



LUÍZA OLIVEIRA ROCHA

**PRODUÇÃO DE BIOFILMES DE CELULOSE BACTERIANA A
PARTIR DE KOMBUCHA CULTIVADA EM MEIO COM
INFUSÃO DE CHÁ VERDE**

**LAVRAS – MG
2021**

LUÍZA OLIVEIRA ROCHA

**PRODUÇÃO DE BIOFILMES DE CELULOSE BACTERIANA A
PARTIR DE KOMBUCHA CULTIVADA EM MEIO COM
INFUSÃO DE CHÁ VERDE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
Curso de Engenharia Química, para a
obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. João Moreira Neto
Orientador

Me. Thiago Moreira Cruz
Coorientador

**LAVRAS – MG
2021**

LUÍZA OLIVEIRA ROCHA

**PRODUÇÃO DE BIOFILMES DE CELULOSE BACTERIANA A
PARTIR DE KOMBUCHA CULTIVADA EM MEIO COM
INFUSÃO DE CHÁ VERDE**

**PODUCTION OF BACTERIAL CELLULOSE BIOFILMS FROM
KOMBUCHA CULTIVATED IN MEDIUM WITH GREEN TEA
INFUSION**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
Curso de Engenharia Química, para a
obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. João Moreira Neto
Orientador

Me. Thiago Moreira Cruz
Coorientador

**LAVRAS – MG
2021**

RESUMO

A celulose é um polímero de cadeia longa e biodegradável, mesmo sendo muito comercializada, apresenta alguns fatores que limitam a sua utilização em áreas específicas, como por exemplo suas características mecânicas. Diante dessa situação, começaram a aparecer estudos relacionados à utilização de celulose bacteriana como sendo uma alternativa, por apresentar melhores características mecânicas para determinada utilização, sendo possível uma substituição da celulose vegetal. A membrana de celulose pode ser utilizada em diversas áreas, desde áreas médicas, indústrias alimentícias, até em eletrônica e mineração. A celulose bacteriana pode ser produzida por diversas bactérias em diferentes meios, porém é essencial que o meio de cultura contenha uma fonte de carbono e composição de nutrientes adequados. Durante a síntese da celulose bacteriana, muitos parâmetros podem ser variados como: temperatura, pH, tempo de inoculação, meio estático ou agitado. Neste trabalho, os ensaios para a produção da membrana de celulose bacteriana foram feitos via fermentação durante 7, 14, 21, 28 e 35 dias a uma temperatura de 25°C de forma estática com a utilização de uma colônia de SCOPY (*symbiotic culture of bacteria and yeast*) e sacarose como fonte de carbono a uma concentração de 150 g/L. Após a produção da membrana de celulose, foi realizada a síntese dos biofilmes de celulose pelo método casting. O biofilme de celulose bacteriana foi caracterizado em relação as análises de módulo de elasticidade (MOE) e tensão de ruptura (MOR) e o teor de açúcares presente no meio de cultura durante o processo fermentativo foi quantificado pelo método DNS. A membrana de celulose bacteriana apresentou maior espessura visivelmente nos 21° e 28° dias de fermentação. Foi observado que a medida que o tempo de fermentação aumenta, a concentração de sacarose no meio de cultura diminui até atingir uma concentração constante, sendo que esta concentração mínima é observada nas amostras coletadas aos 21° e 28° dias de fermentação. O maior valor do MOR foi representado pelo biofilme feito a partir de celulose produzida com 14 dias de fermentação ($12,254 \pm 0,3311$ MPa), enquanto o maior valor de MOE foi determinado com o biofilme feito a partir da celulose produzida com 21 dias de fermentação $0,195 \pm 0,0418$ GPa.

Palavras-chave: Celulose Bacteriana. SCOPY. Biofilmes. Material biopolimérico.

ABSTRACT

Cellulose is a long-chain and biodegradable polymer, even though it is widely commercialized, it has some factors that limit its use in specific areas, such as its mechanical characteristics. Given this situation, studies began to appear related to the use of bacterial cellulose as an alternative, as it presents better mechanical characteristics for a particular use, making a replacement for vegetable cellulose possible. Cellulose membrane can be used in several areas, from medical areas, food industries, to electronics and mining. Bacterial cellulose can be produced by different bacteria in different media, but it is essential that the culture media contain an adequate carbon source and nutrient composition. During bacterial cellulose synthesis, many parameters can be varied such as: temperature, pH, inoculation time, static or stirred medium. In this work, the tests for the production of bacterial cellulose membrane were carried out via fermentation for 7, 14, 21, 28 and 35 days at a temperature of 25°C in a static way using a SCOBY colony (symbiotic culture of bacteria and yeast) and sucrose as a carbon source at a concentration of 150 g/L. After the production of the cellulose membrane, the synthesis of cellulose biofilms was carried out by the casting method. The bacterial cellulose biofilm was characterized in relation to the analysis of modulus of elasticity (MOE) and tensile strength (MOR) and the sugar content present in the culture medium during the fermentation process was quantified by the DNS method. The bacterial cellulose membrane showed visibly greater thickness on the 21st and 28th days of fermentation. It was observed that as the fermentation time increases, the sucrose concentration in the culture medium decreases until it reaches a constant concentration, and this minimum concentration is observed in samples collected on the 21st and 28th days of fermentation. The highest MOR value was represented by biofilm made from cellulose produced at 14 days of fermentation (12.254 ± 0.3311 MPa), while the highest MOE value was determined by biofilm made from cellulose produced at 21 days of fermentation 0.195 ± 0.0418 GPa.

Keywords: Bacterial Cellulose. SCOBY. Biofilms. Biopolymer material.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da molécula D-Glicose.....	13
Figura 2 - Unidade manomérica celobiose e estrutura do polímero celulose.....	13
Figura 3 - Representação dos dois esteroisômeros da D-glicose.....	14
Figura 4 - Representação das ligações de hidrogênio intramolecular (B) e intermolecular (A). ..	15
Figura 5 - Diferença entre as fibras de celulose bacteriana (A) e vegetal (B).....	16
Figura 6 - a) Micrografia eletrônica mostrando as fitas de largura ~ 60 nm; b) a seta à esquerda indica o local onde as fibrilas estão enrolando; c) <i>K. xylinus</i> produzindo uma fibra de celulose; d) sem zooglea; e) zooglea recentemente colhida em cultura estática.....	19
Figura 7 - Representação esquemática da produção da celulose bacteriana.	20
Figura 8 - Curva tensão-deformação.	27
Figura 9 - Mecanismo de hidrólise da sacarose em meio ácido.	28
Figura 10 - Etapas de produção da celulose bacteriana.....	29
Figura 11 - Produção dos filmes de celulose bacteriana.	30
Figura 12 - Membranas de celulose bacteriana produzida por tempo de fermentação: a) 7 dias; b)14 dias; c)21 dias, d)28 e e)35 dias, respectivamente.	36
Figura 13 - Ilustração do processo de realização da análise mecânica MOR e MOE até o rompimento do filme.	38
Figura 14 - Dados comparativos da curva tensão-deformação referentes ao tempo de fermentação.	39
Figura 15 - Curva padrão para frutose + glicose.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados comparativos da celulose vegetal versus celulose bacteriana.	16
Tabela 2 - Diversos ramos e aplicações da celulose bacteriana.	17
Tabela 3 - Resíduos como meios de fermentação alternativos para produção de celulose bacteriana.	23
Tabela 4 - Diluição das amostras para realização do experimento.	32
Tabela 5 - Valores de umidade, massa seca de CB e massa seca de CB/grama de substrato.	35
Tabela 6 - Dados do módulo de elasticidade e do módulo de ruptura relacionados aos diferentes tempos de fermentação.	40
Tabela 7 - Valores obtidos da absorbância, concentração de açúcares redutores e da concentração de sacarose no meio.	43

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Símbolo	Descrição	Unidade SI
CNF	Nanofibrilas de celulose	
CNC	Nanocristais de celulose	
CB	Celulose Bacteriana	
EPS	Exopolissacarídeos	
MOR	Módulo de Ruptura	MPa
MOE	Módulo de Elasticidade (Módulo de Young)	GPa
MPa	Mega Pascal	10^6 Pascal
GPa	Giga Pascal	10^9 Pascal
AR	Açúcar Redutor	g/L
ANR	Açúcar Não Redutor	g/L
AT	Açúcar Total	g/L
SCOBY	Colônia de Bacterias e Leveduras	
RPM	Rotação por Minuto	
KN	Kilo Newton	10^3 Newton
HCl	Ácido clorídrico	mL
NaOH	Hidróxido de sódio	Molar (mol/L)
ABS	Absorbância	
DNS	Ácido 3-5 dinitrosalicílico	g/L
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento	

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	OBJETIVO	12
2.1.	Geral	12
2.2.	Específicos	12
3.	REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1.	Celulose	13
3.2.	A Celulose Bacteriana e suas aplicações	15
3.2.1.	Síntese da Celulose Bacteriana	17
3.2.2.	Cultivo da Celulose Bacteriana	20
3.2.3.	Meios de fermentação para síntese da celulose bacteriana	21
3.3.	Produção filmogênica	23
3.3.1.	Caracterização dos biofilmes	25
3.3.1.1.	Propriedades mecânicas	25
3.3.1.2.	Análises químicas	27
4.	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1.	Microorganismos	28
4.2.	Avaliação da condição ótima da concentração de sacarose	28
4.3.	Produção das membranas de celulose bacteriana	29
4.4.	Produção dos filmes	30
4.5.	Caracterização dos filmes	31
4.5.1.	Análises mecânicas	31
4.5.2.	Análises químicas	31
4.5.2.1.	Determinação da curva padrão	31
4.5.2.2.	Hidrólise da sacarose	32
4.5.2.3.	Quantificação dos açúcares redutores com DNS	33
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1.	Avaliação da condição ótima da concentração de sacarose	34
5.2.	Produção das membranas de celulose bacteriana	36
5.3.	Caracterização dos filmes	37
5.3.1.	Análises mecânicas	37

5.3.2.	Análises químicas	42
5.3.2.1.	Determinação da curva padrão	42
5.3.2.2.	Quantificação da sacarose	43
6.	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

A celulose é um polímero de cadeia longa, linear e não ramificada, classificada como polissacarídeo biodegradável. Um exemplo que pode ser citado é a celulose vegetal, caracterizando um constituinte fundamental das paredes celulares das plantas, visto que representa a maior parte. Ela pode ser obtida diretamente da madeira de árvores coníferas e folhosas (BIAZUS, HORA E LEITE 2010). A celulose vegetal mesmo sendo muito comercializada, apresenta características não tão evoluídas para implementação em certas funções, como por exemplo, como embalagem devido às suas características mecânicas. Dessa forma, seus fatores limitam suas aplicações em áreas mais específicas, trazendo a necessidade de buscar alternativas que apresentem características melhores em determinados pontos. Diante disso, a celulose bacteriana (CB) apresenta-se como uma possível alternativa (DUARTE, 2019).

A celulose bacteriana (CB) é um biopolímero que apresenta a mesma fórmula química que a celulose vegetal, porém tem em sua constituição finas fibras e pequenos poros, apresentando uma diferente organização das cadeias e estrutura fibrosa, o que proporciona suas propriedades distintas, como o alto teor de pureza e cristalinidade (COIMBRA, 2015). Sua produção ocorre através da inoculação do microrganismo a partir de um meio de cultura rico em carboidratos, em condições controladas. As propriedades mecânicas, bem como as micro e macroestruturas da CB, são influenciadas pelas condições da fermentação durante sua síntese. Em sínteses que ocorrem por microrganismos, geralmente são geradas impurezas, mas como a celulose bacteriana é um produto extracelular, não é necessário que ocorra o processo de tratamento, tornando mais acessível o seu uso (DUARTE, 2019).

A CB apresenta diversas vantagens em relação à celulose vegetal, como por exemplo: apresenta maior resistência física e mecânica (alto grau de resistência e elasticidade), é livre de lignina e hemicelulose, apresenta alta capacidade de absorção de água, é biodegradável, atóxica e biocompatível. Dentre suas principais propriedades destacam-se sua hidrofiliabilidade, alta cristalinidade e sua morfologia. A síntese da CB por bactérias produtoras de celulose é regulada de maneira bastante precisa e específica, envolvendo muitas enzimas e complexos de proteínas catalíticas e regulatórias, cuja estrutura supramolecular ainda não está bem definida. Suas propriedades podem ser justificadas através das ligações de hidrogênio que são responsáveis pela formação das fibras de celulose. Mesmo com todas suas características, a celulose bacteriana apresenta desvantagens, como por exemplo, um elevado custo para sua produção, por se tratar de

microorganismos vivos também apresenta altas chances de contaminação em seu manuseio (DONINI et al., 2010).

A celulose bacteriana tem se destacado por ser um material único com propriedades que permitem aplicações em diversos ramos. Com um olhar mais industrial, essa celulose é muito utilizada na produção de papel, por exemplo, como emulsificador. Já na área da saúde, é considerada um dos biomateriais mais vantajosos. Além dos ramos já comentados, ela também é utilizada em área alimentícia, podendo atuar como filme de proteção a alimentos. Alguns outros exemplos de utilização podem ser citados: adesivos, absorventes, lubrificantes, embalagens, materiais estruturais de alta performance, dispositivos computacionais, veículos para a liberação controlada de fármacos e matrizes biomédicas. Essa diversidade de aplicação se justifica pelo fato deste homopolissacarídeo sofrer modificações estruturais, que são realizadas para se adequar a outras características desejadas (DUARTE, ÉDEN B. et al, 2019).

