



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE FÍSICO-QUÍMICA E QUÍMICA ANALÍTICA**

**CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO**

**MARIA JOSÉ MAGALHÃES CARNEIRO**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA OBTIDA A  
PARTIR DO SUCO DE CAJU**

**FORTALEZA**

**2015**

MARIA JOSÉ MAGALHÃES CARNEIRO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA OBTIDA A PARTIR DO  
SUCO DE CAJU

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Química Bacharelado do Departamento de Físico-Química e Química Analítica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química com Habilitação em Química Industrial.

Orientador didático-pedagógico: Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula

Orientador Profissional: Dra. Morsyleide de Freitas Rosa

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- C289p Carneiro, Maria José Magalhães.  
Produção e caracterização de celulose bacteriana obtida a partir do suco de caju / Maria José Magalhães Carneiro. – 2015.  
49 f. : il., color.
- Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Físico Químico e Química Analítica, Curso de Química, Fortaleza, 2015.  
Orientação: Profa. Dra. Morsyleide de Freitas Rosa.  
Coorientação: Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula.
1. Biopolímeros. 2. Suco de caju. I. Título.


MARIA JOSÉ MAGALHÃES CARNEIRO


PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA OBTIDA A PARTIR DO  
SUCO DE CAJU


Monografia submetida à Coordenação do Curso de Química Bacharelado do Departamento de Físico Químico e Química Analítica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química com Habilitação em Química Industrial.

Aprovada em: 12/06/2015.

BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Morsyleide de Freitas Rosa (Orientador)  
Embrapa Agroindústria Tropical (Embrapa)

  
\_\_\_\_\_  
Me. Helder Levi Silva Lima (Examinador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais e familiares.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo Seu imenso amor, por ser meu porto seguro e por estar sempre ao meu lado proporcionando valiosas oportunidades.

Aos meus pais pelo incentivo e esforço para que eu pudesse trilhar o caminho até aqui. Por estarem sempre presentes nos momentos de conquistas e perdas, dando conselhos, força e suporte.

A toda minha família pelo apoio e incentivo, em especial ao tio Francisco Araújo e ao primo Igor Carneiro.

À Dra. Morsyleide, ao Helder, a Elígenes, ao Matheus e a toda equipe do Laboratório de Tecnologia da Biomassa pela orientação, apoio, incentivo, atenção, e receptividade para o desenvolvimento satisfatório do trabalho. Nesse período tive a oportunidade de trabalhar com pessoas sempre disponíveis para ajudar, mesmo estando ocupadas com seus trabalhos, o que concretiza um verdadeiro trabalho em equipe.

À equipe do Laboratório de Microbiologia da Embrapa.

A todos meus amigos que me ajudaram de forma direta e indireta. Sempre dando apoio, com palavras de incentivo e conselhos para vida acadêmica e pessoal.

À Embrapa Agroindústria Tropical por proporcionar a oportunidade de realizar o estágio supervisionado e desenvolver o trabalho.

## RESUMO

A utilização de fontes agroindustriais como meios de cultivo alternativos em processos fermentativos, como na produção de celulose bacteriana, vêm despertando interesse já que são de baixo custo e esta é uma maneira de agregar valor às cadeias agroindustriais. A celulose bacteriana é um biopolímero natural que apresenta características singulares como fibras com dimensões nanométricas, alto índice de cristalinidade e elevado grau de pureza o que a concede uma vasta aplicabilidade e interesse industrial. Nesse trabalho avaliou-se a produção de celulose bacteriana sintetizada por *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 53582 utilizando suco de caju. Para a produção de CB o microrganismo foi cultivado estaticamente por 10 dias em meio padrão sintético, no suco de caju puro e em diferentes meios formulados com suco de caju e diferentes suplementos. As películas purificadas foram caracterizadas por Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios-X (DRX), Análise Termogravimétrica (TGA) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A produção de CB no suco de caju puro foi de 2,3 g.L<sup>-1</sup> correspondendo a 52% da produção em meio padrão sintético. Nos meios com suco de caju suplementados, a maior produção (4,4 g.L<sup>-1</sup>) foi obtida no meio com extrato de levedura, peptona, ácido cítrico e fosfato de sódio, sendo tal produção estatisticamente semelhante à produção obtida em meio sintético padrão. As caracterizações das películas obtidas apresentaram resultados típicos de celulose bacteriana.

**Palavras-chave:** Celulose bacteriana, Fontes agroindustriais, Suco de caju, *Gluconacetobacter hansenii*.

## ABSTRACT

The use of agro-industrial sources as alternative culture medium in fermentation processes, such as production of bacterial cellulose (BC), have attracted interest since they are low cost and this is a way of adding value to agro-industrial chains. Bacterial cellulose is a natural biopolymer that exhibit unique characters: fibers with nanoscale dimensions, high crystallinity degree and, high purity, providing a wide applicability and industrial interest. In this study was evaluated BC production by *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 53582 using cashew juice. For CB production, the microorganism was cultivated statically for 10 days on standard synthetic medium, pure cashew juice and 3 different media with cashew juice and supplements. Purified BC films were characterized by Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR), X-Ray Diffraction (XRD), Thermal Gravimetric Analysis (TGA) and Scanning Electron Microscopy (SEM). BC production in pure cashew juice was  $2.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  corresponding to 52% of the production standard synthetic medium. In cashew apple juice media supplemented, the higher production ( $4.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was obtained in medium with yeast extract, peptone, citric acid and, sodium phosphate, and this production was statistically similar to production in standard synthetic media. The characterizations of the films obtained in all media showed typical of bacterial cellulose.

**Keywords:** Bacterial Cellulose, Agro-industrial sources, Cashew apple juice, *Gluconacetobacter hansenii*.



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	9
2	OBJETIVOS .....	11
2.1	Objetivo geral .....	11
2.2	Objetivos específicos .....	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	12
3.1	Celulose .....	12
3.2	Celulose Bacteriana .....	14
3.3	Aplicações da celulose bacteriana .....	15
3.4	Síntese de CB por <i>Gluconacetobacter hansenii</i> e condições de cultivo.....	17
3.5	Fontes alternativas para produção de celulose bacteriana.....	18
3.6	Suco de caju .....	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	21
4.1	Caracterização do suco de caju .....	21
4.1.1	<i>Açúcares redutores e totais</i> .....	21
4.1.2	<i>Nitrogênio Total, ácido cítrico e pH</i> .....	21
4.2	Avaliação da suplementação do suco de caju na produção de celulose bacteriana .....	22
4.2.1	<i>Meios de cultivo</i> .....	22
4.2.2	<i>Microrganismo, inóculo e condições de cultivo</i> .....	23
4.3	Purificação das películas de CB e análise dos extratos fermentados.....	23
4.4	Produção (g.L <sup>-1</sup> ) .....	23
4.5	Caracterizações das películas de CB .....	24
4.5.1	<i>Espessura</i> .....	24
4.5.2	<i>Umidade (U (%)) e Capacidade de Absorção de Água (CAA%)</i> .....	24
4.5.3	<i>Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	25
4.5.4	<i>Difração de Raios-X (DRX)</i> .....	25
4.5.5	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i> .....	25

4.5.6	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	25
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	26
5.1	<b>Caracterização do suco de caju</b> .....	26
5.2	<b>Produção de CB em diferentes meios de cultivo</b> .....	27
5.3	<b>Caracterizações das películas de CB</b> .....	30
5.3.1	<i>Espessura</i> .....	30
5.3.2	<i>Umidade (U (%)) e Capacidade de Absorção de Água (CAA%)</i> .....	32
5.3.3	<i>Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	34
5.3.4	<i>Difração de Raios-X (DRX)</i> .....	35
5.3.5	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i> .....	37
5.3.6	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	39
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	43
7	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44

## 1 INTRODUÇÃO

A celulose é o biopolímero mais abundante na natureza, presente principalmente na parede celular de plantas, porém, microrganismos como algumas espécies de bactérias são capazes de produzi-la durante os processos metabólicos. A celulose bacteriana (CB) possui estrutura química semelhante à celulose vegetal, porém muitas de suas características físicas são distintas, como fibras com dimensão nanométrica, alta pureza (livre de lignina, pectina e hemicelulose), elevada cristalinidade, alta resistência mecânica, entre outras (SHODA & SUGANO, 2005; DONINI *et al.*, 2010).

