle/bacterial cellulose gel membranes for antibacterial wound dressing: investigation in vitro and in vivo. **Biomedical Materials**, v. 9, n. 3, p. 1–13, 2014.

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. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, n. 8, p. 1244–1251, 1997.

YAN, H.; CHEN, X.; SONG, H.; LI, J.; FENG, Y.; SHI, Z.; WANG, X.; LIN, Q. Synthesis of bacterial cellulose and bacterial cellulose nanocrystals for their applications in the stabilization of olive oil pickering emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 72, p. 127–135, 2017.

YANG, J.; LV, X.; CHEN, S.; LI, Z.; FENG, C.; WANG, H.; XU, Y. In situ fabrication of a microporous bacterial cellulose/potato starch composite scaffold with enhanced cell compatibility. **Cellulose**, v. 21, n. 3, p. 1823–1835, 2014.

YANG, Y. K.; PARK, S. H.; HWANG, J. W.; PYUN, Y. R.; KIM, Y. S. Cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 under agitated condition. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 3, p. 312–317, 1998.

YE, S.; JIANG, L.; WU, J.; SU, C.; HUANG, C.; LIU, X.; SHAO, W. Flexible Amoxicillin-Grafted Bacterial Cellulose Sponges for Wound Dressing: In Vitro and in Vivo Evaluation. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 10, n. 6, p. 5862–5870, 2018.

YORDSHAHI, A. S.; MORADI, M.; TAJIK, H.; MOLAEI, R. Design and preparation of antimicrobial meat wrapping nanopaper with bacterial cellulose and postbiotics of lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 321, p. 1–10, 2020.

YOSHINAGA, F.; TONOUCHI, N.; WATANABE, K. Research Progress in Production of Bacterial Cellulose by Aeration and Agitation Culture and Its Application as a New Industrial Material. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 219–224, 1997.

ZANCANELA, D. C.; FUNARI, C. S.; HERCULANO, R. D.; MELLO, V. M.; RODRIGUES, C. M.; BORGES, F. A.; BARROS, N. R. De; MARCOS, C. M.; ALMEIDA, A. M. F.; GUASTALDI, A. C. Natural rubber latex membranes incorporated with three different types of propolis: Physical-chemistry and antimicrobial behaviours. **Materials Science & Engineering C**, v. 97, n. October 2018, p. 576–582, 2019.

ZHONG, C.; ZHANG, G.-C.; LIU, M.; ZHENG, X.-T.; HAN, P.-P.; JIA, S.-R. Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 14, p. 6189–6199, 2013.

APÊNDICE A – Composição e resultados do estudo dos meios de cultivo que não
entraram na discussão desse trabalho

(continua)

Fonte de nitrogênio	Fonte de carbono	Outros nutrientes	SIGLA	Produção (g/L)	pH final
Milhocina (5 g/L)	Frutose (100 g/L)	-	MF-105	0,4 ± 0,0	3,6 ± 0,02
Milhocina (15 g/L)	Frutose (100 g/L)	-	MF-115	0,5 ± 0,09	4,3 ± 0,07
Milhocina (5 g/L)	Frutose (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	MFHS-25	0,2 ± 0,0	5,0 ± 0,02
Milhocina (5 g/L)	Frutose (100 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	MFHS-105	0,4 ± 0,0	4,4 ± 0,01
Milhocina (15 g/L)	Frutose (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	MFHS-35	0,3 ± 0,09	6,3 ± 0,01
Milhocina (15 g/L)	Frutose (100 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	MFHS-115	0,5 ± 0,09	4,8 ± 0,02
Milhocina (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	MHS	0,5 ± 0,09	6,2 ± 0,12
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L) Etanol (5 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSE-5	0,4 ± 0,0	6,8 ± 0,2
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L) Etanol (10 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSE-10	0,3 ± 0,09	5,5 ± 0,11
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L) Etanol (20 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSE-20	0,2 ± 0,0	3,8 ± 0,01
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L) Etanol (40 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSE-40	0,0 ± 0,0	6,0 ± 0,03
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L) Etanol (60 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSE-60	0,0 ± 0,0	6,3 ± 0,4
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L) Etanol (80 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSE-80	0,0 ± 0,0	6,5 ± 0,01
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L) Etanol (100 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSE-100	0,0 ± 0,0	6,6 ± 0,4
Milhocina (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L) Etanol (5 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	MHSE-5	0,5 ± 0,09	5,6 ± 0,14
Milhocina (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L) Etanol (10 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	MHSE-10	0,4 ± 0,0	6,0 ± 0,5
Milhocina (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L) Etanol (20 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	MHSE-20	0,3 ± 0,09	3,8 ± 0,1
Milhocina (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L) Etanol (40 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	MHSE-40	0,03 ± 0,05	4,8 ± 0,2