2. OBJETIVO

2.1. Geral

Este trabalho teve como objetivo geral a produção de biofilmes de celulose bacteriana através do método casting e avaliação de suas propriedades mecânicas.

2.2. Específicos

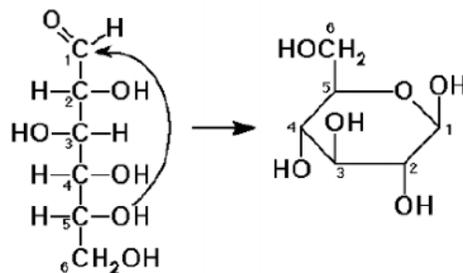
- Determinar a quantidade ótima de sacarose para produção de celulose bacteriana;
- Avaliar a influência do tempo de fermentação na produção de celulose bacteriana;
- Avaliar as propriedades mecânicas dos biofilmes produzidos pelo método casting;
- Avaliar as influências de sacarose presente no meio de cultivo da celulose.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Celulose

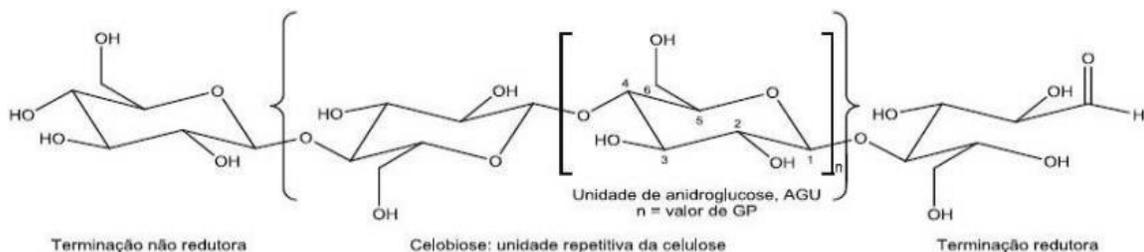
As fibras vegetais estão organizadas em camadas primária e secundária, que é basicamente composta por hemicelulose, lignina e celulose (SILVA et al., 2009). A celulose é biossintetizada pelas plantas superiores e algas através da fotossíntese, como também por organismos não-fotossintetizantes, por exemplo, as bactérias. E por isso, ela se torna o polímero natural mais abundante na natureza, é não tóxica e não alergênica (KLEMM et al., 2005). Esse composto é formado pela repetição das ligações do tipo β -1,4-glicosídicas, que são unidades de D-glicose (Figura 1) deslocada 180° em relação aos seus vizinhos, que é chamada então de celobiose (Figura 2). O tamanho da molécula de celulose pode ser definido pela média do seu grau de polimerização, ou seja, o número de unidades de glicose, que pode ser de até 15000 (KLEMM et al., 2005).

Figura 1 - Estrutura da molécula D-Glicose.



Fonte: Adaptada (Klem et al., 2005).

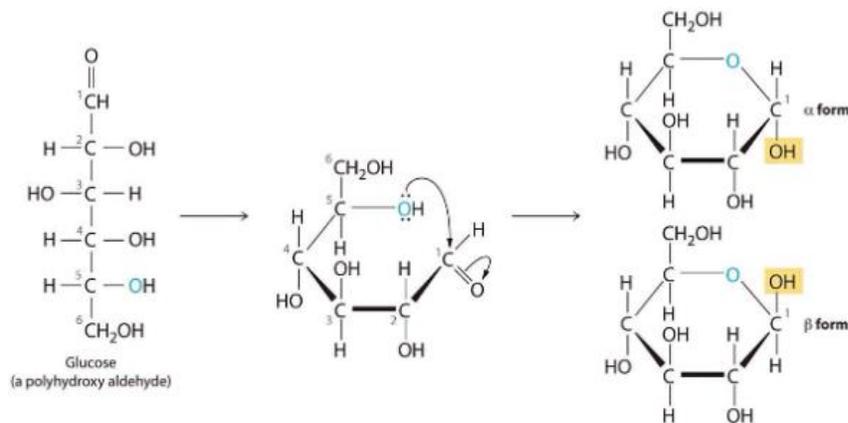
Figura 2 - Unidade manomérica celobiose e estrutura do polímero celulose.



Fonte: Adaptada (Klemm et al., 2005).

A molécula D-glicose apresenta dois estereoisômeros, devido ao carbono quiral formado em sua forma cíclica, que diferem devido a posição espacial da hidroxila do carbono 1. Dessa forma, devido à posição equatorial do grupo hidroxila do carbono 1 no anômero β , diminui o efeito estérico e favorece a ligação de hidrogênio que ocorre entre o oxigênio do anel piranosídico com o hidrogênio da hidroxila, sendo assim, β -D-glicose predomina (Figura 3), ou seja, é a conformação de menor energia livre da molécula (SILVA et.al., 2018). A celulose tende a formar ligação de hidrogênio, devido aos grupos de hidroxilas livres presentes em cada molécula de D-glicose, sendo essas ligações extremamente importantes para suas características químicas e físicas (KLEMM et al., 2005).

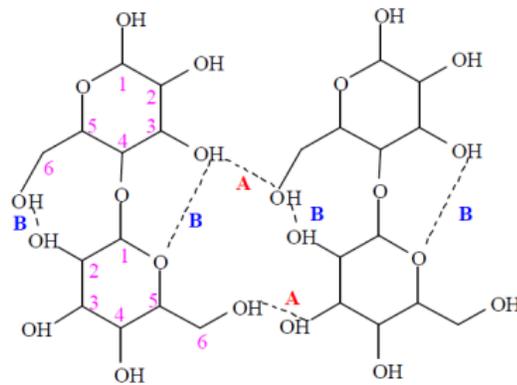
Figura 3 - Representação dos dois estereoisômeros da D-glicose.



Fonte: Adaptada (Silva et.al., 2018).

Essas ligações de hidrogênio presentes na celulose podem ser separadas em dois tipos: intramolecular e intermolecular. As ligações intramoleculares são aquelas que ocorrem entre grupos hidroxilas da mesma cadeia e conferem rigidez. Já as intermoleculares são ligações que ocorrem entre grupos hidroxilas de cadeias adjacentes, formando a estrutura supramolecular (Figura 4) (de ALMEIDA, 2009).

Figura 4 - Representação das ligações de hidrogênio intramolecular (B) e intermolecular (A).



Fonte: Adaptada (de Almeida, 2009).

As cadeias de celulose apresentam uma forte habilidade para se agregar em entidades estruturais muito bem ordenadas devido a sua conformação espacial e sua constituição química, ou seja, a base das ligações de hidrogênio que são representadas pelas ligações intramoleculares e intermoleculares são as responsáveis pela formação de estruturas ordenadas. As estruturas supramoleculares específicas da celulose são utilizadas como molde para pesquisas relacionadas à cristalinidade, estrutura e reatividade, e assim há o estudo e desenvolvimento de biomateriais e materiais (KLEMM et al., 1998).

3.2. A Celulose Bacteriana e suas aplicações

A CB vem despertando um maior interesse para aplicação em novos campos e para produção em larga escala, buscando por desenvolvimento de métodos. Quando comparada com a celulose vegetal, ela apresenta a mesma fórmula química, mas se difere em relação à sua estrutura fibrosa que dá a CB propriedades distintas, essencialmente manométrica, cristalinidade e pureza. Ela também apresenta a vantagem de ser desprovida de lignina, hemicelulose e outros produtos biogênicos que veem da parede celular vegetal (LEE et al., 2014). Dessa forma, é destacada suas importantes propriedades, como a alta resistência mecânica e física, seu alto teor de água mesmo sendo insolúvel, elevado grau de polimerização, flexibilidade e a possibilidade da adição de material para obtenção de compósitos (DONINI et al., 2010). Esse polissacarídeo também não é digerível, pelo fato de que as enzimas digestivas humanas não reconhecem as mesmas, mas é biodegradável (FAKHOURI, 2006).

A celulose bacteriana é obtida através da fermentação, dessa forma toda sua micro e macroestrutura sofrem influência das condições de fermentação durante sua síntese, pela bactéria utilizada e o seu tratamento após a síntese. Com a variação da composição do meio de cultura, da temperatura e pH, por exemplo, vai ocorrer uma modificação na porosidade da membrana (LEE et al., 2014; SILVA, 2012).

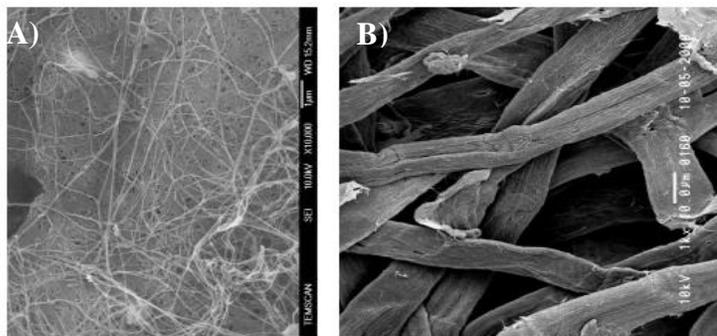
Alguns dados comparativos entre a celulose vegetal e a bacteriana são apresentados a seguir, na Tabela 1. E pela Figura 5 é possível observar a diferença da largura e do arranjo entre suas fibras quando micrografadas. É possível observar que a CB apresenta um conjunto de fibras finas e uma diferente organização de suas estruturas.

Tabela 1 - Dados comparativos da celulose vegetal versus celulose bacteriana.

Propriedade	Celulose Vegetal	Celulose Bacteriana
Largura da fibra (mm)	1.4 – 4.0 x10 ⁻²	70 - 80
Cristalinidade (%)	56 – 65	65 - 79
Grau de polimerização	300 – 1.700	800 – 10.000
Resistência a tração (MPa)	10 – 250	91 - 260
Módulo de Young (GPa)	5.5 – 12.6	15 - 30
Quantidade de água (%)	60	98,5

Fonte: Adaptado (Pecoraro et al., 2008 e Klenn, 2005).

Figura 5 - Diferença entre as fibras de celulose bacteriana (A) e vegetal (B).



Fonte: Adaptada (Donini et al., 2010).

Foram realizados vários estudos referentes à aplicação das propriedades da celulose bacteriana, algumas indústrias que podem ser citadas, são aquelas do ramo de efluentes, têxteis, eletrônica e em biomedicina. Essa diversidade se dá pelas modificações que podem ocorrer em sua estrutura, assim, a membrana pode se adaptar nas características ideais para cada função a ser implementada; um exemplo de modificação seria a substituição dos grupos hidroxilas por grupos substituintes (COIMBRA, 2016). Algumas aplicações podem ser visualizadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Diversos ramos e aplicações da celulose bacteriana.

Área	Aplicação
Indústria Têxtil	Roupas para esportes, tendas e equipamentos para acampamento;
Mineração e Refinaria	Esponjas para coleta de vazamento de óleo, materiais para absorção de toxinas;
Indústria de alimentos	Celulose comestível (“nata de coco”);
Indústria de Papel	Substituição artificial de madeira, obtenção de papéis especiais;
Laboratórios	Técnicas cromatográficas, meio para cultura de tecidos;
Medicina	Pele artificial temporária, componentes de implante dentário;
Cosméticos	Estabilizador de emulsões;
Purificação de esgoto	Ultrafiltração de água, purificação de esgotos urbanos;
Energia	Membranas célula combustível;
Eletrônica	Materiais opto-eletrônicos;

Fonte: Adaptada (Donini et al., 2010).

A tentativa de produção de CB em escala industrial ainda apresenta dificuldades, por isso ainda é limitada. Uma de suas razões pode ser citado o custo de produção elevado, que é referente a energia necessária para o desenvolvimento bacteriano (LEE et al., 2014).