Devido a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, alta resistência mecânica e alta pureza a CB tem uma vasta aplicabilidade em diversas áreas, como biomédica, alimentícia, tecnológica, entre outras (TIBONI, GRZYBOWSKI & FONTANA, 2014; RAJWADE, PAKNIKAR & KUMBHAR, 2015; ESA, TASIRIN & RAHMAN, 2014).

A celulose bacteriana é produzida em meios de cultura compostos por açúcares e outros nutrientes adequados para o crescimento dos microrganismos. Os componentes nutricionais na sua forma pura apresentam um custo elevado e isso tem limitado a produção de CB em escala industrial. Uma alternativa para superar essa limitação é o desenvolvimento de meios de cultura com fontes de carbono e nutrientes de baixo custo e que apresentem uma produção similar ou superior aos meios sintéticos.

A produção agrícola gera biomassa que na maioria das vezes são descartadas de maneira inadequada no meio ambiente. Muitas delas são ricas em açúcares e nutrientes, sendo possível utilizá-las em processos fermentativos para síntese de produtos de interesse industrial.

A utilização de vários tipos de fontes agroindustriais na síntese de CB tem sido estudada, dentre eles estão sucos de frutas, água de coco, resíduos de levedura de cerveja, melaço de beterraba, líquido do sisal, extrato de algaroba, entre outros (KUROSUMI *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2008; KESHK *et al.*, 2006; LIMA, 2014; NASCIMENTO, 2014).

A cajucultura é de grande importância econômica para região nordeste do Brasil. Industrialmente, a castanha (verdadeiro fruto) é o produto de maior interesse,

e com isso o pedúnculo (pseudofruto) que é rico em açúcares e nutrientes, apesar de também ser utilizado pela indústria na produção de vários produtos alimentares, apresenta cerca de 90% de desperdício (FONTES *et al.*, 2013).

O pedúnculo do caju, por ser desperdiçado e ser rico em açúcares e nutrientes, pode ser utilizado em processos fermentativos agregando valor a biomassa e reduzindo a sua perda (HONORATO & RODRIGUES, 2010, FONTES *et al.*, 2009).

O presente trabalho propõe a produção de celulose bacteriana sintetizada por *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 53582 utilizando o suco de caju como fonte de carbono e nutrientes.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar a produção de celulose bacteriana por *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 53582 em cultivo estático utilizando o suco de caju como fonte alternativa.

### **2.2 Específicos**

Avaliar o efeito de diferentes suplementações do suco de caju na produção de celulose bacteriana;

Determinar o Teor de Umidade (U%), a Capacidade de Absorção de Água (CAA%) e a espessura (E) das películas de CB obtidas nos diferentes meios;

Caracterizar as películas por Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios-X (DRX), Análise Termogravimétrica (TGA) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

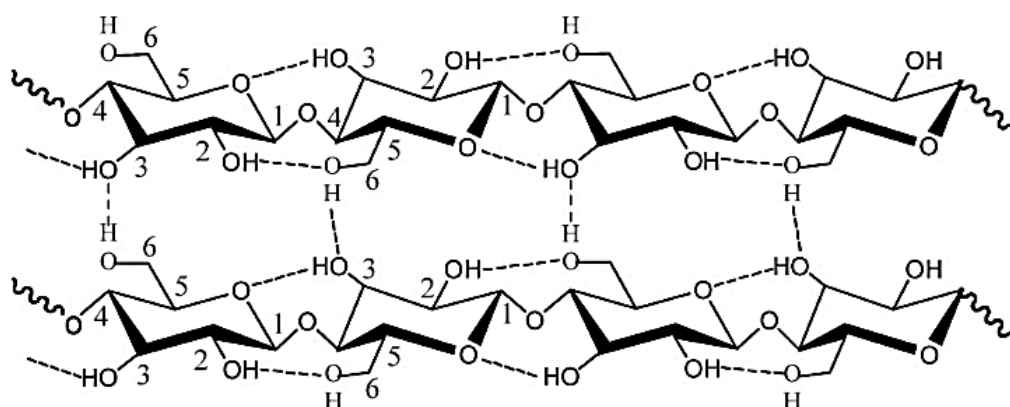
### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Celulose

A celulose ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub> é a macromolécula com maior abundância na natureza. Estruturalmente, apresenta uma cadeia não ramificada constituída por uma sequência de unidades de glicose associadas por ligações glicosídicas β- (1→4), com grau de polimerização variando de 13.000 a 14.000 (celulose vegetal) e de 2000 a 6000 (celulose bacteriana) (SIQUEIRA, BRAS & DUFRESNE, 2010; SAMIR, ALLOIN & DUFRESNE, 2005; PECORARO *et al.*, 2008).

As cadeias lineares de celulose (microfibrilas) estão unidas por ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, que são responsáveis pela formação das fibras celulósicas e pela sua resistência mecânica, respectivamente (figura 1) (ABDULKHALIL, BHAT & IREANAYUSRA, 2012; DONINI *et al.*, 2010).

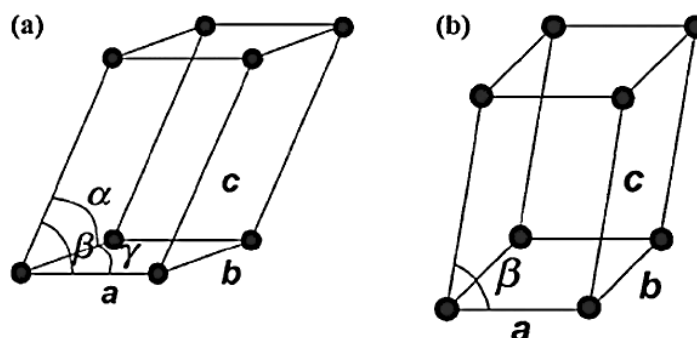
Figura 1 – Estrutura da celulose.



Fonte: Xu, Wang & Wang (2009).

As fibras celulósicas apresentam regiões cristalinas e amorfas. Das várias formas polimórficas que a celulose apresenta, as mais estudadas são a celulose tipo I (celulose nativa) e a celulose tipo II. A celulose I, forma disponível na natureza, consiste na mistura de duas fases cristalinas, uma monoclinica (celulose I<sub>β</sub>) produzida principalmente por bactérias e algas, e outra triclinica (celulose I<sub>α</sub>) presente abundantemente na parede celular de plantas. (KLEMM *et al.*, 2005; LAVOINE *et al.*, 2012) As duas estruturas cristalinas da celulose I estão ilustradas na figura 2.

Figura 2 – Estruturas cristalinas da celulose I, (a) triclnica e (b) monoclnica.

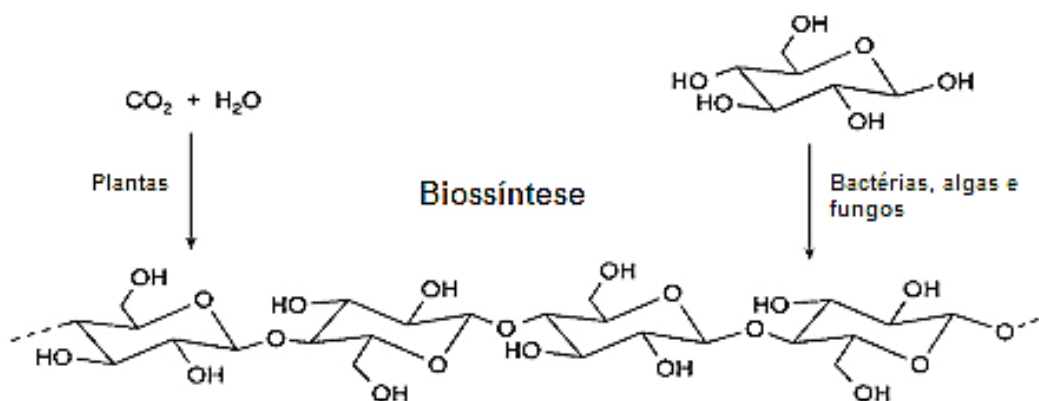


Adaptado: Silva & D' Almeida (2009).

Ao submeter a celulose I a um tratamento qumico ou trmico obtm-se a celulose II e os outros tipos de polimorfos (III e IV) (KLEMM *et al.*, 2005; LAVOINE *et al.*, 2012). A celulose II, sendo constituída de cadeias antiparalelas, raramente pode ser encontrada na natureza, e esta é termodinamicamente mais estvel que a nativa, que apresenta cadeias paralelas (KHALIL, BHAT & YUSRA, 2012; BESSEUILLE & BULONE, 2008).