APÊNDICE A – Composição e resultados do estudo dos meios de cultivo que não
entraram na discussão desse trabalho

(continuação)

Fonte de nitrogênio	Fonte de carbono	Outros nutrientes	SIGLA	Produção (g/L)	pH final
Milhocina (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L) Etanol (60 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	MHSE-60	0,0 ± 0,0	5,7 ± 0,07
Milhocina (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L) Etanol (80 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	MHSE-80	0,0 ± 0,0	6,4 ± 0,15
Milhocina (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L) Etanol (100 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	MHSE-100	0,0 ± 0,0	6,6 ± 0,09
Prodex (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L) Etanol (5 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	PHSE-5	0,5 ± 0,09	5 ± 0,1
Prodex (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L) Etanol (10 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	PHSE-10	0,2 ± 0,0	5 ± 0,07
Prodex (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L) Etanol (20 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	PHSE-20	0,3 ± 0,09	3,9 ± 0,08
Prodex (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L) Etanol (40 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	PHSE-40	0,2 ± 0,0	3,7 ± 0,09
Prodex (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L) Etanol (60 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	PHSE-60	0,1 ± 0,0	4,7 ± 0,12
Prodex (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L) Etanol (80 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	PHSE-80	0,0 ± 0,0	4,9 ± 0,05
Prodex (5 g/L)	Manitol (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L) Etanol (100 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	PHSE-100	0,0 ± 0,0	6,0 ± 0,1
Extrato de levedura (4 g/L)	Glicose (50 g/L)	Fosfato de potássio (2 g/L) Sulfato de Mg (0,73 g/L)	LGPME	0,4 ± 0,0	3,3 ± 0,15
Extrato de levedura (4 g/L)	Glicose (50 g/L) Etanol (5 mL/L)	Fosfato de potássio (2 g/L) Sulfato de Mg (0,73 g/L)	LGPME-5	0,2 ± 0,0	3,1 ± 0,1
Extrato de levedura (4 g/L)	Glicose (50 g/L) Etanol (10 mL/L)	Fosfato de potássio (2 g/L) Sulfato de Mg (0,73 g/L)	LGPME-10	0,2 ± 0,0	2,9 ± 0,01
Extrato de levedura (4 g/L)	Glicose (50 g/L) Etanol (20 mL/L)	Fosfato de potássio (2 g/L) Sulfato de Mg (0,73 g/L)	LGPME-20	0,2 ± 0,0	3,0 ± 0,04
Extrato de levedura (4 g/L)	Glicose (50 g/L) Etanol (40 mL/L)	Fosfato de potássio (2 g/L) Sulfato de Mg (0,73 g/L)	LGPME-40	0,2 ± 0,0	3,4 ± 0,03
Extrato de levedura (4 g/L)	Glicose (50 g/L) Etanol (60 mL/L)	Fosfato de potássio (2 g/L) Sulfato de Mg (0,73 g/L)	LGPME-60	0,0 ± 0,0	4,0 ± 0,06
Extrato de levedura (4 g/L)	Glicose (50 g/L) Etanol (80 mL/L)	Fosfato de potássio (2 g/L) Sulfato de Mg (0,73 g/L)	LGPME-80	0,0 ± 0,0	4,1 ± 0,02
Extrato de levedura (4 g/L)	Glicose (50 g/L) Etanol (100 mL/L)	Fosfato de potássio (2 g/L) Sulfato de Mg (0,73 g/L)	LGPME-100	0,0 ± 0,0	3,9 ± 0,05