3.2.1. Síntese da Celulose Bacteriana

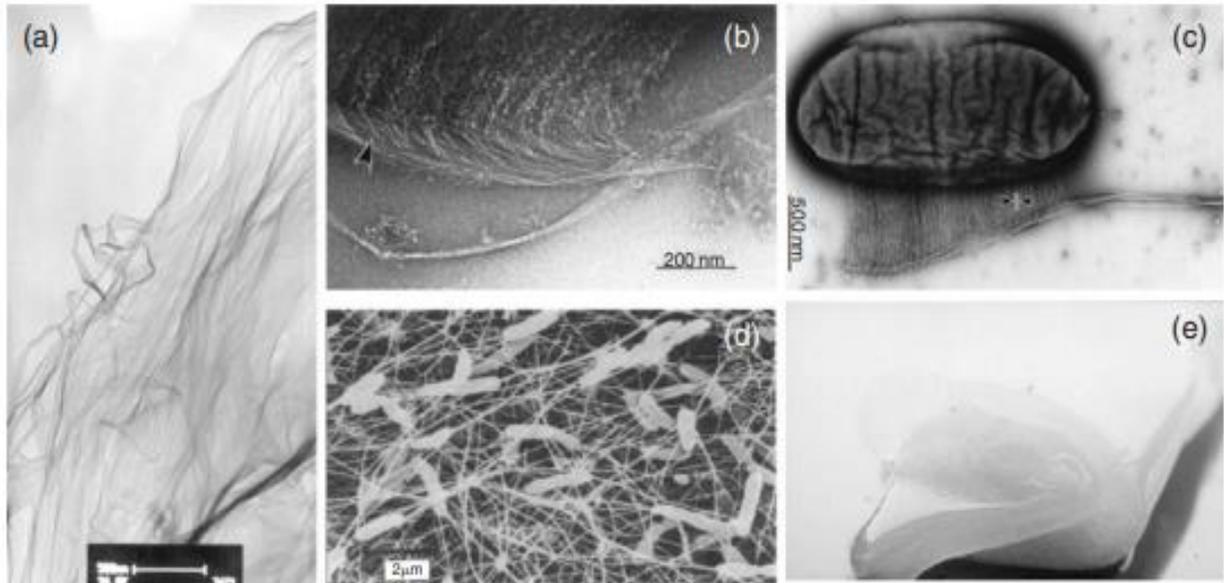
Existem diversas bactérias que podem sintetizar a celulose bacteriana, sendo principalmente as gram-negativas, pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Escherichia*, *Komagataeibacter xylinus* *Gluconacetobacter xylinus* (YAMADA et al., 2012), *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Sarcina*

(HASSAN et al., 2015; HUANG et al., 2014). Dentre todas as espécies, a *Komagataeibacter xylinus* é a mais utilizada como organismo modelo para estudo da biossíntese de CB, devido a sua elevada produtividade, sendo considerada para utilização em escala comercial (MORGAN et al., 2013).

A síntese da celulose bacteriana ocorre em várias etapas. Sendo a primeira delas, a sintetização da cadeia de celulose. Essa cadeia irá formar um aglomerado, que é chamado de microfibrilas. Em seguida, sua próxima fase é a formação da fita de celulose, através da junção dessas microfibrilas. Após essa formação, ela é eliminada para se unir com a bactéria e então ocorrer a fermentação (ANDRADE et al., 2010).

Para uma síntese com qualquer organismo produtor de celulose, são presentes duas fases: a formação de β -1,4-glucano e a montagem e cristalização da cadeia de celulose. As células da bactéria possuem muitos poros em sua membrana para extrusão de celulose, cada poro produz uma cadeia de celulose que vai se juntar com outras cadeias para formar uma fibrila elementar, medindo aproximadamente 3,5 nm de diâmetro. Cerca de 46 fibrilas se agrupam através de ligações de hidrogênio para criar uma fita, que tem largura entre 40 e 60 nm (Figura 6(a)). Essas fitas se enrolam para ocorrer a formação de uma fibra (Figura 6 (b)) que fica entrelaçada, originando uma película gelatinosa na superfície do meio de cultura líquido (Figura 6(c)). Esse filme que contém a bactéria é chamado de zooglea (é uma massa gelatinosa das bactérias Gram-negativas, aeróbicas em forma de bastonetes) (Figura 6 (d)), sendo a espessura dependente do tempo de cultivo, podendo chegar a 1 ou 2 cm (Figura 6 (e)). Quando essa membrana é produzida em meio estático, seu crescimento ocorre bruscamente (ganho elevado de massa) após o período de indução, e tende a diminuir após aproximadamente uma semana ou 10 dias (IGUCHI et al., 2000; HIRAI et al., 2002).

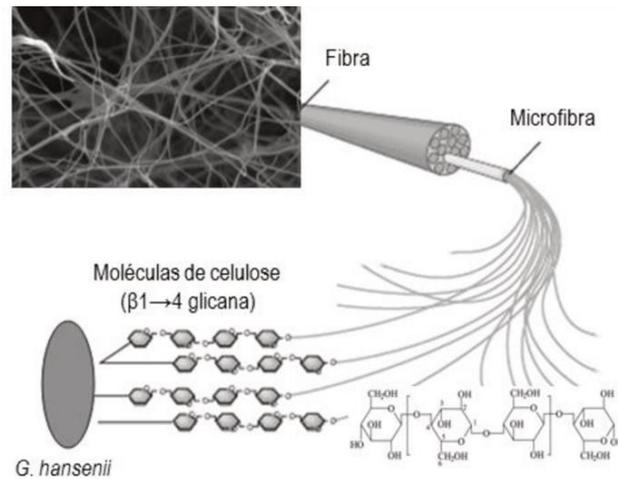
Figura 6 - a) Micrografia eletrônica mostrando as fitas de largura ~ 60 nm; b) a seta à esquerda indica o local onde as fibrilas estão enrolando; c) *K. xylinus* produzindo uma fibra de celulose; d) sem zooglea; e) zooglea recentemente colhida em cultura estática.



Fonte: Apatpada (Iguchi et al., 2000; Hirai et al., 2002).

Iguchi, Yamanaka e Budhiono (2000) descreveram que as fibras de celulose estão dispostas em camadas (uma sob a outra), formando uma membrana de alto valor de módulo de Young, que representa a elasticidade do material, e isso é justificado pelas ligações de hidrogênio e pequeno diâmetro das fibrilas. A Figura 7 representada abaixo, mostra o esquema da composição da celulose bacteriana, sendo a união de várias moléculas de celulose, que formam um aglomerado de ligações produzindo a microfibrila, sendo esta quando em conjunto formam as fibras de celulose bacteriana.

Figura 7 - Representação esquemática da produção da celulose bacteriana.



Fonte: Adaptada (Recouvreux, 2008).

Por mais que a CB não apresenta tantas impurezas, pelo fato de todo produto gerado ser obtido através de microorganismos, é preciso que ela passe por um processo de tratamento para a remoção das células e contaminantes. Mas como trata-se de um produto extracelular, todo esse processo de recuperação e purificação torna-se mais barato (CHAWLA et al., 2009). O método de purificação mais adequado é aquele que garante a eliminação das células bacterianas e do meio de cultura (resíduos da membrana), dessa forma é requerido água destilada, soluções de hidróxido de sódio e hipoclorito de sódio (IGUCHI et al., 2000).

3.2.2. Cultivo da Celulose Bacteriana

Para o crescimento de um microorganismo é necessário um meio de cultura adequado, contendo fonte de carbono e fósforo, suprimento de oxigênio, entre outros. Em relação às condições de cultivo, pode ocorrer de forma estática, onde a CB é sintetizada na interface ar/líquido; ou submersa, o qual se obtém celulose de formas variadas devido a agitação.

A cultura estática é mais vantajosa para a produção de CB por apresentar uma grande simplicidade e resistência mecânica, e não apresentar impurezas, o que faz baratear o seu custo. Ela ocorre de forma que inicialmente as bactérias consomem o oxigênio dissolvido no meio para se reproduzirem, começando a formar uma fina película. Essa película é gerada como meio de proteção dos sinais ambientais (luzes, evitar desidratação, facilitar a difusão de nutrientes, entre outros). Após vários dias de inoculação e fermentação com a temperatura entre 25-30°C e um pH

de 3-7, pode ser feito o cultivo da CB. Durante esse tempo, somente as bactérias que estão na interface ar/líquido são capazes de manter a sua atividade e continuar produzindo, aquelas que não estão em contato com o ar, estão em estado dormente, podendo ser reativadas e usadas como inóculo em novas culturas (LAVOINE et al., 2012). Assim uma camada gelatinosa e espessa vai se formando na superfície, nesta película está presente bactérias, ingredientes do meio de cultura e uma grande porção de água. Sua forma final, chamada de celulose bacteriana, é uma membrana flexível de cor desbotada, com um aspecto liso e homogêneo na parte superficial, rugosa e gelatinosa na parte em contato com o meio (PARTE et al., 2020). Terminada a produção, ela apresenta 99% de água com aspecto gelatinoso, e quando seca, se assemelha a uma folha de papel. Cada tipo de fermentação resulta em um diferente formato e cor de celulose, o qual depende do pH, temperatura e da fonte de carbono (NASCIMENTO, 2014). Portanto, quando a produção ocorre em cultivo estático, ela é limitada pela quantidade de oxigênio em contato com a superfície do meio e do tempo de fermentação (ÇAKAR et al., 2014).

Já a cultura agitada, representa um processo de crescimento de microorganismos no seu meio de cultura normalmente com sistema de agitação, produzindo formas irregulares de celulose em suspensão fibrosa. Sua vantagem é uma maior produtividade, mas ainda ocorre problemas como o surgimento de mutantes não produtores de celulose que acabam por dominar a cultura, resultando em baixo rendimento (REINIATI et al., 2017).

3.2.3. Meios de fermentação para síntese da celulose bacteriana

Meios de cultura são substâncias que fornecem nutrientes para os microorganismos se desenvolverem, e então ocorrer a fermentação. Eles podem ser classificados como aqueles que se desenvolvem em um meio complexo, obtido através de substratos naturais; e aqueles em que já apresentam uma composição de meio definida. O que geralmente ocorre é a utilização do meio com composição já conhecida, devido a sua facilidade de uso (ADNAN, 2015).

Para a produção desse polissacarídeo microbiano, a capacidade produtiva está ligada ao controle rigoroso de todos os parâmetros do processo fermentativo (BOLDRIN, 2015). Para seu desenvolvimento, eles necessitam de uma fonte de nitrogênio (obtida como sulfato de amônio) e fósforo (através de fosfato de potássio) em quantidades ideais; precisa também de uma reserva energética que seria a fonte de carbono (glicose, frutose, sacarose, etc.) e alguns oligoelementos que atuam como cofatores enzimáticos nas vias de produção da CB, que seria Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ,

entre outros. Para que não aconteça a competição pelo substrato e para que possa aumentar a colonização do meio, a celulose produzida pode atuar como matriz extracelular, além disso ela evita que ocorra o ressecamento dos substratos naturais, protege o organismo contra a luz ultravioleta e fornece nutrientes por difusão (ANDRADE et al., 2010).

Segundo Antônio et al. (2012), a temperatura influencia diretamente a produção e a morfologia da CB, sendo a temperatura ótima é de 27°C geralmente, podendo haver variação de 1°C acima. Se ocorrer um aumento da temperatura, pode afetar a hidrofiliabilidade das membranas de CB, tanto positivamente quanto negativamente. Já o pH ótimo para a produção da celulose bacteriana, depende de qual microorganismo será utilizado, de acordo com Antônio et al. (2012) a faixa de pH que melhor se desenvolveu foi de 4,0 – 6,0. Oxigênio dissolvido no meio é essencial para o metabolismo celular, quando em baixa concentração não ocorre o metabolismo microbiano, assim não há produção do polímero; já em altas concentrações há uma alta produção de ácido glucônico, que pode inviabilizar a produção (BOLDRIN, 2015).

A CB pode ser sintetizada por vários microorganismos a partir de várias fontes de carbono. Dessa forma, glicose (a mais utilizada), frutose e sacarose são fontes convencionais baseadas em carbono e alguns nutrientes. Isto se justifica pelo fato de 30% do custo do processo ser referente aos meios de fermentação (JOZALA et al., 2016). No entanto, vários resíduos ou subprodutos da agroindústria podem ser utilizados como fonte energética sem alterar as características da CB, eliminando o custo gasto com o meio. Por exemplo: resíduos agroindustriais como restos de frutas, hortaliças, bagaços; da indústria de papel e celulose tem-se lodo do processo de produção, tratamento da água utilizada e resíduos da madeira; curtumes encontra-se aparas de couro e lodo do processo; nas usinas sucroalcooleiras, o melaço é um subproduto com custo baixo e disponível, que contém elevado teor de açúcares totais, sendo, portanto, uma ótima fonte de carbono (DANTAS, 2010; RIVAS et al., 2004).

Assim como citado anteriormente, na Tabela 3 tem-se alguns exemplos de resíduos que atuam como fonte de carbono para a fermentação.

Tabela 3 - Resíduos como meios de fermentação alternativos para produção de celulose bacteriana.

Resíduo	Microorganismo	Referências
Sucos de frutas		
Coco	<i>G. xylinus</i> (TISTR 998, 975, 893)	Kongruang, 2008
Abacaxi	<i>G. xylinus</i> (TISTR 998, 975, 893), <i>A. xylinum</i> NBRC 13693	Kongruang, 2008
Cana-de-açúcar	<i>G. swingsii</i> sp	Castro et al., 2011
Melaço / xarope		
Bordo	<i>A. xylinum</i> BPR 2001	Zeng et al., 2011
Melaço da indústria cervejeira	<i>G. xylinus</i> ATCC 23768	Khattak et al., 2015
Resíduos de indústria alimentícia		
Permeado de soro de queijo	<i>G. xilynus</i> (ATCC 10821 e 23770), <i>G. sacchari</i>	Carreira et al., 2011
Casca de arroz	<i>A. xylinum</i> ATCC 23769	Goelzer et al., 2009
Glicerol	<i>G. sacchari</i> , <i>G. xylinus</i> NRRL B-42	Carreira et al., 2011;
Licor de cozimento	<i>G. sacchari</i>	Carreira et al., 2011

Fonte: Adaptada (EMBRAPA, 2019).