A parede celular das plantas é composta principalmente de celulose, que se encontra ligada tanto quimicamente quanto fisicamente com lignina, pectina e hemicelulose (UMMARTYOTIN & MANUSPIYA, 2015). A celulose não é encontrada apenas nas plantas, outros seres vivos como algumas espécies de bactrias, fungos e algas também são capazes de produzi-la (FANG, CATCHMARK, 2015; MAEHARA, *et al.*, 2013; MIHRANYAN, 2010). Na figura 3, estão apresentadas duas vias de biossntese da celulose.

Figura 3 – Vias naturais de obtenção da celulose.



Adaptado: Klemm *et al.* (2005).

A síntese de celulose em qualquer organismo produtor segue duas etapas principais, que são: (1) formação das ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) com a polimerização das unidades de glicose, e (2) a formação e cristalização da cadeia de celulose (CHAWLA, *et al*, 2008)

Estima-se que a produção mundial de celulose vegetal aproxime-se de 180 bilhões de toneladas por ano, enquanto que a nacional é de cerca de 15,1 milhões de toneladas por ano (MESQUITA, 2012; BRACELPA, 2014).

### 3.2 Celulose bacteriana

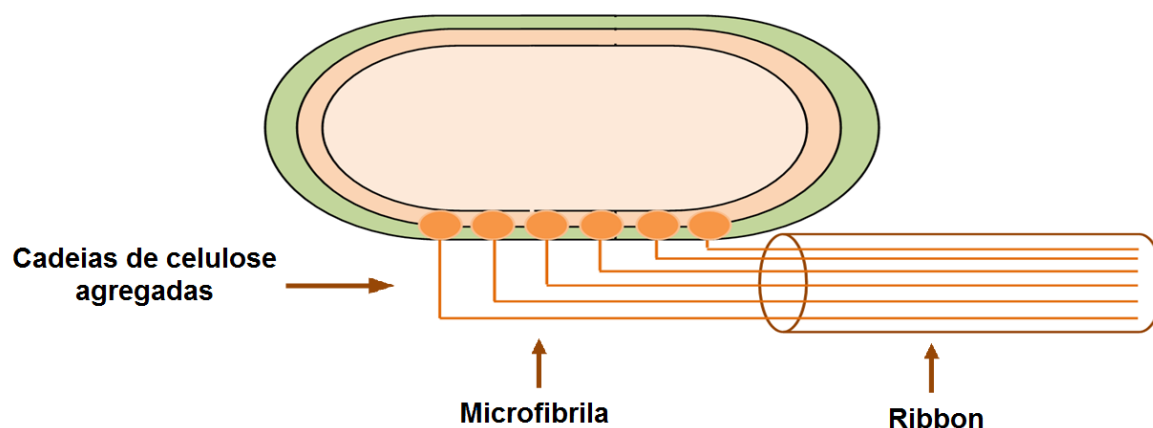
Durante os processos metabólicos, bactérias dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Salmonella* e *Escherichia* produzem celulose (SHODA & SUGANO, 2005; HUANG *et al.*, 2014).

A produção de celulose bacteriana foi relatada pela primeira vez, em 1886, quando Brown observou a formação de uma película gelatinosa (na época conhecida com “Mãe do vinagre”) na superfície do caldo de fermentação do vinagre. Após alguns estudos, Brown identificou a cepa produtora de CB como *Acetobacter xylinum* (BROWN, 1886).

Durante a síntese da celulose bacteriana as unidades de glicose são polimerizadas em cadeias lineares por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), entre a membrana externa e a membrana citoplasmática. Em seguida, as cadeias lineares são secretadas para fora da célula através dos poros existentes na membrana plasmática e então agregadas por ligações de hidrogênio formando as nanofibras (ribbons). Portanto, a celulose bacteriana pode ser descrita como um exopolissacarídeo (CZAJA, *et al*, 2006; DONINI, I. A. N., *et al.*, 2010; ROSS, MAYER & BENZIMAN, 1991). A figura 4 ilustra a formação da celulose bacteriana.



Figura 4 – Representação da formação da celulose bacteriana.



Adaptado: O próprio autor.

O mecanismo de formação de celulose é realizado pelas bactérias objetivando um maior acesso ao oxigênio (favorecendo ao crescimento celular), uma proteção contra a radiação ultravioleta e outros microrganismos e bem como uma redução da desidratação do meio de cultivo (GONÇALVES, 2007).

A celulose sintetizada por bactérias apresenta estrutura semelhante à celulose vegetal, porém possui propriedades físicas e químicas bastante singulares. As fibras da celulose bacteriana têm dimensões nanométricas enquanto as fibras de origem vegetal são micrométricas. Outras características atribuídas a CB são: alta pureza (livre de lignina, pectina e hemicelulose), alta cristalinidade, excelente biodegradabilidade e biocompatibilidade, elevada capacidade de absorção de água, alta resistência mecânica, entre outras. (SHODA & SUGANO, 2005; DONINI *et al.*, 2010).

### 3.3 Aplicações da celulose bacteriana

A celulose bacteriana pode ser aplicada em diversos campos, como biomédico, alimentício, tecnológico, entre outros (TIBONI, GRZYBOWSKI & FONTANA, 2014; RAJWADE, PAKNIKAR & KUMBHAR, 2015; ESA, TASIRIN & RAHMAN, 2014).

Por ser biocompatível e não tóxica a celulose bacteriana é bastante estudada para aplicação na área biomédica. Em estudos realizados por Fu *et al.*,

(2012) e Solway *et al.* (2010), a CB aplicada como curativo demonstrou ser eficiente na regeneração de tecidos com queimaduras e úlceras. No Brasil, as empresas Bionext® e Membracel® já produzem tecidos biológicos à base de celulose bacteriana com a principal função de substituir temporariamente a pele de pacientes que apresentam feridas, queimaduras e úlceras.

Na engenharia de tecidos a CB também pode ser utilizada no desenvolvimento de vasos sanguíneos artificiais (KLEMM *et al.*, 2005), material de assepsia no tratamento de canal dentário (YOSHINO *et al.*, 2013), entre outros. Além disso, membranas de CB veem sendo testadas como sistemas de liberação de fármacos, como drogas anestésicas (TROVATTI *et al.*, 2011), antibióticos (STOICAGUZUN *et al.*, 2007) e analgésicos (SILVA *et al.*, 2014).

Na indústria de alimentos, a CB tem vasta aplicabilidade devido a sua alta pureza, textura e variedade de formatos. Dentre as muitas aplicações a celulose bacteriana pode ser utilizada como espessante e gelificante (SHI *et al.*, 2014). Produtos como a “Nata de coco” (figura 5), originado nas Filipinas, já são comercializados pelo mundo como sobremesa e sua produção ocorre a partir da fermentação da água de coco por *G. hansenii* (PHISALAPHONG *et al.*, 2012).

Figura 5 – “Nata de coco”.



Adaptado: Coconut (2015); Nata de coco (2015).

A CB tem sido associada a polímeros condutores e com isso aplicada em baterias recarregáveis, dispositivos eletrônicos, sensores químicos, térmicos e mecânicos, entre outros (PECORARO, 2008).

A celulose bacteriana também tem sido utilizada no desenvolvimento de compósitos que são materiais que possuem propriedades mecânicas e térmicas melhores que materiais comuns. Dentre os materiais adicionados a CB, para formação dos compósitos, estão: plaquetas de grafite com a função de condutor elétrico (ZHOU *et al.*, 2013), hidroxiapatita aplicado na engenharia óssea (TAZI *et al.*, 2012), nanopartículas de prata com a aplicação em curativos antimicrobianos (WU *et al.*, 2014).

### **3.4 Síntese de CB por *Gluconacetobacter hansenii* e condições de cultivo**

Dentre as bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, as cepas de *Gluconacetobacter hansenii* realizam a fermentação incompleta de vários açúcares e álcoois, destacando-se como bactérias modelos em estudos de síntese de CB (DONINI, I. A. N., *et al.*, 2010; PACHECO, *et al.*, 2004). Estes organismos são bacilos gram-negativos, estritamente aeróbios, não patogênicos e geralmente são encontrados em frutas e vegetais em estado de decomposição, em bebidas alcoólicas e no vinagre. (KLEMM *et al.*, 2001; PECORARO *et al.*, 2008).