APÊNDICE A – Composição e resultados do estudo dos meios de cultivo que não
entraram na discussão desse trabalho

(continuação)

Fonte de nitrogênio	Fonte de carbono	Outros nutrientes	SIGLA	Produção (g/L)	pH final
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (3 g/L)	Manitol (25 g/L) Glicose (100 g/L)	-	ManitolG	0,4 ± 0,0	2,2 ± 0,03
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Glicose (20 g/L) Ácido cítrico (1,5 g/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSG-2	0,3 ± 0,09	6,1 ± 0,09
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Glicose (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L) Sulfato de Mg (0,51 g/L)	HSGMg	0,3 ± 0,09	6,2 ± 0,09
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (2,7 g/L)	Glicose (20 g/L) Ácido cítrico (1,15 g/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSG-3	0,4 ± 0,0	5,3 ± 0,6
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Sacarose (20 g/L) Ácido cítrico (1,17 g/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSSE	0,2 ± 0,0	6,8 ± 0,02
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Sacarose (20 g/L) Ácido cítrico (1,17 g/L) Etanol (5 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSSE-5	0,3 ± 0,09	6,8 ± 0,09
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Sacarose (20 g/L) Ácido cítrico (1,17 g/L) Etanol (10 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSSE-10	0,3 ± 0,09	6,5 ± 0,2
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Sacarose (20 g/L) Ácido cítrico (1,17 g/L) Etanol (20 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSSE-20	0,3 ± 0,09	4 ± 0,07
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Sacarose (20 g/L) Ácido cítrico (1,17 g/L) Etanol (40 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSSE-40	0,2 ± 0,0	3,8 ± 0,15
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Sacarose (20 g/L) Ácido cítrico (1,17 g/L) Etanol (60 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSSE-60	0,0 ± 0,0	6,1 ± 0,5
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Sacarose (20 g/L) Ácido cítrico (1,17 g/L) Etanol (80 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSSE-80	0,0 ± 0,0	5,3 ± 0,3
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Sacarose (20 g/L) Ácido cítrico (1,17 g/L) Etanol (100 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSSE-100	0,0 ± 0,0	5,5 ± 0,7
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Glicose (20 g/L) Ácido cítrico (1,17 g/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSG	0,3 ± 0,09	6,0 ± 0,06
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Glicose (20 g/L) Ácido cítrico (1,17 g/L) Etanol (5 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSGE-5	0,3 ± 0,09	4,4 ± 0,3
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Glicose (20 g/L) Ácido cítrico (1,17 g/L) Etanol (10 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSGE-10	0,3 ± 0,09	4,1 ± 0,08
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Glicose (20 g/L) Ácido cítrico (1,17 g/L) Etanol (20 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSGE-20	0,2 ± 0,0	3,6 ± 0,05
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Glicose (20 g/L) Ácido cítrico (1,17 g/L) Etanol (40 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSGE-40	0,3 ± 0,09	3,9 ± 0,07

APÊNDICE A – Composição e resultados do estudo dos meios de cultivo que não
entraram na discussão desse trabalho

(conclusão)

Fonte de nitrogênio	Fonte de carbono	Outros nutrientes	SIGLA	Produção (g/L)	pH final
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Glicose (20 g/L) Ácido cítrico (1,17 g/L) Etanol (60 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSGE-60	0,1 ± 0,09	4,5 ± 0,3
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Glicose (20 g/L) Ácido cítrico (1,17 g/L) Etanol (80 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSGE-80	0,0 ± 0,0	5,2 ± 0,4
Extrato de levedura (5 g/L) Peptona (5 g/L)	Glicose (20 g/L) Ácido cítrico (1,17 g/L) Etanol (100 mL/L)	Fosfato de sódio (2,7 g/L)	HSGE-100	0,0 ± 0,0	5,6 ± 0,2
Extrato de levedura (2,5 g/L) Sulfato de amônio (0,6 g/L)	Sacarose (100 g/L)	Fosfato de potássio (5 g/L) Sulfato de Mg (0,2 g/L)	ALABAN	0,4 ± 0,0	6,3 ± 0,01

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