3.3. Produção filmogênica

Os biofilmes são geralmente produzidos com materiais biológicos, podendo citar as proteínas, polissacarídeos, lipídios e derivados. Sua produção ocorre através da solubilização dos biopolímeros em um solvente, e a adição de aditivos caso seja necessário, obtendo uma solução filmogênica (HENRIQUE, C. M., CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S., 2008). A modificação que ocorre no filme é consequência das interações intermoleculares e intramoleculares, dessa forma as características mudam de acordo com a concentração das macromoléculas (THARANATHAN, 2003).

Um biofilme pode ser caracterizado por somente uma espécie de bactéria ou por várias (o que é mais comum), como por exemplo as placas bacterianas encontradas em nosso dente. Aqueles biofilmes que são constituídos de apenas uma espécie de bactéria, existem em diversos

implantes médicos. Vários pesquisadores das áreas médicas têm dado atenção extra, uma vez que a formação de biofilme produz uma resistência a agente antimicrobianos, gerando infecções complexas (O'TOOLE et al., 2000).

A produção do biofilme vem sendo estudada, em um elevado nível de detalhamento para algumas espécies de bactérias. O'Tolle et al. (2000) analisaram organismos mutantes deficientes na produção de biofilmes, e esses estudos mostraram que a interação inicial das bactérias ocorre através de pilos e flagelos. Quando em contato com a superfície, as bactérias utilizam os pilos para se moverem até encontrar outras bactérias para formar um aglomerado e então iniciar a produção de exopolissacarídeos (EPS), vale ressaltar que quando em colônias, podem apresentar genes diferentes quando em forma isolada. A celulose tem sido identificada como EPS da matriz extracelular, que pode ser produzido por diferentes bactérias, durante a formação do biofilme (SPIERS et al., 2003).

Os filmes podem ser classificados em biodegradáveis ou comestíveis, e isso vai depender de sua composição, ou seja, os constituintes e suas quantidades (LE MOS, 2006). Filmes poliméricos são utilizados como embalagem de alimentos, isso se dá pelo fato de ter um baixo custo e boas características mecânicas e de barreira; também estão disponíveis em grande quantidade. Dessa forma o tipo de aplicação para o filme é quem vai definir a escolha de sua composição (HENRIQUE, 2008).

A maioria dos filmes apresentam um polímero de alto peso molecular como um componente importante para produção. Esse polímero é escolhido com base na sua capacidade de formar filmes que contenham matriz com força de coesão, sendo ela influenciada pela estrutura química do polímero, natureza do sistema-solvente, modo em que é aplicado, a formação do filme e sua diluição, assim como alguns outros fatores. Em geral, a coesão quando apresenta elevados valores é devido a polímeros polares ordenados, que sejam de cadeia longa e precipitam de forma cristalina (RIGO, 2006). Analisando todos os polissacarídeos utilizados para produção de filmes, o mais utilizado é o amido, devido a sua disponibilidade e a facilidade no manuseio (AYDIN e ILBERG, 2016).

Os filmes biodegradáveis podem ser produzidos através de diversas técnicas como *dip-coating*, *spin-soating* e *casting*. Destaca-se o método *casting*, devido ser uma técnica muito utilizada. Para que ocorra a formação do filme é preciso que a macromolécula utilizada tenha a capacidade de formar uma matriz contínua e seca, se baseia no espalhamento da solução

precursora sobre um substrato. Após toda a evaporação do solvente em que é utilizado, é formado o filme sobre a superfície do substrato (AMBROSI et al., 2008). Essa técnica além de apresentar um elevado potencial para aplicação em cenário industrial, apresenta também um baixo custo e alta produtividade; permitindo que ocorra a utilização de soluções ou dispersões a base de água sem a necessidade de empregar aditivos no processo. Uma característica de grande importância no processo de secagem é a umidade relativa dos filmes, sendo que filmes com maior teor dessa umidade apresentam estruturas com maior grau de cristalinidade e maior teor de umidade residual, sendo esta uma característica que tornam os filmes mais fáceis de alterações durante a utilização e armazenamento (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

Mesmo que essa técnica seja muito utilizada, ela apresenta algumas desvantagens como a dificuldade de incorporação de materiais de natureza diferente, problemas de retirada do filme no suporte utilizado na secagem e um período maior para que ocorra a secagem (MORAES, 2013).

3.3.1. Caracterização dos biofilmes

Testes de resistência a tração, módulo elástico e compressão podem ser realizados com polímeros. As propriedades mecânicas e térmicas dos biofilmes, sua espessura e a permeabilidade são características que são influenciadas conforme sua estrutura, condições de armazenamento e incorporação de compostos (PINHEIRO et al., 2010).

3.3.1.1. Propriedades mecânicas

Em filmes flexíveis, as propriedades mecânicas dependem da sua espessura, das características inerentes ao material e do processo de fabricação. Os polímeros têm suas propriedades dependentes da estrutura química do material, da aditivação, da estrutura molecular, da densidade, do peso molecular, da composição de blendas e outros, diz Sarantópoulos et al. (2002). A resistência a tração, propagação de rasgo, rigidez, resistência ao impacto e à perfuração são características muito influenciadas pelos fatores relacionados à orientação das moléculas, ao grau de cristalinidade, a homogeneidade da espessura do filme e a ocorrência ou não de defeitos superficiais (SARANTAÓPOULOS et al., 2002).

A resistência absorvida pelos materiais e a deformação por alongamento submetido a um esforço de tração é representado pelas propriedades de tração. Dessa forma, essa característica pode ser alterada de acordo com a espessura da amostra, o método de processo e a velocidade do

ensaio, então para que obtenha um bom resultado elas devem ser controladas, dessa forma impacta na qualidade da membrana, de acordo com a norma D882-91 da ASTM (1996).

O ensaio de tração ocorre da seguinte forma: o equipamento com as duas garras prende as extremidades do material e exerce uma força de sentido oposto a uma velocidade constante, sendo analisado ao longo do tempo a resistência que ela apresenta a deformação (SARANTÓPOULOS et al., 2002). Um dos ensaios de tração que pode ser realizado é o módulo de ruptura (MOR). Resistência máxima à tração: é a resistência máxima oferecida pelo material quando submetido à tração. É expressa em MPa, N/m² ou Kgf/cm², é denominada nominal pelo fato do cálculo ser feito através de suas dimensões originais, ou seja, antes do tracionamento (MATTA JR, 2009).

$$\sigma_{\max} = \frac{F_{\max}}{A_{\min}} \quad (1)$$

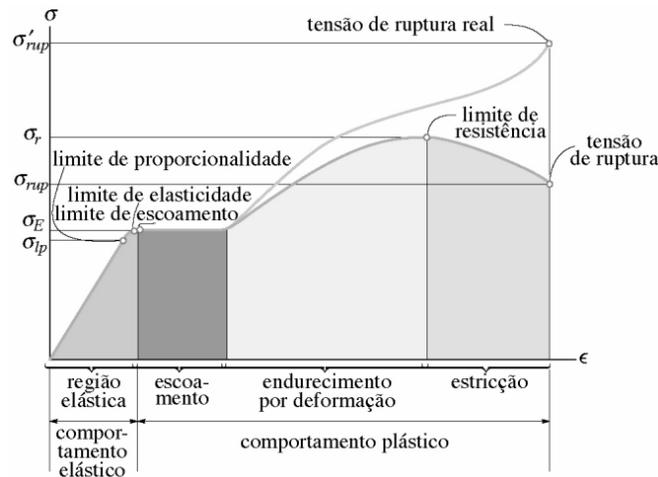
Onde: F_{\max} é a força máxima (N); A_{\min} é a área mínima transversal inicial do corpo de prova (m²).

O módulo de Young, é um outro ensaio realizado no material, que é representado pela relação entre a resistência a tração e a porcentagem de alongamento apresentada na região linear da curva de resistência a tração x deformação. Ele é um indicador de rigidez do filme, de modo que, quanto maior o módulo, mais rígido é o material. Para que ocorra a comparação por meio do módulo de elasticidade, todos os corpos de prova devem apresentar dimensões idênticas (RIGO, 2006)

Ou seja, o módulo de ruptura (MOR) é representado pelo limite que o material suporta antes de seu rompimento quando exposto a um esforço máximo; já o módulo de elasticidade (MOE) é o quanto o material pode ser elástico até o limite de proporcionalidade.

Com a aplicação de um ensaio de força em um material, pode ser construído uma curva de tensão-deformação que caracteriza o tipo de material e sua natureza. Nesse gráfico pode-se obter diversas informações, como mostrado na Figura 8 abaixo.

Figura 8 - Curva tensão-deformação.



Fonte: Adaptada (Google imagens, 2021).

3.3.1.2. Análises químicas

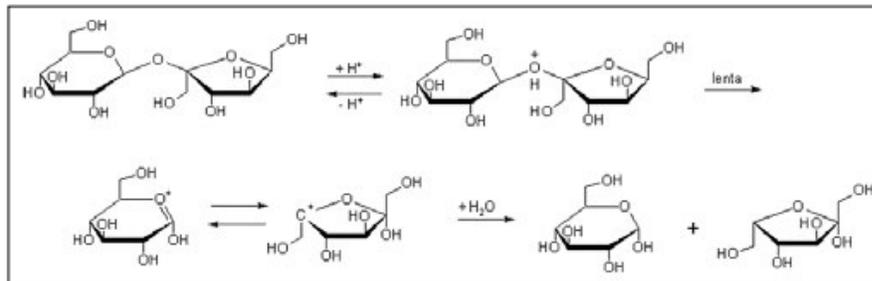
Açúcares são carboidratos que são caracterizados por suas características químicas. Eles podem ser classificados como monossacarídeos (sendo os mais simples) e os complexos (aqueles que apresentam mais de um monossacarídeo ligados entre si). A glicose, frutose e galactose são exemplos de monossacarídeos, já a sacarose é um dissacarídeo, que representa a ligação entre dois monossacarídeos, sendo eles a glicose e a frutose. Os monossacarídeos também podem ser chamados de açúcares redutores (AR) por apresentar um grupo carbonílico e cetônico livres, capazes de se oxidarem na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas. Já os demais açúcares são os açúcares não redutores (ANR), pois apresentam essa mesma característica sem sofrer hidrólise da ligação glicosídica, a soma destes açúcares resulta nos açúcares totais (AT) (BRUICE, 2014).

Para a realização de análises em açúcares não redutores, carboidratos complexos, é necessário uma hidrólise prévia, que pode ser conhecida também como reação de inversão, com isso será possível a realização da titulação de oxirredução do método de Eynon-Lane. Essa hidrólise causa uma alteração na substância, sendo ela quebrada em moléculas menores; é utilizado juntamente com a água um catalizador, sendo um ácido ou uma enzima (MCWILLIAMS, 2016).

A Figura 9 mostrada a seguir, é referente a hidrólise da sacarose, onde obtêm-se glicose e frutose, que são dois monossacarídeos redutores (ART) isômeros de estrutura. A sacarose possui

uma característica de inverter o plano da luz polarizada. Isso acontece quando essa luz polarizada incide sobre a molécula de sacarose (açúcar comum) se fazendo uma molécula dextrógira, e com a luz incidente sendo desviada, o açúcar invertido é uma molécula levógira (GABRIEL, 2009).

Figura 9 - Mecanismo de hidrólise da sacarose em meio ácido.



Fonte: Adaptada (Gabriel, 2009, p. 19).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microorganismos

A produção de membranas de celulose bacteriana foi feita utilizando-se no meio de cultura um SCOBY (*symbiotic culture of bacteria and yeast*) obtido de uma cultura replicada do Laboratório de Nanotecnologia Florestal pertencente ao Departamento de Ciências Florestais no Complexo de Biomateriais da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

4.2. Avaliação da condição ótima da concentração de sacarose

Para a produção dos filmes, foi necessário a realização de um pré-teste para a determinação da quantidade ótima de sacarose no meio de cultura para maximizar a produção de membranas de celulose. Este experimento foi realizado em triplicata, em um meio composto por chá verde, em concentração 40 g/L, cada replicata com 2,5 g de membrana e 3 mL do líquido presente no SCOBY, que foi o substrato da fermentação. Foram utilizadas 5 concentrações de sacarose distintas (100, 150, 200, 250 e 300 g/L). A produção das membranas de celulose foi conduzida em cultura estática durante 21 dias à temperatura de 25°C na ausência de luz. O tempo de fermentação foi definido com base no estudo de Grushkin (2015) no experimento chamado de Biocouture onde foram obtidos bons resultados com 21 e 30 dias de inoculação. Após a

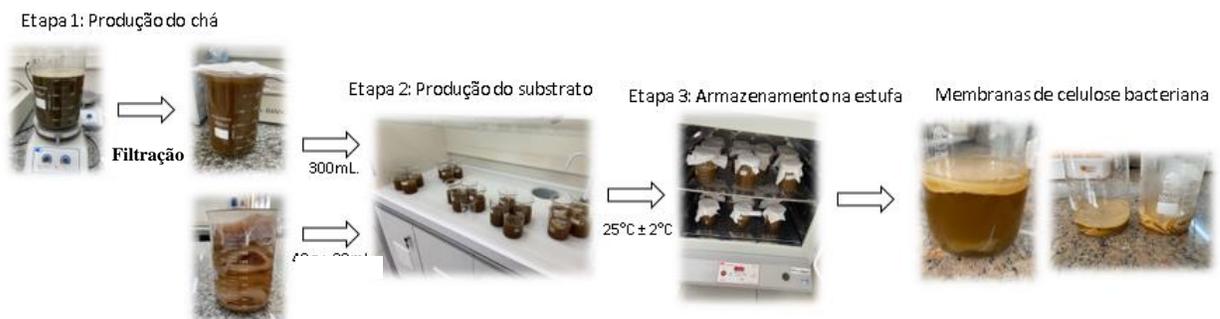
fermentação, a membrana de celulose foi coletada e homogeneizada no Turrax 102, em uma velocidade de 14000 rpm durante 15 min e posteriormente, ser levada em Estufa de Secagem e Esterilização (SOLAB/SL-100) por 24 horas a temperatura de 105°C para quantificação de sua massa seca.