A maioria das bactérias têm um pH ótimo de crescimento próximo a neutralidade. Porém as bactérias *G. hansenii* são tolerantes às condições ácidas, podendo crescer em pH menor que 5. A faixa de temperatura ótima de crescimento dessas bactérias encontra-se entre 15 e 34°C e a de morte entre 65 e 75°C (VIEIRA, 2013; KLEMM *et al.*, 2001). Na literatura, encontra-se em muitos dos estudos de produção de celulose por bactérias do gênero *Gluconacetobacter* uma faixa de 28 a 30°C, como temperatura ótima para a fermentação (MOHAMMADKAZEMI, AZIN & ASHORI, 2015; HAMEED, HAMEED & JASIM, 2012).

A celulose bacteriana pode ser obtida sob duas condições de cultivo: estática e agitada. No cultivo em meio agitado, a celulose é produzida na forma de pellets e geralmente este método é escolhido quando se tem como objetivo avaliar a produção em nível de reatores. E através dele se obtém uma maior quantidade de massa de celulose. Em condições estáticas uma película forma-se na superfície do meio de cultura e sua espessura e massa pode variar devido a diversos fatores,

como composição do meio, pH, temperatura e período de incubação (CHAWLA *et al.*, 2009). Vários estudos são realizados variando estes fatores a fim de encontrar as condições de cultivo ideais para uma produção máxima ou obtenção de películas adequadas para aplicações específicas (MOHAMMADKAZEMI, AZIN & ASHORI, 2015; ÇOBAN & BIYIK, 2011).

Os meios de cultivo sintéticos apresentam em sua composição, fontes de carbono, nitrogênio e fósforo em concentrações adequadas para o crescimento dos microrganismos em estudo. O meio HS é normalmente utilizado como padrão sintético em estudos da produção de CB, tendo em sua composição glicose, ácido cítrico, peptona, extrato de levedura, e fosfato de sódio (HESTRIN & SCHRAMM, 1957). Em diversos outros meios sintéticos que podem incluir modificações do meio HS, a glicose é o açúcar preferencialmente escolhido como fonte de carbono, pois além de ser a fonte energética principal para o desenvolvimento do microrganismo, ela é utilizada pela bactéria na síntese da cadeia polimérica de celulose (ROSS *et al.*, 1991; CASTRO *et al.*, 2012).

Alguns trabalhos modificaram a composição do meio HS, utilizando diferentes fontes de carbono, a fim de avaliar mudanças no rendimento da produção de CB. Mikkelsen *et al.* (2009) ao estudarem a influência do manitol, glicose, glicerol, frutose, sacarose e galactose na produção de CB por *G. xylinus*, observaram um maior rendimento ao utilizar sacarose e glicerol (3,83 e 3,75 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente) após fermentação de 96h. Porém, a glicose, o manitol e a frutose também apresentaram uma produção considerável, com rendimento menor que 2,5 g.L<sup>-1</sup> no mesmo período de fermentação.

### **3.5 Fontes alternativas para produção de celulose bacteriana**

A glicose e os outros nutrientes que compõe o meio de cultivo para a síntese de CB apresentam um alto custo na sua forma pura, devido a isto a produção da celulose bacteriana em escala industrial é limitada. Uma alternativa para superar essa limitação é o desenvolvimento de meios de cultura com fontes de carbono e nutrientes de baixo custo e que apresentem uma produção similar ou superior aos meios sintéticos.

O Brasil destaca-se na produção agrícola por possuir uma extensa área territorial, com clima e solo favoráveis para o plantio. Na atividade agrícola é gerada uma grande quantidade de biomassa que é potencial poluente ao ser descartada de forma incorreta no meio ambiente. Uma possibilidade para reduzir o descarte e agregar valor a essa biomassa perdida é a utilização destas como fontes de carbono em processos fermentativos, já que são ricas em açúcares (sacarose, glicose e frutose) e nutrientes (nitrogênio e vitaminas).

Muitas fontes agroindustriais já foram estudadas como meios de cultivo alternativos para a produção de celulose bacteriana. Dentre eles estão: sucos de frutas, como abacaxi, maçã, laranja, pêra e uva japonesa (KUROSUMI *et al.*, 2009), água de coco (ALMEIDA *et al.*, 2008), resíduos de levedura de cerveja (LIN, *et al.*, 2014), melaço de beterraba (KESHK *et al.*, 2006), líquido do sisal (LIMA, 2014), extrato de algaroba (NASCIMENTO, 2014), entre outros.

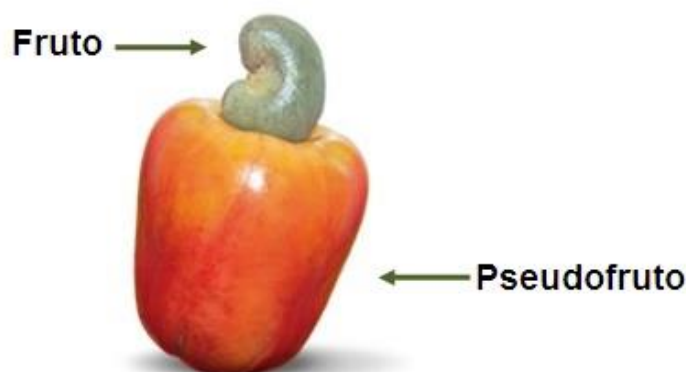
Estudos são realizados suplementando meios alternativos puros com fontes de nitrogênio e fósforo para avaliar a melhoria da produção de CB. Carreira, *et al.* (2011) avaliaram a produção de celulose bacteriana em resíduos da indústria agro-florestal (extrato aquoso de casca de uva, soro de queijo, glicerol bruto e licor de polpação de sulfito) puros e com suplementação (fontes de nitrogênio e fósforo). Com a suplementação observou-se um aumento considerável da produção de CB nos meios de licor de polpação de sulfito, extrato aquoso de casca de uva e glicerol bruto quando comparado com os resultados obtidos sem suplementação. E para o meio de soro de queijo não houve aumento significativo.

### **3.6 Suco de caju**

A cajucultura está concentrada no Nordeste do Brasil e é de grande importância econômica para a região. Com uma área total plantada de 733.918 hectares, o Brasil apresenta uma produção de 276.399 toneladas de castanha-de-caju, com rendimento médio de 377 Kg/hectare. (IBGE, 2013) Sendo que 1Kg de castanha-de-caju corresponde a 9Kg de pedúnculo produzido. O maior produtor de caju do Brasil é o Ceará que possui uma área total plantada de 413.663 hectares e detém 52% da produção nacional, seguido do Piauí e do Rio Grande do Norte (IBGE, 2012).

O caju é constituído da castanha (o verdadeiro fruto) e de um pedúnculo (o pseudofruto), como mostra a figura 6. A castanha, que representa apenas 10% do peso total do caju, fornece a amêndoa, o produto de maior importância comercial, e o LCC (Líquido da Castanha do Caju). O pedúnculo, parte do caju que pode ser consumida *in natura*, é rico em açúcares, cálcio, fósforo, ferro, vitamina C e taninos, e é utilizado na produção de uma grande variedade de produtos alimentares, como sucos (principal produto), néctares, cajuína, doces, geleias, entre outros.

Figura 6 – Fruto com pseudofruto.



Adaptado: Caju (2015).

A indústria interessa-se principalmente pelo beneficiamento da castanha, com isso o aproveitamento do pedúnculo é realizado em escala reduzida. Grande parte da matéria-prima disponível é perdida, cerca de 90%, e isso se deve ao fato de o pedúnculo possuir uma casca muito fina, o que dificulta o seu manuseio e transporte (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2004, FONTES, *et al.*, 2013).

Devido ao grande desperdício do pedúnculo do caju e ao seu alto valor nutricional, o suco do caju pode ser utilizado como fonte de carbono e nutrientes em processos fermentativos (HONORATO & RODRIGUES, 2010, FONTES *et al.*, 2009). Essa alternativa reduz o custo do processo e ainda agrega valor ao suco de caju.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Caracterização do suco de caju**

O suco de caju foi obtido a partir da prensagem do pedúnculo do caju coletado no campo experimental de Pacajus da Embrapa Agroindústria Tropical.