4.3. Produção das membranas de celulose bacteriana

O meio de cultura foi preparado a partir de chá verde, que foi adquirido comercialmente (a granel). Como a primeira etapa do procedimento foi realizado a preparação do chá em uma concentração de 40 g/L em água destilada, utilizando um béquer de 5 L. Este béquer foi tampado para a infusão do chá durante 5 minutos, assim como no experimento realizado por Paludo (2017). Após esse processo, aguardou-se a temperatura atingir aproximadamente 30°C para continuar com o experimento, de acordo com Biz e Zohrer (2017). Após o decréscimo da temperatura, foi necessário fazer a filtração do chá, para retirada dos particulados. Dessa forma, na etapa 2, foi adicionado em cada béquer aproximadamente 300 mL do chá e 45 g de sacarose. Para completar, colocou-se aproximadamente 2,5 g da membrana e 3 mL do chá concentrado de membrana, tampando o mesmo com papel toalha. Posteriormente, na etapa 3, as amostras foram incubadas em Estufa de Secagem e Esterilização (SOLAB/SL-100) a 25°C, sem a presença de luz por 7, 14, 21, 28 e 35 dias, para que ocorresse a formação da membrana de celulose. Cada ensaio foi realizado com 4 repetições.

A produção de celulose bacteriana, foi baseada no fluxograma representado pela Figura 10.

Figura 10 - Etapas de produção da celulose bacteriana.



Fonte: Do Autor (2021).

4.4. Produção dos filmes

Os biofilmes foram produzidos a partir de soluções homogeneizadas a 1% de teor de sólidos, através do método *casting*. Este 1% de teor de sólidos é devido ao valor mínimo encontrado na amostra de 7 dias de fermentação.

Após finalizar cada período de fermentação, a primeira etapa foi a separação das biomembranas e de 50 mL do líquido fermentado para a realização das análises químicas. Em seguida, na etapa 2, as membranas foram homogeneizadas em um misturador Turrax 102, em uma velocidade de 14000 rpm com duração de 15 min. Na terceira etapa, foi feito o cálculo da umidade dos filmes em base úmida (para que todos estejam em um mesmo teor de sólidos) da seguinte forma, o recipiente utilizado foi pesado antes e depois da adição de 3 mL da suspensão e inseridas em Estufa de Secagem e Esterilização SL-100 (SOLAB) a uma temperatura de 105°C por 24 horas. Realizou-se então o seguinte cálculo referente à Equação 2 (STANDER METHODOS, 1967).

$$h = \frac{(mi-mf)}{mi} \times 100\% \quad (2)$$

Onde: h é o percentual de umidade, mi a massa inicial pesada e mf a massa final após o período de secagem. Cálculo realizado em base úmida.

Para a produção de cada filme na etapa 3, foram utilizados 60 mL de suspensão, sendo então colocado em placas de Petri para ocorrer a secagem, ou seja, a evaporação do solvente e contato com o meio. Foram produzidos 3 filmes correspondente ao tempo de fermentação. O período de secagem dos filmes foi de 5 a 15 dias em condições ambientais (25°C ± 2°C).

As etapas de produção dos filmes estão apresentadas na Figura 11.

Figura 11 - Produção dos filmes de celulose bacteriana.



Fonte: Do autor (2021).

4.5. Caracterização dos filmes

4.5.1. Análises mecânicas

Para realização das análises mecânicas do módulo de elasticidade (MOE) e de ruptura (MOR) baseados na norma ASTM D882-0, foi necessário inicialmente confeccionar um total de 10 corpos de provas com dimensões específicas de 10 mm de largura e 100 mm de comprimento, a espessura de cada filme era de 0,03 mm. Em seguida, esses corpos de provas foram para o ensaio de resistência a tração, utilizando-se o texturômetro (Stable Microsystems, TATX2i, England) que é equipado com célula de carga de 1 KN e uma velocidade de 2 mm/s durante o ensaio.

4.5.2. Análises químicas

Foram realizadas análises químicas para quantificação da sacarose presente nas amostras do meio de cultura coletado durante os ensaios da fermentação.

Foram utilizados dois métodos para a realização dos experimentos: primeiramente uma hidrólise ácida da sacarose e posterior, a quantificação dos açúcares redutores pelo método do DNS (MILLER, 1959) de acordo com o procedimento de Vasconcelos, et al. (2013), publicado pela Embrapa.

4.5.2.1. Determinação da curva padrão

Preparou-se uma solução mãe de glicose e frutose 1 g/L, para a quantidade de ponto da curva (10 pontos). Para um volume final de 5 mL no tubo de ensaio, foi necessário fazer uma diluição para cada concentração de sacarose e então analisar a quantidade ideal de volume seria necessário adicionar, isto pode ser mostrado na Tabela 4, a qual foi utilizada a Equação 3:

$$C_f * V_f = C_i * V_i \quad (3)$$

Onde: C_f é a concentração final (g/L), C_i é a concentração inicial (g/L), V_f o volume final (L) e V_i o volume inicial (L).

Após a diluição de cada solução, separou-se 0,5 mL de cada uma delas, e adicionou-se 0,5 mL do DNS em cada tubo. Após a agitação dos tubos, são levados para o banho-maria (Centauro – Banho Maria/CBM08A) a temperatura de 100°C durante 5 min. A reação é interrompida transferindo-se os tubos em um recipiente com gelo e água fria por 5 min. Feito

isso, as soluções contidas nos tubos foram completadas até um volume de 4 mL com água destilada e então homogeneizada, para realizar a leitura da absorbância através do Espectrofotômetro BEL V- M5 a 540 nm, considerando a amostra de calibração chamada de branco.

Tabela 4 - Diluição das amostras para realização do experimento.

Amostra	C_f (g/L)	V_{sol} (mL)	Água destilada (mL)
1	0,1	0,5	4,5
2	0,2	1,0	4,0
3	0,3	1,5	3,5
4	0,4	2,0	3,0
5	0,5	2,5	2,5
6	0,6	3,0	2,0
7	0,7	3,5	1,5
8	0,8	4,0	1,0
9	0,9	4,5	0,5
10	1,0	5,0	0,0

Fonte: Do Autor (2021).

Com as absorbâncias e as concentrações, criou-se a curva padrão através de uma média com o desvio padrão das duas replicatas, e depois o coeficiente angular. De acordo com a Equação 4 foi calculada a quantidade de açúcares redutores presente na amostra.

$$C = ABS \times f \times d \quad (4)$$

Onde: C é a concentração de açúcares redutores totais (g/L); ABS a média das absorbâncias lidas; f é o fator de concentração (inverso do coeficiente angular) e d a diluição da amostra.

4.5.2.2. Hidrólise da sacarose

A sacarose pode ser fragmentada em glicose e frutose quando está sob influência de uma enzima invertase ou quando reage com ácidos. Esse procedimento foi realizado com base no de Brasil (2016), publicado pelo MAPA.

Antes de iniciar o procedimento da hidrólise, a amostra foi colocada em uma centrífuga (FANEM 2206) por 3 min a 3000 rpm para a decantação dos particulados. Como foi considerado uma solução com alto teor de sacarose, utilizou-se 1,25 mL da amostra da fermentação e adicionado 0,25 mL de HCL concentrado. Esses valores foram encontrados através da proporção a seguir. Na metodologia tem-se:

$$5 \text{ mL de amostra} + 1 \text{ mL de ácido} \rightarrow 100 \text{ mL de solução}$$

Para uma redução no volume da solução, diminuiu-se então em 4x. Resultando em:

$$1,25 \text{ mL de amostra} + 0,25 \text{ mL de ácido} \rightarrow 25 \text{ mL de solução}$$

Portanto tem-se uma primeira diluição, 1:20 ($D = 20$).

Feito isso, o recipiente foi imerso em banho maria (70°C) durante 15 min para ocorrer a inversão dos açúcares. Passados os 15 min, a solução foi neutralizada utilizando NaOH 5 Molar e papel tornassol para registrar o pH, e depois completou-se o volume com água destilada até 25 mL e homogeneizou-se.

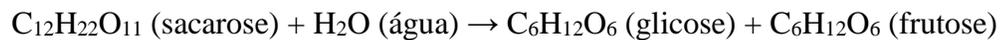
Os ensaios foram feitos com o sobrenadante coletado dos ensaios de fermentação com o tempo de incubação de 7, 14, 21, 28 e 35 dias. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Após a realização de todos os ensaios, a concentração da solução ainda não se encaixa na curva padrão de 1 g/L, sendo necessário uma segunda diluição. A solução inicial que foi utilizada no meio de cultivo apresenta uma concentração de 150 g de sacarose em 1000 mL, como foi utilizado apenas 1,25 mL do líquido fermentado para hidrólise, tem-se teoricamente 0,1875 g do açúcar que foi diluído para um volume de 25 mL, logo sua concentração é de 3,75 g/L. Com a obtenção deste valor, para a realização da quantificação com DNS, foi necessário diluir em 4x para que essa concentração fique dentro da utilizada como curva padrão. Dessa forma, obteve-se uma segunda diluição, 1:4 ($D = 4$).

4.5.2.3. Quantificação dos açúcares redutores com DNS

Para realizar a quantificação da amostra de sacarose hidrolisada, primeiramente foi diluída essa solução em 4 vezes, para que não ocorresse a extrapolação na curva padrão, como citado anteriormente. Em seguida, foi transferido 0,5 mL dessa solução hidrolisada e diluída para o tubo de ensaio, juntamente com 0,5 mL do reagente DNS. Agitou-se os tubos e foram para o

banho maria, a uma temperatura de 100°C durante 5 min. Com a finalização do tempo, os tubos foram para banho frio com gelo por 5 min para que a reação fosse estagnada. Para medir a absorvância do mesmo, com um volume final de 5 mL nos tubos de ensaios, foi acrescentado 4 mL de água destilada para a homogeneização. Após a homogeneização, foi transferido o líquido para os tubetes e então realizado a medida de sua absorvância. Com a curva padrão já calculada e com o valor médio das absorvâncias foi possível determinar a concentração de açúcares redutores totais de acordo com a Equação 4. Visto que a sacarose se quebra em uma molécula de glicose e uma de frutose, e com a obtenção de suas concentrações, foi feito a quantificação de sacarose presente na solução. Através da estequiometria, tem-se que:



A relação entre os açúcares redutores e sacarose pode ser representada por:

$$\frac{\text{frutose} + \text{glicose}}{\text{sacarose}} = \frac{360}{342} = 1,053 \quad (5)$$

Dessa forma, temos que:

$$\text{sacarose} = 0,95 \times \text{ART} \quad (6)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da condição ótima da concentração de sacarose

Todos os dados obtidos no experimento para avaliação da concentração ótima de sacarose para produção da membrana de celulose bacteriana estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores de umidade, massa seca de CB e massa seca de CB/grama de substrato.

Sacarose (g/L)	Umidade (%)	Massa seca (g)	Massa seca/massa de substrato $\times 10^{-3}$ (g_{ms}/g_s)
100	97,19 \pm 0,0011	0,7002 \pm 0,0264	7,0020 \pm 0,000264
150	96,75 \pm 0,0003	0,8176 \pm 0,0113	5,4507 \pm 0,000075
200	97,37 \pm 0,0013	0,6555 \pm 0,0302	3,2775 \pm 0,000151
250	97,44 \pm 0,0008	0,6355 \pm 0,0218	2,5420 \pm 0,000081
300	97,78 \pm 0,0006	0,5508 \pm 0,0140	1,8360 \pm 0,000047

Fonte: Do autor (2021).

Em um primeiro momento, nota-se que o teor de umidade da celulose bacteriana apresenta valores próximos. Os elevados valores de umidade condizem com a teoria citada no referencial teórico, quando caracterizam a celulose bacteriana como um hidrogel, e isso pôde ser comprovado pelo fato da celulose ser capaz de reter elevada porcentagem de água em sua estrutura, chegando a aproximadamente 99% seu teor de água (NASCIMENTO, 2019).

Ao analisar a coluna de massa seca, observa-se que após 24 horas de estufa, o seu maior valor é representado com a concentração de 150 g/L, ou seja, com 150 g/L de sacarose a membrana apresenta uma maior quantidade de material presente (celulose bacteriana). Dessa forma, quanto menos água tiver presente na membrana, mais material estará disponível, sendo este o objetivo para uma melhor produção de filme. A coluna de massa seca em relação à massa de substrato, representa a quantidade de massa seca produzida por grama de substrato consumido. Um outro ponto a ser observado, é que a medida em que a concentração de sacarose do meio foi aumentando, a massa seca de CB produzida, foi diminuindo. Uma das justificativas possíveis para esse acontecimento, pode ser pelo fato de o meio estar supersaturado, dessa forma as bactérias presentes não conseguem se desenvolver e acabam em estado de latência; outro ponto a ser analisado é que se tratando microorganismos vivos não especificados, outras reações podem estar acontecendo devido às condições aplicadas, dessa forma consumindo o açúcar que estava presente no meio para formação de outros produtos, como citado por Biz e Zohrer (2017) e Vieira (2013).

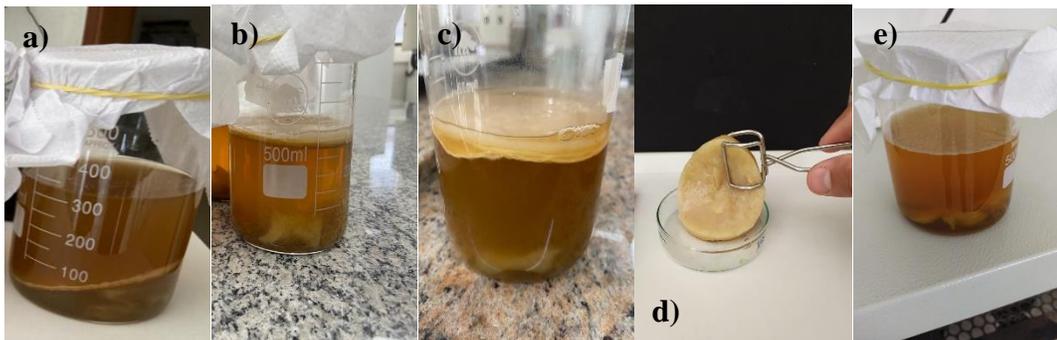
Como o objetivo é uma maior presença de material para fazer o estudo, utilizou-se a concentração de 150 g/L para dar continuidade na produção dos filmes. Assim como no estudo de

Schroeder (2019), a melhor amostra produzida foi a que obteve a maior massa seca advinda da membrana de celulose, resultando em um melhor biofilme.

5.2. Produção das membranas de celulose bacteriana

Na Figura 12 estão apresentadas as membranas produzidas através de seu respectivo tempo de fermentação. Assim como no estudo realizado por Grushkin (2015) citado anteriormente, onde o tempo indicado para se obter maiores membranas de celulose bacteriana é de 21 a 30 dias, resultados semelhantes foram obtidos neste trabalho, visto que as membranas de celulose de maior espessura são aquelas formadas com 21 e 28 dias (Figura 12). Pode-se comparar também com Morais (2017), que citou em sua tese que com o passar do tempo, a membrana tende a se tornar mais grossa, obtendo a espessura máxima em 30 dias. Vale ressaltar que, pode ter havido alguma forma de contaminação com a membrana de celulose bacteriana formada com 35 dias, pelo fato de não apresentar o comportamento esperado. Essa contaminação pode ter ocorrido por diversos fatores, como por exemplo a utilização de algum equipamento com sujeira, devido a passagem de ar no papel que fechava o recipiente. De acordo com Paludo (2017), o recipiente se não fechado corretamente, pode ocorrer a passagem de ar com insetos e/ou sujeiras físicas, contaminando a amostra.

Figura 12 - Membranas de celulose bacteriana produzida por tempo de fermentação: a) 7 dias; b)14 dias; c)21 dias, d)28 e e)35 dias, respectivamente.



Fonte: Do autor (2021).

5.3. Caracterização dos filmes

Para a caracterização dos filmes produzidos pela celulose bacteriana, foram feitos os testes de MOE e MOR, ou seja, foi analisado o módulo de elasticidade e de ruptura do mesmo. E realizou-se também o estudo da concentração de sacarose que foi consumida do meio para a formação da membrana de celulose.

5.3.1. Análises mecânicas

Foram realizados os testes de tração e elasticidade com base na metodologia citada, e obtiveram-se então os dados referentes a estes testes. Eles foram realizados em triplicata, de acordo com cada amostra e seu respectivo tempo de fermentação.

Foi aplicada uma força no material, que se deforma até fraturar. Dessa forma, foi medido em todos os tempos, a tração suportada e o alongamento dos corpos de prova. Na Figura 13 são mostradas as fases do material enquanto está sob a ação de uma força.

Figura 13 - Ilustração do processo de realização da análise mecânica MOR e MOE até o rompimento do filme.

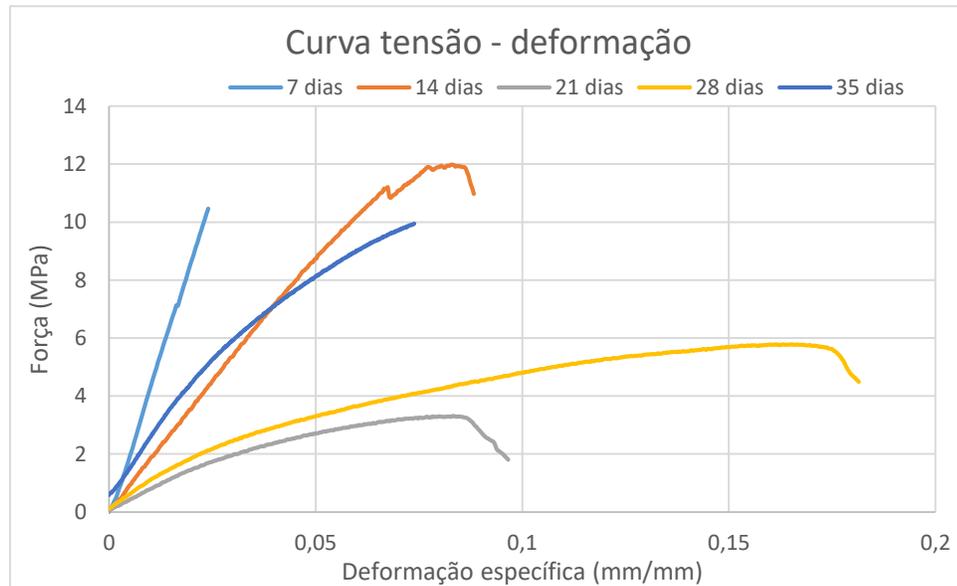


Fonte: Do autor (2021).

Inicialmente, o filme se apresenta sem tensão aplicada; na segunda fase, é possível observar o filme sendo deformado; na seguinte, acontece a ruptura da estrutura do filme (parcialmente); e por fim, cessa a resistência aplicada e o filme se apresenta rompido e deformado.

Através desta análise mecânica, é criada uma curva de tensão-deformação para cada amostra referente ao seu tempo de fermentação. Essas curvas são mostradas na Figura 14, através de vários pontos que representam diferentes valores de tensão e deformação.

Figura 14 - Dados comparativos obtidos através da média dos ensaios realizados da curva tensão-deformação referentes ao tempo de fermentação.



Fonte: Do autor (2021).

Através da Figura 14, é possível analisar o comportamento de todas as curvas de tensão-deformação referentes ao tempo de fermentação de forma comparativa. Pela curva de 7 dias, é possível observar que quando o filme começa a sofrer uma força, logo acontece sua ruptura total, não há mais nenhuma resistência sendo colocada sobre o material; pode-se observar então comportamento elástico, sendo que o material apresenta uma deformação e quando cessada a força, ele volta ao seu estado inicial.

Já na curva referente a 14 dias, é possível avaliar que o material suporta uma força maior comparado ao anterior. A tensão máxima de ruptura, ocorre quando o filme é estendido ao máximo e acontece o rompimento das fibras do material. Seu comportamento pode ser caracterizado como sendo plástico, visto que a curva chega até o momento de estirção, que é onde ocorre um estiramento do material e então ocorre seu rompimento.

Analisando a curva característica de 21 dias, observa-se que suportou uma menor tensão quando comparada com as outras, mas em relação ao comportamento da curva, é próximo da curva de 14 dias, visto que após sofrer a tensão máxima de ruptura, o filme não ocorre seu rompimento por completo, porém o que interessa é até onde o filme aguentaria sem se romper.

Com relação a curva de 28 dias, é notável sua grande deformação específica e sua tensão máxima, não tão alta. Isso pode ser avaliado de uma forma em que houve um grande estiramento do filme enquanto uma carga era aplicada sobre o mesmo, apresentando maiores deformações em sua estrutura. Assim como nas últimas curvas citadas, seu comportamento também pode ser plástico, com a análise dos dados sua curva chega até a tensão máxima e em seguida chega ao seu limite de ruptura. Comportamentos plásticos se caracterizam pelo material não voltar mais ao seu estado inicial quando a força é retirada, diferente do comportamento elástico.

A curva de 35 dias, apresentou um comportamento elástico não linear, devido aos pontos do seu ensaio representar uma curva e não uma reta como é o esperado de uma região elástica. Isso pode ser devido ao fato das amostras do dia 35, ter sido contaminada. Dessa forma apresentou um comportamento diferente dos demais.

Na Tabela 6, estão apresentados os dados obtidos para a máxima tensão de ruptura (MOR) e ao módulo de elasticidade (MOE) característicos de cada curva comentada anteriormente, os quais são referentes a cada tempo de fermentação que foi realizado o experimento.

Tabela 6 - Dados do módulo de elasticidade e do módulo de ruptura relacionados aos diferentes tempos de fermentação

Tempo	MOR (MPa)	MOE (GPa)
7 dias	10,789 ± 0,7830	0,386 ± 0,0461
14 dias	12,254 ± 0,3311	0,195 ± 0,0418
21 dias	8,341 ± 0,5709	0,068 ± 0,0020
28 dias	5,858 ± 0,4806	0,069 ± 0,0034
35 dias	5,128 ± 0,4189	0,067 ± 0,0008

Fonte: Do autor (2021).

Com os dados da Tabela 6 referentes à análise de ruptura do filme, o MOR, é possível observar a força máxima que pode ser exercida sobre o filme produzido antes de seu rompimento, sendo ele total ou parcial. Dessa forma, nota-se que aqueles filmes produzidos com 14 dias de fermentação, suporta a maior força de tensão com baixo desvio padrão; e à medida que o tempo aumenta, essa força é reduzida. Esse comportamento pode ser justificado por suas ligações

intramoleculares conferirem uma resistência ao material, ligações que ocorrem entre os grupos hidroxilas da mesma cadeia, apresentando um arranjo mais compacto.

Já em relação ao MOE, observa-se que nos filmes produzidos com maior tempo de fermentação o valor do módulo de Young diminui, e isso se refere a um filme mais elástico, pois quanto maior este módulo, mais rígido e menos elástico o material é. Assim, tem-se que com 21 dias, o material apresenta alta flexibilidade, se mantendo constante nos pontos seguintes. Essa elasticidade pode ser explicada devido a sua estrutura, a qual é formada por diversas camadas sobrepostas que são conectadas por ligações de hidrogênio e devido o diâmetro das fibrilas ser pequeno; todas essas características podem justificar o material apresentar grande elasticidade, segundo Iguchi, Yamanaka e Budhiono (2000).

Dessa forma, de acordo com MULLER et al. (2013), SAIBUATONG (2010) e ZHONG et al. (2013), pode-se concluir que os valores obtidos para MOR estão de acordo com a literatura, ou seja, a faixa de valores representados para filmes de CB é de 3-85 MPa para tensão de ruptura; já para o módulo de elasticidade é de 0,1- 16GPa, o que comprova os valores obtidos até 14 dias de fermentação, porém os valores referentes aos tempos de fermentação seguintes continuam decaindo e estão próximo de 0,1GPa. A discrepância entre os dados do MOE de 21, 28 e 35 dias pode ser justificado pelo fato de se tratar de microorganismos vivos e não ser possível controlá-los; cabe também o fato de ter sido utilizado SCOBY, que é constituído por diversas bactérias e levedura, e cada qual com sua particularidade. Mesmo com essa variação de acordo com a literatura, pode ser observado no estudo de Cordeiro (2015), que avalia as propriedades de uma película de amido com incorporação de celulose bacteriana, que o módulo de Young obtido foi de aproximadamente 0,08 GPa. Contudo, um maior diferencial da CB em relação à celulose vegetal é sua elevada elasticidade, visto que o módulo de elasticidade da celulose vegetal apresenta uma faixa de 5,5 – 12,6 GPa de acordo com Pecoraro et al., 2008 e Klenn, 2005.