Caracterizou-se o suco quanto os teores de açúcares redutores e totais, nitrogênio total, ácido cítrico e pH.

#### **4.1.1 Açúcares redutores e totais**

Os açúcares totais (glicose, frutose e sacarose) foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com coluna Varian PL Hi-Plex Ca 8 um (300 × 7.7 mm) mantida a 60° e detector de índice de refração Varian 355 RI Pro Star. O teor de açúcares redutores (glicose e frutose) foi determinado pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959).

#### **4.1.2 Nitrogênio Total, ácido cítrico e pH**

O teor de nitrogênio total na amostra de suco de caju foi determinado em Analisador de Carbono Orgânico Total Elementar (Shimadzu, modelo TOC – V CPN), utilizando o oxigênio como gás de arraste a uma velocidade de 150 mL/min.

O teor de ácido cítrico foi estimado por acidez total titulável segundo os procedimentos e determinações gerais do Instituto Adolf Lutz (LUTZ, 2008).

O pH foi verificado diretamente em pHmetro digital, previamente calibrado.

## 4.2 Avaliação do efeito da suplementação do suco de caju na produção de celulose bacteriana

### 4.2.1 Meios de cultivo

A produção de CB foi avaliada em diferentes meios de cultivo descritos na tabela 1. Os meios foram formulados após a etapa de caracterização do suco de caju.

Todos os meios foram ajustados para concentração de açúcares de 20 g/L e pH igual a 5, exceto o meio composto apenas com suco de caju puro (SCP) no qual o processo foi conduzido sem alteração da concentração e do pH do suco.

Os meios foram sequencialmente suplementados, com extrato de levedura, peptona, ácido cítrico e fosfato de sódio, a fim de se aproximarem do meio padrão HS com composição descrita por Hestrin & Schramm (1954). Sendo o SC1 um meio composto apenas com suco diluído e o SC4 com composição química mais próxima do meio padrão.

Nos meios SC2 a SC4 adicionou-se apenas a quantidade de ácido cítrico necessário para atingir os valores contidos no meio HS, pois o suco é fonte de alguns dos nutrientes.

Tabela 1- Composição nutricional dos diferentes meios: SCP, SC1, SC2, SC3 e SC4.

Meios	Açúcares (g.L <sup>-1</sup> )	Extrato de levedura (g.L <sup>-1</sup> )	Peptona (g.L <sup>-1</sup> )	Ácido cítrico (g.L <sup>-1</sup> )	Fosfato de sódio (g.L <sup>-1</sup> )
SCP	103,5*	-	-	2,6*	-
SC1	20,0**	-	-	0,5**	-
SC2	20,0**	5,0	5,0	0,5**	-
SC3	20,0**	5,0	5,0	1,5	-
SC4	20,0**	5,0	5,0	1,5	2,7
HS	20,0	5,0	5,0	1,5	2,7

\* Teores naturalmente oriundos do suco de caju.

\*\* Teores naturalmente oriundos do suco de caju diluído.



#### 4.2.2 *Microrganismo, inóculo e condições de cultivo*

No presente trabalho utilizou-se a linhagem de *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 53582. O microrganismo foi ativado em caldo manitol (composição: 5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 3 g.L<sup>-1</sup> de peptona e 2,5 g.L<sup>-1</sup> de D-manitol) e incubado a 30°C por 48 horas em B.O.D. Para o preparo do inóculo adicionou-se 3% (v/v) da cultura em meio HS esterilizado e incubou-se a 30°C por 72 horas.

Para a avaliação da produção de CB nos diferentes meios, utilizou-se 3% (v/v) de inóculo, e a linhagem foi incubada a 30°C (B.O.D) por 10 dias sob cultivo estático em frascos Schott (250 mL) e 70 mL de meio.

#### 4.3 *Purificação das películas de CB e análise dos extratos fermentados*

Após o processo fermentativo as películas foram removidas da superfície do meio e purificadas com tratamento alcalino, baseado em GEA *et al.*, 2011 e GEORGE *et al.*, 2008. Após serem lavadas com água corrente, as películas foram imersas em solução de NaOH 4% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% (v/v) por uma hora, a 80 °C. O volume de NaOH utilizado foi na proporção de 100 mL de solução para cada película. Por fim, as películas foram lavadas com água até alcançarem a neutralidade.

Os meios líquidos remanescentes do processo (meios fermentados) foram filtrados em membrana de 0,22 µm e submetidos à análise de açúcares pelo método de DNS (MILLER, 1959) e verificou-se o pH.

#### 4.4 *Produção (g.L<sup>-1</sup>)*

A produção de celulose P (g/L) foi determinada utilizando a equação 1:

$$P \text{ (g/L)} = (m_s / V) * 1000 \quad (1)$$

Onde  $m_s$  é a massa seca de celulose produzida, V o volume reacional (70 mL).

A massa de celulose ( $m_s$ ) foi determinada através da secagem e pesagem da película em balança de infravermelho a uma temperatura de 170 °C.

## 4.5 Caracterizações das películas de CB

### 4.5.1 Espessura

A espessura de cada película foi medida em micrômetro digital.

### 4.5.2 Umidade ( $U$ (%)) e Capacidade de Absorção de Água (CAA%)

A umidade das películas foi determinada pela equação 2:

$$U_1(\%) = [(m_U - m_S)/m_U] \times 100 \quad (2)$$

Onde  $m_U$  é a massa úmida de celulose e  $m_S$  a massa seca produzida.

Para a determinação da capacidade de absorção de água as películas liofilizadas foram imersas em água destilada. Em períodos de tempo pesaram-se as películas, em balança analítica, até que a massa se tornasse constante. Antes de cada pesagem o excesso de água de cada película era removido (SAIBUATONG & PHISALAPHONG, 2010). A CAA (%) foi determinada a partir da equação 3 a seguir:

$$CAA(\%) = [(m_{UR} - m_{SL})/m_{SL}] \times 100 \quad (3)$$

Onde  $m_{UR}$  é a massa da película úmida reidratada nos diferentes tempos e  $m_{SL}$  é a massa da película seca liofilizada.

Determinou-se também a umidade da película de CB após a reidratação (ocorrida no teste de absorção) de acordo com a equação 4:

$$U_2(\%) = [(m_{UR} - m_{SL})/m_{UR}] \times 100 \quad (4)$$

Onde  $m_{UR}$  é a massa da película úmida que foi reidratada por 24 horas no teste de absorção e  $m_{SL}$  é a massa da película seca liofilizada.

#### **4.5.3 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

As películas secas de CB foram caracterizadas por FTIR utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), em um espectrofotômetro Agilent, modelo Cary 660, na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 25 varreduras.

#### **4.5.4 Difração de Raios-X (DRX)**

Os difratogramas de raio X foram obtidos em difratômetro modelo DMAXB – Rigaku com tubo de Cu. O intervalo angular (em  $2\theta$ ) utilizado foi de  $3^\circ$  a  $50^\circ$  com uma velocidade de varredura de  $0,5^\circ/\text{min}$ .

O índice de cristalinidade foi determinado através de um método empírico usando a equação abaixo (Segal *et al.*, 1959):

$$\text{IC} = [(I_{002} - I_{\text{am}}) / I_{002}] \times 100 \quad (5)$$

Onde:  $I_{002}$  é a intensidade máxima do pico de difração para o plano 002 (celulose tipo I), localizada no ângulo de  $2\theta \sim 22^\circ$  e  $I_{\text{am}}$  é a intensidade da parte amorfa da amostra, localizada no ângulo de difração de  $2\theta \sim 18,0^\circ$ .

#### **4.5.5 Análise Termogravimétrica (TGA)**

A estabilidade térmica das películas secas de CB foi avaliada por análise termogravimétrica (TGA). A análise de TGA foi realizada em equipamento Shimadzu, modelo TGA-50 a uma taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , intervalo de temperatura entre 0 a  $600^\circ\text{C}$ , em fluxo de 40  $\text{mL}/\text{min}$ . A análise foi conduzida em atmosfera de nitrogênio.