Vale ressaltar que, os dados foram obtidos a partir de microorganismos não identificados do SCOBY, contudo, as variáveis que foram fixadas nos ensaios (temperatura, condição, tempo, etc) podem afetar diferentemente cada bactéria e levedura presentes no meio. Assim, para cada aplicação a ser utilizada, temos vários fatores a serem analisados e levados em consideração, como por exemplo, a necessidade de um filme com alta elasticidade, o ideal seria optar pelo tempo de fermentação de no mínimo 21 dias. Mas como o valor do MOE tende a ser constante, não faz sentido utilizar mais de 21 dias, pois haverá gastos não necessários com a produção. Com

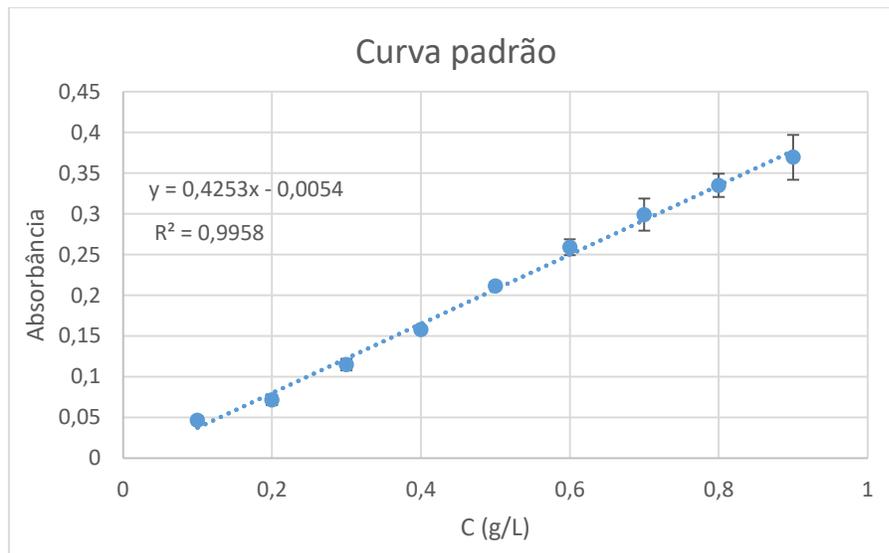
o estudo de Chawla (2009) que aborda a utilização de biofilmes para o tratamento de ferimentos crônicos na pele tem em suas características ótimas, a alta elasticidade.

5.3.2. Análises químicas

5.3.2.1. Determinação da curva padrão

De acordo com a metodologia citada anteriormente, foram obtidas as curvas-padrão da solução de glicose + frutose 1 g/L, que foi realizado em duplicata. Na Figura 15 apresentada a seguir, tem-se a curva padrão obtida da solução mãe.

Figura 15 - Curva padrão para frutose + glicose.



Fonte: Do autor (2021).

Ao analisar a curva padrão, observa-se que o coeficiente de determinação (R^2) apresenta um alto valor, isso quer dizer que os pontos estão próximos da linha de regressão ajustada ($R=1$).

Para a determinação da concentração dos açúcares redutores que será calculado em seguida após a hidrólise da sacarose, será aplicada a Equação 3, e para sua utilização é preciso do fator de concentração (f) que representa o inverso do coeficiente angular, representado pela equação da reta da Figura 15, encontrando um valor de 2,513 g/L.

5.3.2.2. Quantificação da sacarose

Para a quantificação de sacarose, a metodologia utilizada foi a mesma utilizada para realização da curva padrão a partir do DNS, apresentada anteriormente. Com a solução de sacarose para cada tempo de fermentação já diluída, foram realizados os experimentos e a leitura da absorbância, sendo representada pela Tabela 7.

Tabela 7 - Valores obtidos da absorbância, concentração de açúcares redutores e da concentração de sacarose no meio

Tempo (dias)	Absorbância	Concentração de ART (g/L)	Concentração de sacarose (g/L)
7	0,505 ± 0,0141	101,425 ± 0,9954	96,353 ± 0,9456
14	0,317 ± 0,0221	63,730 ± 1,5655	60,543 ± 1,3572
21	0,120 ± 0,0189	24,125 ± 0,5686	22,919 ± 0,5402
28	0,076 ± 0,0016	15,279 ± 0,8529	14,515 ± 0,8103
35	0,195 ± 0,0014	39,203 ± 0,2843	37,243 ± 1,0569

Fonte: Do autor (2021).

Através da Tabela 7, pode-se observar uma diminuição nos valores da absorbância da solução, com exceção de 35 dias (a qual apresentou um comportamento diferente devido a sua contaminação), que a absorbância representa a fração da energia luminosa que é absorvida pela solução e a transmitância a função contrária, o quanto de luz é transmitida pela solução. Dessa forma, é observado que com o passar do tempo os microorganismos presentes no meio vão consumindo o açúcar e sintetizando a membrana de celulose, com isso a transmitância tende a aumentar e a absorbância a diminuir, visto que a cor vai ficando mais clara, passando mais luz sob a solução. De forma que com uma solução mais escura, mais açúcar é presente no meio, podendo ser confirmado com os valores de concentração da Tabela 7. Logo, pode-se confirmar com a prática os resultados esperados. De acordo com Nascimento (2018), a turbidez da solução é diretamente proporcional à sua concentração, com isso, quanto mais turva em suspensão, mais concentrada a solução vai estar.

Ao observar o ponto referente ao dia 21, ele mostra uma queda brusca, e isso pode ser comprovado com a mudança da estrutura da membrana de celulose bacteriana referente. O comportamento dos dados pode ser explicado pelas fotos das membranas respectivas mostradas

na Figura 12, visto que a membrana do dia 21 está com uma maior espessura, sendo seguida pela de 28 dias, podendo ser mais bem vista; isso também pode ser observado no experimento de Schroeder (2019), o qual obteve melhor resultado de filme (mais espesso) com 21 dias. Pode-se notar também, que a partir do dia 28, os microorganismos não consomem quantidade considerável de sacarose, apresentando uma membrana não muito efetiva, isso se dá pela contaminação que ocorreu nas amostras de 35 dias podendo justificar seu comportamento.

Para a quantificação da sacarose, foi utilizada a Equação 4 para realizar o cálculo da concentração de açúcares redutores das amostras referente a cada tempo de fermentação. O fator f utilizado é 2,513 g/L e as diluições D consideradas é de 20 e 4, como foi explicado anteriormente, na metodologia. Em seguida, através das Equações 5 e 6, foram calculados os valores de sacarose presentes no líquido de cada fermentação. Ambos os valores estão mostrados na Tabela 7.

Portanto, como o esperado, a concentração de sacarose diminui com o passar do tempo de fermentação, então quer dizer que o decréscimo na concentração de sacarose apresentado na Tabela 7 mostra que o açúcar que era presente no meio foi utilizado para produção da membrana; a qual pode ser comprovada pelo aumento da espessura visivelmente das membranas. Este comportamento ocorre com excessão do tempo de 35 dias de fermentação, sendo que o mesmo não apresentou o comportamento esperado, visto que sua concentração deveria continuar decrescendo; porém como houve a contaminação, esse comportamento apresentou discrepância em relação aos outros.

Pode-se dizer que dois pontos apresentam melhores resultados se o objetivo é ter uma maior quantidade de material (celulose), o ponto de 21 e 28 dias, porém, vale ressaltar que em um período de tempo de 7 dias, ainda houve um consumo de açúcar considerável pelos microorganismos, o que fez acontecer uma modificação na síntese da membrana de celulose, mas a escolha do tempo vai depender da aplicabilidade que será utilizada, uma vez que um longo tempo de produção pode não ser viável em relação ao custo gasto para tal.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, podemos verificar que a melhor concentração de açúcar para utilizar na produção do filme foi de 150 g/L, a qual obtem-se o maior valor de massa seca presente. Um outro ponto é análise da etapa de produção de CB, pode-se concluir que o tempo de

fermentação que apresentou a membrana de celulose com maior espessura e maior massa seca, foi com 21 dias. Após esse tempo, ainda foi obtido um crescimento com 28 dias, porém mostrando constância. Em seguida, avaliando a produção dos biofilmes e realizando a caracterização de suas propriedades mecânicas, observa-se um melhor desempenho em relação ao módulo de ruptura na amostra sintetizada com 14 dias, pois oferece o maior valor em MPa. Já em relação ao módulo de elasticidade, a amostra com 21 dias foi a que apresentou maior resultado, apresentando uma constância após esse tempo. Diante desta situação, deve ser analisado qual será a aplicabilidade que terá o filme, se é necessária uma maior tensão de ruptura ou um comportamento mais elástico. Já em relação às análises químicas realizada pelo líquido da fermentação, foi possível confirmar toda análise feita anteriormente, que a membrana de celulose se torna mais espessa a medida que aumenta o tempo, de forma que a concentração de sacarose foi decrescendo, com exceção da amostra de 35 dias de fermentação, a qual a concentração de sacarose não se comportou conforme o esperado, visto que ocorreu uma contaminação da mesma. Assim, conclui-se que os microorganismos estava consumindo o açúcar para a síntese da membrana de celulose.

A partir da obtenção e avaliação dos dados, pode-se concluir que os resultados e comportamentos esperados foram alcançados. Vale ressaltar que pelo fato do trabalho ser desenvolvido com um SCOBY contendo colônias de espécies de bactérias e leveduras não identificadas, a comparação dos dados obtidos com a literatura torna-se mais difícil, uma vez que a podemos estar comparando resultados com outros obtidos a partir da utilização de outros microorganismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADNAN, A. B. **Production of bacterial cellulose using low-cost media**. 2015. 179 f. Thesis (Doctor of Philosophy) - University of Waikato, Hamilton. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10289/9165>. Acesso em: 11 de Agosto de 2021.
2. AMBROSI, A.; MORRIN A.; SMYTH, M.R.; KILLARD, A.J. **The application of conducting polymer nanoparticle electrodes to the sensing of ascorbic acid**; *Analytica Chimica Acta*, v.609, p.37-43, 2008.
3. ANDRADE, F. K.; PERTILE, R. A. N.; DOURADO, F.; GAMA F. M. **Bacterial Cellulose: Properties, Production and Applications**. In: LEJEUNE, A.; DEPREZ, T. (Eds.). *Cellulose: structure and properties, derivatives and industrial uses*. New York: Nova Science Publishers, 2010. p. 427-458.
4. ANDRADE, R. et al. **Wettability of gelatina coating formulations containing cellulose plasticizers on functional properties of gelatina-based films**. *Food Research International*, v. 87, n. 1, p. 678-687, 2010.
5. ANTÔNIO, R.V.; RECOUVREUX, D.O.S.; NAZARIO, A.C.; TIMBONI, D.; FERRARINI, E.; REDOWANSKI, G.P.; CAUDURO, M.T; PERES, S.S. **Produção de celulose bacteriana a partir de diferentes substratos**. *Técnico Científica (IFSC)*, Araranguá, v. 3, n. 1, p. 176-182, set. 2012.
6. AYDIN, A. A.; ILBERG, V. **Effect of different polyol-based plasticizers on thermal properties of polyvinyl alcohol: starch blends**. *Carbohydrate Polymers*, v. 136, p. 441-448, 2016.
7. BASIL, Zelita et.al. **Determinação de Açúcares por Titulometria**. MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2016. Disponível em: IT LABV 026 Rev02 - Determinação de açúcares por titulometria.pdf — Português (Brasil) <www.gov.br>. Acesso em 10 de agosto de 2021.
8. BIAZUS, André; HORA, André Barros da; LEITE, Bruno Gomes Pereira. **Panorama de mercado: celulose**. BNDES Setorial, n. 32, set. 2010, p. 311-370. Disponível em: Biblioteca Digital do BNDES: Panorama de mercado: celulose. Acesso em: 09 de Março de 2021.

9. BIZ, P; ZOHRER, P. **Growing material: the use of bacterial cellulose in product design**. 3º Simpósio de Pós-Graduação em Design da EDSI. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: Academia.edu. Acesso em: 17 de Novembro de 2021.
10. BOLDRIN, L. F. **Biossíntese, aplicabilidade e recentes avanços no estudo da celulose bacteriana**. 2015. 50 fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Bioquímica) Universidade de São Paulo, Lorena. 2015.
11. BRUICE, Paula Y. **Fundamentos de química orgânica**. 2. Ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2014. E-book.
12. CAMPANO, C.; BALEA, A.; BLANCO, A. et al. **Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review**. Cellulose. v. 23, n. 1, p. 57-91, 2016.
13. CARREIRA, P.; MENDES, J. A. S.; TROVATTI, E.; SERAFIM, L. S.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. **Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose**. Bioresource Technology, Barking, v. 102, n. 15, p. 7354-7360, 2011.
14. CASTRO, C.; ZULUAGA, R.; PUTAUX J.; CARO, G.; MONDRAGON, I.; GANÁN, P. **Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes**. Carbohydrate Polymers, Oxford, v. 84, n. 1, p. 96-102, 2011.
15. CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. **Fermentative Production of Microbial Cellulose**. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107-124, 2009.
16. CHOI, W. Y. et al. **Wettability of Chitosan Coating Solution on “Fuji” Apple Skin**. Journal of food Science, Hobokem, v. 67, n. 7, p. 3-7, 2002.
17. COIMBRA, Cynthia G.O. **Produção de celulose bacteriana por *Gluconacetobacter xylinus* e elaboração de filmes comestíveis**. 2015. f.137. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências, Recife.
18. CORDEIRO, Naiara F. **Obtenção e caracterização de películas biodegradáveis de amido de mandioca incorporados com celulose bacteriana**. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campo Mourão, 2015.