#### **4.5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Para visualizar as amostras em microscópio eletrônico, estas foram fixadas em solução Karnovsky, diluído em solução tampão fosfato 0,2M, pH 7,2, por 24h, acondicionadas em geladeira. A seguir, foram lavadas com 3 trocas de tampão

fosfato, pós-fixadas em tetróxido de ósmio (1%) por 1 hora, lavadas novamente em solução tampão e desidratadas em soluções de etanol de concentração crescente: (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90%), por 15 minutos cada e em solução 100% de álcool, por 3 vezes, de 15 minutos cada.

As amostras foram então, secas em aparelho de secagem ao ponto crítico, montadas em suporte (stubs) e metalizadas com platina. Por fim, foram levadas ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM940A e visualizadas sob uma aceleração de voltagem de 15 KV, com distintos aumentos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização do suco de caju

As características físico-químicas do suco de caju utilizado no presente trabalho estão mostradas na tabela 2.

O suco de caju ao ser analisado por HPLC mostrou composição de 72,0 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 31,8 g.L<sup>-1</sup> de frutose e ausência de sacarose, totalizando 103,9 g.L<sup>-1</sup> de açúcares. Pelo método de DNS a concentração de açúcares redutores (glicose e frutose) foi de 103,5 g.L<sup>-1</sup> podendo ser considerado bastante próximo ao obtido no HPLC. Dessa forma para a análise dos extratos fermentativos o método de DNS foi utilizado para a quantificação de açúcares devido a sua praticidade.

O meio padrão HS apresenta em sua composição 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose, como o suco de caju apresentou uma elevada concentração de açúcares foi necessária a diluição do suco para preparação dos meios SC1 a SC4.

Pinheiro, *et al.* (2006) observaram em sucos integrais de caju valores de pH na faixa de 3,17 a 4,06 e acidez expressa em ácido cítrico 0,45 e 1,26 g/100g.

Tabela 2 – Características físico-químicas do suco de caju.

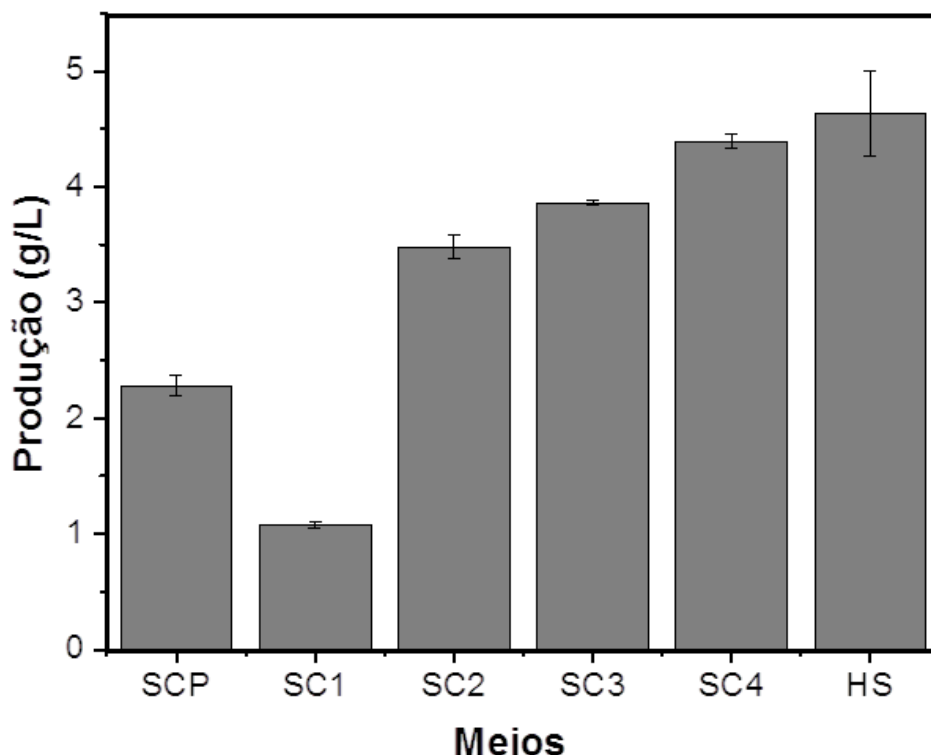
<b>Parâmetros</b>	<b>Suco de caju</b>
<b>Açúcares Redutores (g.L<sup>-1</sup>)</b>	103,5 ± 0,9
<b>Glicose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	72,0 ± 0,1
<b>Sacarose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	0,0 ± 0,1
<b>Frutose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	31,8 ± 0,1
<b>Nitrogênio Total (g.L<sup>-1</sup>)</b>	0,4 ± 0,0
<b>Ácido cítrico (g.L<sup>-1</sup>)</b>	2,5 ± 0,0
<b>pH</b>	3,9 ± 0,4

## 5.2 Produção de CB em diferentes meios de cultivo

A produção de CB é apresentada na figura 7. O meio composto apenas pelo suco de caju puro (SCP) proporcionou uma produção de 2,3 g.L<sup>-1</sup>, correspondente a 52,3% da obtida em meio HS (tabela 2). A menor produção é vista no meio SC1 onde o suco, embora em pH 5, é diluído para a concentração de 20 g.L<sup>-1</sup> de açúcares. Mesmo que tal meio esteja na mesma concentração do meio HS, ocorreu uma diluição dos outros nutrientes (ácido cítrico e nitrogênio) o que prejudicou a produção de CB.

Os meios suplementados (SC2, SC3 e SC4) apresentaram uma produção crescente. Observou-se uma produção máxima de 4,39 g.L<sup>-1</sup> no meio SC4 sendo esta estatisticamente igual a produção em meio sintético HS.

Figura 7 – Produção de celulose bacteriana nos meios SCP, SC1, SC2, SC3, SC4 e HS.



A importância da suplementação pode ser evidenciada no meio SC2 onde há o acréscimo de peptona e extrato de levedura a partir do meio SC1. Houve um aumento no rendimento e um acréscimo de 220% na produção que aumentou de  $1,1 \text{ g.L}^{-1}$  (SC1) para  $3,5 \text{ g.L}^{-1}$  (SC2). Tal fonte de nitrogênio é usualmente utilizada em muitos trabalhos e muitas vezes é essencial para uma produção satisfatória. Carreira, et al., (2011) ao adicionar extrato de levedura em glicerol puro obtiveram uma produção de CB aumentada em aproximadamente 200%. Kurosumi *et al.* (2009) obteve produções inferiores a  $2 \text{ g.L}^{-1}$  ao utilizar sucos de frutas puros (laranja, abacaxi, maçã, pêra japonesa e uva) para produzir CB. Ao suplementar os sucos puros com fonte de nitrogênio obteve-se um aumento da produção atingindo produção de  $5,9 \text{ g.L}^{-1}$ .

No meio SC3 onde há acréscimo de ácido cítrico houve um aumento não significativo na produção de CB quando comparado com o ocorrido meio SC2. Isso pode ser explicado pelo fato de que a quantidade de ácido cítrico naturalmente presente no suco de caju já é suficiente para induzir uma produção satisfatória. O mesmo acontece com a suplementação final com fosfato de sódio no meio SC4 onde induz um pequeno aumento (não significativo) quando comparado com o meio SC3. De qualquer forma quando comparado com o meio SC2 que é menos

suplementado há um aumento de  $0,9 \text{ g.L}^{-1}$  da produção e a adição de fosfato de sódio pode ser considerada importante.

Como visto na tabela 1, o suco de caju puro apresenta elevada concentração de açúcares, baixo teor de nitrogênio e baixo pH. Esses fatores podem ser responsáveis pela produção inferior de CB quando comparada a obtida em meio sintético e nos meios SC2, SC3 e SC4 que estão em pH ideal (5) e contêm nitrogênio orgânico e outros suplementos. Em estudos realizados por Son (2003), a produção de CB foi investigada variando a concentração de glicose (5 a  $50 \text{ g.L}^{-1}$ ) no meio e observou-se um decréscimo da produção a partir da concentração de  $20 \text{ g.L}^{-1}$ . Mesmo assim a produção de CB no suco puro é satisfatória quando comparada com outros trabalhos da literatura que também utilizaram sucos de frutas como fontes de carbono e obtiveram resultados inferiores. Kurosumi, *et al.* (2009) ao avaliar a produção de CB, por *Acetobacter xylinum*, utilizando alguns sucos de frutas sem suplementação como fontes de carbono obteve produções inferiores a  $2 \text{ g.L}^{-1}$ . Portanto o suco de caju puro tem grande potencial para ser utilizado como meio de cultivo na produção de celulose bacteriana.

Tabela 3 – Dados obtidos do processo de produção de CB nos diferentes meios, por *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 53582.

Películas	Açúcares consumidos (g/L)	pH final do extrato fermentativo	Rendimento (%)	Produção (g/L)
SCP	$35,5^d \pm 0,7$	$3,1^b \pm 0,1$	$6,4^b \pm 0,4$	$2,3^e \pm 0,1$
SC1	$5,3^b \pm 0,2$	$3,6^c \pm 0,2$	$20,3^c \pm 1,0$	$1,1^d \pm 0,0$
SC2	$9,6^c \pm 0,3$	$5,2^e \pm 0,1$	$36,3^a \pm 1,8$	$3,5^a \pm 0,2$
SC3	$12,2^a \pm 0,4$	$5,8^a \pm 0,1$	$31,7^a \pm 0,3$	$3,9^{ab} \pm 0,0$
SC4	$12,1^a \pm 0,2$	$5,6^a \pm 0,0$	$36,31^a \pm 0,3$	$4,4^{bc} \pm 0,1$
HS	$12,8^a \pm 0,6$	$4,2^d \pm 0,1$	$36,1^a \pm 5,0$	$4,6^c \pm 0,6$

Letras iguais na coluna não apresentam diferenças significativas ( $\alpha=0,05$ ).

Uma análise econômica do processo de obtenção de um produto de CB para aplicações específicas poderá indicar com maior clareza a necessidade de suplementação do suco, já que a produção aumentou em 91% com a suplementação mais próxima ao meio sintético (de 2,3% (SCP) para 4,4% (SC4)).

Na produção de CB utilizando a glicose como fonte de carbono ocorre a formação de ácidos orgânicos, principalmente o ácido glucorônico, com isso espera-se uma redução do pH do meio. Porém, ao verificar o pH dos extratos fermentados dos meios suplementados observou-se um aumento deste em relação ao pH inicial, enquanto o pH dos outros meios diminuiu como esperado.

### 5.3 Caracterizações das películas de CB

#### 5.3.1 Espessura

As películas produzidas estão apresentadas na figura 8. As espessuras das películas variaram de 2,05 a 8,80 mm e as massas secas, como mostrado na tabela 5, sendo que as películas do meio sintético HS foram as mais espessas. As películas obtidas nos meios suplementados apresentaram espessuras estatisticamente iguais e embora tenham massas próximas às películas do meio HS, as suas espessuras foram menores.

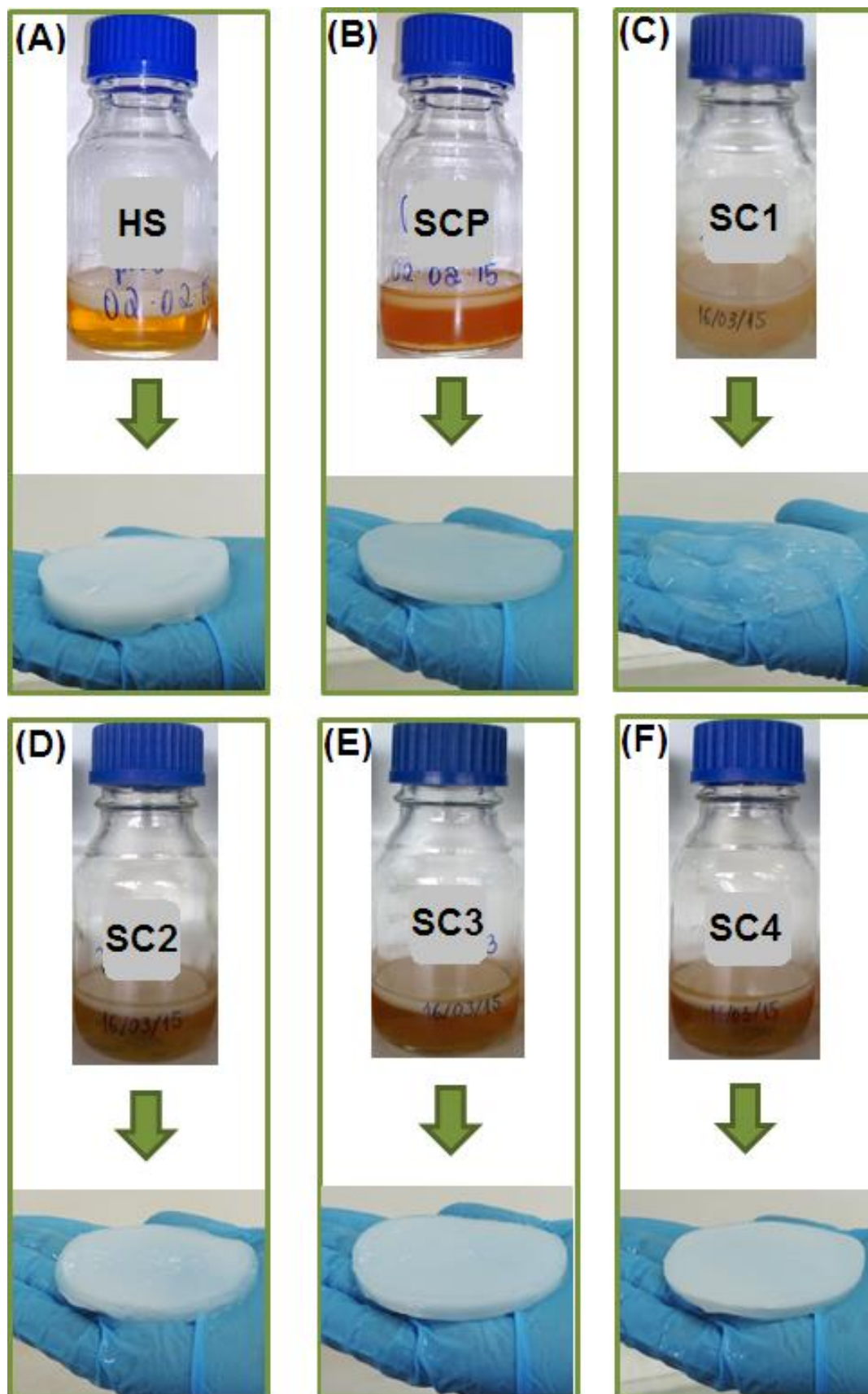
Tabela 5 – Valores de massa seca, espessura e densidade das películas produzidas nos diferentes meios.

<b>Películas</b>	<b>Massa seca (g)</b>	<b>Espessura (mm)</b>
<b>SCP</b>	0,16 <sup>e</sup> ± 0,01	5,48 <sup>c</sup> ± 0,86
<b>SC1</b>	0,07 <sup>d</sup> ± 0,00	2,05 <sup>b</sup> ± 0,24
<b>SC2</b>	0,24 <sup>a</sup> ± 0,01	4,42 <sup>a</sup> ± 0,32
<b>SC3</b>	0,27 <sup>ab</sup> ± 0,00	4,79 <sup>a</sup> ± 0,26
<b>SC4</b>	0,31 <sup>bc</sup> ± 0,01	4,52 <sup>a</sup> ± 0,23
<b>HS</b>	0,32 <sup>c</sup> ± 0,04	8,80 <sup>d</sup> ± 0,72

Letras iguais na coluna não apresentam diferenças significativas ( $\alpha=0,05$ ).



Figura 8 – Imagens das películas de CB (impuras nos meios de cultura e purificadas) produzidas nos meios HS (A), SCP (B), SC1 (C), SC2 (D), SC3 (E) e SC4 (F).



### 5.3.2 Umidade (U%) e Capacidade de Absorção de água (CAA%)

Os valores de umidade das películas variaram de 98,2 a 99,2% (tabela 6) e estão em concordância com a literatura que reporta valores variando de 95 a 99% (PECORARO *et al.*, 2008).

Tabela 6 – Teores de umidade das películas produzidas nos meios SCP, SC1, SC2, SC3, SC4 e HS.