19. DANTAS, E. M.; AQUINO, L. C. L. **Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana.** Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v. 12, n. 1, p. 81-87, 2010.
20. DONINI, I.A.N., SALVI, D.T.B., FUKUMOTO, F.K, WILTON, R.L., BARUD, L.H., MARCHETTO, R., MESSADDEQ, Y., RIBEIRO, S.J.L. **Biosynthesis and recent advances in production of bacterial cellulose.** Revista Eclética Química, v. 35, p. 165 - 178, 2010.
21. DUARTE, Édén B. et al. **Celulose bacteriana propriedades, meios fermentativos e aplicações.** Embrapa,35p, Documentos / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 2179-8184; 186. Fortaleza, 2019.
22. FAKHOURI, F. M.; FONTES, L. C. B.; GONÇALVES, P. V. M.; MILANEZ, C. R.; STEEL, C. J.; COLARES-QUEIROS, F. P. **Filmes e Coberturas Comestíveis Compostas às Base de Amidos Nativos e Gelatina na Conservação e Aceitação Sensorial de Uvas Crimson.** Ciência e tecnologia de Alimentos, v. 27, p. 369-375, 2006.
23. PARTE, F. G. B.; SANTOSO, S. P.; CHON, C.; VERMA, V.; WANG, H.; ISMADJI, S.; CHENG, K. **Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose,** 2020. Critical Reviews in Biotechnology, 40:3, 397-414, DOI: 10.1080/07388551.2020.1713721. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1713721>. Acesso em: 15 de Março de 2021.
24. GABRIEL, Juliana R. **Estudo da hidrólise de carboidratos em meio neutro, utilizando mistura de ésteres derivados do óleo de mamona.** Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009. Tese de doutorado.
25. GOELZER, F. D. E.; FARIA-TISCHER, P. C. S.; VITORINO, J. C.; SIERAKOWSKI, M. R.; TISCHER, C. A. **Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark.** Materials Science and Engineering: C, Raleigh, v. 29, n. 2, p. 546-551, 2009.
26. GRUSHKIN, Daniel. **Cultured Couture: Suzanne Lee wants to grow clothing in a lab.** Popular Science, v. 286, n. 3, p. 48–51, 2015. Disponível em: <https://www.popsci.com/meet-woman-who-wants-growing-clothing-lab/>. Acesso em: 03 de Fevereiro de 2021.
27. HASSAN, E. A.; ABDELHADY, H. M.; EL-SALAM, S. S. A.; ABDULLAH, S. M. **The characterization of bacterial cellulose produced by *Acetobacter xylinum* and *Komagataeibacter saccharovorans* under optimized fermentation conditions.** British Microbiology Research Journal, Gurgaon, v. 9, n. 3, p. 1-13, 2015.

28. HENRIQUE et al. **Diferentes alternativas para embalagens**. Pesquisa & Tecnologia, vol. 13, n. 1, Jan- Jun 2016. Disponível em: http://www.apta regional.sp.gov.br/acesse-osartigos-pesquisa-e-tecnologia/agregacao-de-valor-e-eng-de-alimentos/edicao-2016/janeirojunho-4/1682-diferentes-alternativas-para-embalagens/file.html?force_download=1 . Acesso em: 03 de Agosto de 2021.
29. HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S. **Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca**. Ciênc. Tecnol. Aliment. n° 28, v.1, p.231-240, 2008.
30. HIRAI, A.; TSUJI, M.; HORII, F.; **TEM study of band-like cellulose assemblies produced by *Acetobacter xylinum* at 4°C**. Cellulose, 9. 2002, 105.
31. HUANG, Y.; ZHU, C.; YANG, J.; NIE, Y.; CHEN, C.; SUN, D. **Recent advances in bacterial Cellulose**. Cellulose, Houten, v. 21, p. 1-30, 2014.
32. IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. **Bacterial Cellulose: A masterpiece of nature's arts**. J. Mater. Sci. , 35, 2000, 261.
33. JOZALA, A. F.; DE LENCASTRE-NOVAES, L. C.; LOPES, A. M.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; MAZZOLA, P. G.; PESSOA-JR, A.; GROTTTO, D.; GERENUTTI, M.; CHAUD, M. V. **Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview**. Applied Microbiology Biotechnology, Berlin, v. 100, n. 5, p. 2063-2072, 2016.
34. KARBOWIAK, T. et al. **Wetting properties at the surface of iota-carrageenan-based edible films**. Journal of Colloid and Interface Science. Maryland Heights, v. 294, n.2, p. 400-410, 2006.
35. KHATTAK, W. A.; KHAN, T.; UL-ISLAM, M.; WAHID, F.; PARK, J. K. **Production, characterization and physic-mechanical properties of bacterial cellulose from industrial wastes**. Journal of Polymers and the Environment, New York, v. 23, n. 1, p. 45-53, 2015.
36. KLEMM, D.; PHILIPP, B.; HEINZE, T.; HEINZE, U.; WAGENKNECHT, W. **Comprehensive Cellulose Chemistry**, Wiley-VCH, Weinheim, 1998.
37. KLEMM, D., et al., **Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material**. Angewandte Chemie-International Edition, 2005. 44(22): p. 3358-3393.

38. KONGRUANG, S. **Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products**. Applied Biochemistry and Biotechnology, Clifton, v. 148, n. 1-3, p. 245-256, 2008.
39. LAVOINE, N.; DESLOGES, I.; DUFRESNE, A.; BRAS, J. **Microfibrillated cellulose: its barrier properties and applications in cellulosic materials: a review**. Carbohydrate Polymers, London, v. 90, n. 2, p. 735-764, 2012.
40. LEE, K. Y.; BULDUM, G.; MANTALARIS, A.; BISMARCK, A. **More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites**. Macromolecular Bioscience, Weinheim, v. 14, n. 1, p. 10-32, 2014.
41. MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. **Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n. 1, p. 137-156, jan./mar. 2010.
42. MARTINS, Douglas F. **Estudo da influência da hidrólise ácida da celulose extraída do capim Mombaça na produção de nanocristais de celulose com diferentes estruturas polimórficas**. 2016. 135f. Tese (Doutorando em Química) Universidade Federal de Uberlândia. Instituto de Química. Uberlândia, Minas Gerais. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/18124/1/EstudoInfluenciaHidrolise.pdf>. Acesso em: 25 de Agosto de 2021.
43. MATTA JR, M. **Caracterização de biofilmes obtidos a partir de amido de ervilha (*Pisum sativum*) associado à goma xantana e glicerol**. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz queiroz”. Piracicaba, 2009. 113p.
44. MCWILLIAMS, Margaret. **Alimentos: um guia completo para profissionais**. 10. Ed. São Paulo: Manole, 2016. E-book. Disponível em: <http://univates.bv3.digitalpages.com.br/users/publications/9788520436974/pages/-6>. Acesso em: 25 de Agosto de 2021.
45. MORAES, J.O. **Produção e caracterização de filmes de amido-glicerol-fibras de celulose elaborados por tape-casting**. P. 176. Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC. Florianópolis, 2013.
46. MORGAN, JL; STRUMILLO, J; ZIMMER, J. **Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation**. Nature. 2013;493(7431):181–186.
47. MULLER, D. **Incorporação de polímeros intrinsecamente condutores em nanofibras de celulose bacteriana**. Tese. Engenharia de Materiais. Universidade Federal de Santa Catarina. UFSC. 2012.

48. NASCIMENTO, Elígenes S. **Filmes nanocompósitos à Base de Celulose Bacteriana e Nanocristais de Celulose.** Tese de Doutorado pela Universidade Federal do Ceará; área de Processos Químicos e Bioquímicos, 2018.
49. NASCIMENTO, D. M. **Nanacomposites hydrogels based on nanocellulose for applications in agriculture.** 160 f. Universidade Federal do Ceará, 2019.
50. NASCIMENTO, E. S. **Extrato de algaroba como fonte alternativa para produção de celulose bacteriana.** 2014, 66 fls. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.
51. PALUTO, Natália. **Desenvolvimento e caracterização de kombucha obtida a partir de chá verde e extrato de erva-mate: processo artesanal e escala laboratorial.** Trabalho de conclusão de curso em Engenharia de Alimentos; Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Repositório Digital UFRGS, 2017. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/174899>. Acesso em: 17 de Novembro de 2021.
52. PARTE, Francisco G. B.; SANTOSO, Shella P.; et al. **Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose.** Critical Reviews in Biotechnology, Journal homepage, 40:3, 397-414, jan/2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/loi/ibty20>. Acesso em: 08 de Fevereiro de 2021.
53. PECORARO, E.; MANZANI, D.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. **Bacterial cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: preparation, properties and applications.** In: BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. (Eds.). Monomers, polymers and comp. from renewable resources. Amsterdã: Elsevier, 2008, p. 369-383.
54. PECORATO, Édison; MANZANI, Danilo; MESSADDEQ, Younes; RIBEIRO, Sidney J.L. **Bacterial Cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: Preparation, Properties and Applications.**
55. PINHEIRO, A. C.; CERQUEIRA, M.A.; SOUZA, B.W.S.; MARTINS, J.T; TEIXEIRA, J.A.; VICENTE, A.A. **Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares.** Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia. Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, Braga, Portugal, 2010.
56. RECOUVREUX, D. O. S. **Desenvolvimento de novos biomateriais baseados em celulose bacteriana para aplicações biomédicas e de engenharia de tecidos.** 2008. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Florianópolis, SC.

57. REINIATI, I; HRYMAK, AN; MARGARITIS, A. **Kinetics of cell growth and crystalline nanocellulose production by *Komagataeibacter xylinus***. *Biochem Eng J.* 2017;127: 21–31.
58. RIGO, N. Lisandra. **Desenvolvimento e caracterização de filmes Comestíveis**. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI). Erechim, RS, 2006. Disponível em: https://www.uricer.edu.br/eal_hp/DissertPDF/Turma2004/DissertLisandraRigo2006.pdf. Acesso em: 11 de Fevereiro de 2021.
59. RIVAS, B.; MOLDES, A. B.; DOMINGUEZ, J. M.; PARAJO, J. C. **Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus***. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 97, n. 1, p. 93-98, 2004.
60. SAIBUATONG, O. A., PHISALAPHONG, M. **Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis**. *Carbohydr Polym* 79(2): 455–460 (2010).
61. SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; MORAES, B. B. **Embalagens Ativas e Inteligentes para frutas e hortaliças**. CETEA, Instituto de Tecnologia em Alimentos, ITAL, Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens, vol21, n°1, Jan/Fev/Mar 2009.
62. SCHROEDER, Jéssica. **Kombucha fermentada a partir de resíduos de acerola**. Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, 2019.
63. SILVA, D. J., D’Almeida, M. L. O., 2009. **Cellulose Whiskers**. *O Papel* 70, 34-52.
64. SILVA, Everton M. **Produção e caracterização de filmes biodegradáveis de amido de pinhão**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Engenharia. Diplomação em Engenharia Química, dez/2011, Porto Alegre.
65. SILVA, R. O.; FREITAS FILHO, J. R.; FREITAS, J. C. R. **D-Glicose, uma Biomolécula Fascinante: História, Propriedades, Produção e Aplicação**. *Revista Virtual de Química*, 10(4),875-891, agosto,2018. Disponível em : <http://static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/v10n4a11.pdf>. Acesso em: 15 de Agosto de 2021.

66. SILVA, T. R. S. **Desenvolvimento de hidrogéis de celulose bacteriana para cultura de células e permeação de biomoléculas**. 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
67. SPIERS, A. J.; BOHANNON, J.; GEHRIG, S. M.; RAINEY, P. B. **Biofilm formation at the air-liquid interface by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose**. *Molecular Microbiology*, v.50, n.1, p.15-27, 2003.
68. THARANATHAN, R.N. **Biodegradable films and composite coating: past, present and future**. *Trends in Food Science and Technology*. V. 14, p. 71- 78, 2003.
69. VASCONCELOS, N. M., PINTO, G. A. S., & DE ARAGAO, F. A. S. (2013). **Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos**. Embrapa Agroindústria Tropical-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E).
70. WITTAYA, Thawien. **Rice Starch-Based Biodegradable Films: Properties Enhancement**. *Structure and Function of Food Engineering*. p. 953-978, n. 51. Prince of Songkla University, Thailand (2012). Disponível em: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/38357.pdf>. Acesso em: 23 de Fevereiro de 2021.
71. YAMADA, Y.; YUKPHAN, P.; VU, H. T. L.; MURAMATSU, Y.; OCHAIKUL, D.; NAKAGAWA, Y. **Subdivision of the genus *Gluconacetobacter* Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: The proposal of *Komagatabacter* gen. nov., for strains accommodated to the *Gluconacetobacter xylinus* group in the α -Proteobacteria**. *Annals of Microbiology, Milan*, v. 62, p. 849-859, 2012a.
72. ZENG, X.; SMALL, D. P.; WAN, W. **Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup**. *Carbohydrate Polymers, Oxford*, v. 85, n. 3, p. 506-513, 2011.
73. 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**. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 13-4908-8, 2013.
74. ÇAKAR, F.; ÖZER, I.; AYTEKIN, A. Ö.; ŞAHİN, F. **Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium**. *Carbohydrate Polymers, Oxford*, v.106, p. 7-13, 2014.