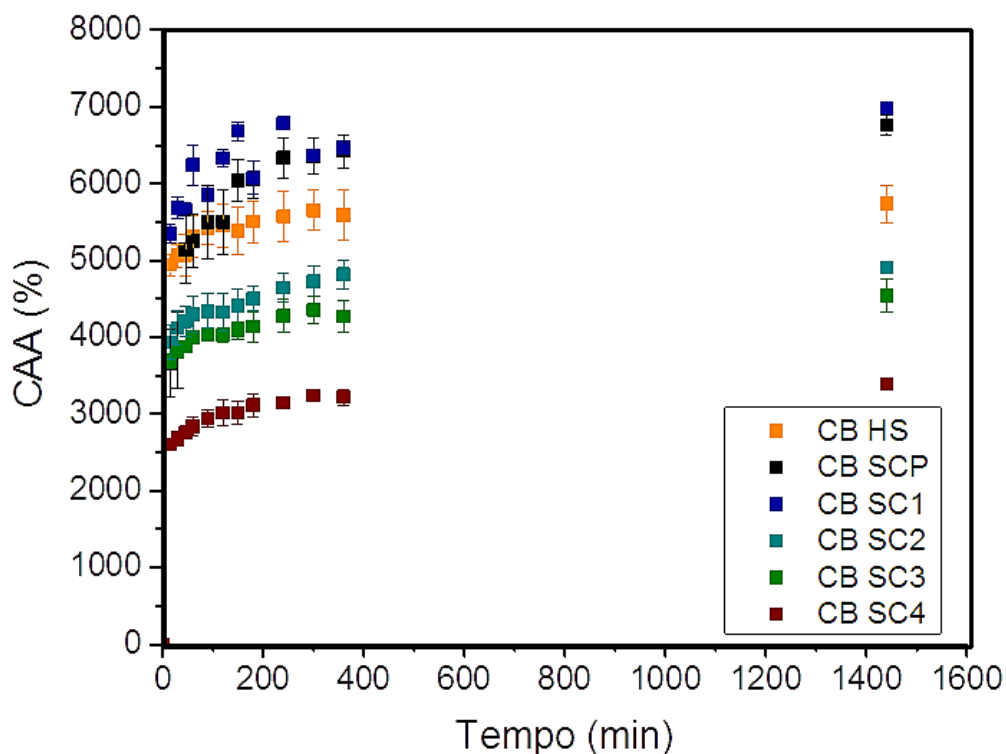
Películas	Absorção máxima (%)	Umidade (%)	Umidade após absorção de água (%)
SCP	6758 <sup>c</sup> ± 222,2	99,1 <sup>b</sup> ± 0,0	98,5 <sup>a</sup> ± 0,0
SC1	6985 <sup>c</sup> ± 66,5	99,2 <sup>b</sup> ± 0,0	98,5 <sup>a</sup> ± 0,1
SC2	4906 <sup>ab</sup> ± 120,2	98,7 <sup>a</sup> ± 0,0	98,0 <sup>bc</sup> ± 0,1
SC3	4544 <sup>a</sup> ± 363,8	98,6 <sup>a</sup> ± 0,0	97,8 <sup>b</sup> ± 0,1
SC4	3390 <sup>d</sup> ± 122,1	98,2 <sup>c</sup> ± 0,0	97,1 <sup>d</sup> ± 0,1
HS	5733 <sup>b</sup> ± 408,6	98,9 <sup>d</sup> ± 0,0	98,3 <sup>ac</sup> ± 0,2

Letras iguais na coluna não apresentam diferenças significativas ( $\alpha=0,05$ ).

Ao avaliar a capacidade de absorção de água das películas de CB produzidas, observou-se um perfil semelhante para todas as películas. A maior absorção ocorre nos primeiros 15 minutos e a partir de 250 minutos a massa das películas começa a ficar constantes.

As películas CB SCP e CB SC1 apresentaram maior capacidade de absorver água aproximando-se de 7000%, como pode ser visto na figura 9. Já as películas produzidas nos meios suplementados apresentaram menor capacidade de absorver água, atingindo percentuais menores que 5000% e a CAA destas foi reduzindo a cada suplementação do meio. Os menores valores de absorção das películas SC2, SC3 e SC4 deve-se ao fato de possuírem uma estrutura compacta em relação às outras películas.

Figura 9 – Cinética de absorção de água das películas de CB SCP, CB SC1, CB SC2, CB SC3, CB SC4 e CB HS.



Ao calcular a umidade das películas após o experimento de CAA observou-se que a umidade não variou em relação à umidade calculada após a etapa de purificação.

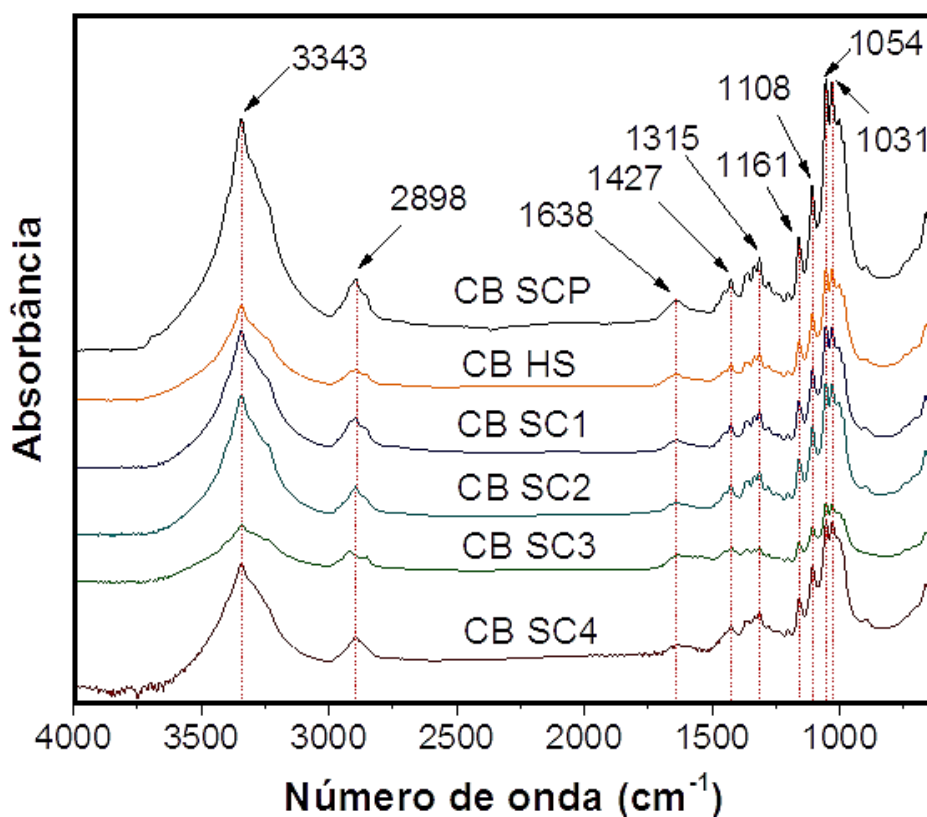
Vieira (2013) produziu membranas de celulose a partir de resíduos de frutas (laranja e mamão), resíduos vegetais (beterraba), folhas de chá verde, vinho e colágeno em condições estáticas. As membranas produzidas apresentaram CAA entre 73 e 2144%, sendo que a membrana produzida em meio de mamão apresentou a maior capacidade de absorção de água.

### 5.3.3 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A celulose bacteriana segundo a literatura apresenta bandas em 3400 e 2900  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas às vibrações de estiramento O-H de álcool e C-H de hidrocarbonetos saturados, respectivamente. Frequências de absorções referentes à vibração de O-H de moléculas de água absorvida são observadas na região de 1635–1645  $\text{cm}^{-1}$ . Apresenta bandas de absorção em 1425–1435  $\text{cm}^{-1}$  devido às deformações de HCH e OCH e em 1146–1160  $\text{cm}^{-1}$  atribuídas ao estiramento C-O-C e deformação de CH. Frequências em 1096  $\text{cm}^{-1}$  correspondente à vibração C-C das unidades glicosídicas da celulose e em 1036  $\text{cm}^{-1}$  referentes às deformações C-O de C-OH de carboidratos também são observadas. (GEA et al., 2011; MARTÍNEZ-SANZ, LOPEZ-RUBIO, LAGARON, 2011).

Os espectros das películas de CB produzidas, mostrados na figura 10, apresentaram bandas características de celulose bacteriana.

Figura 10 – Espectros na região do infravermelho das películas de CB SCP, CB SC1, CB SC2, CB SC3, CB SC4 e CB HS.

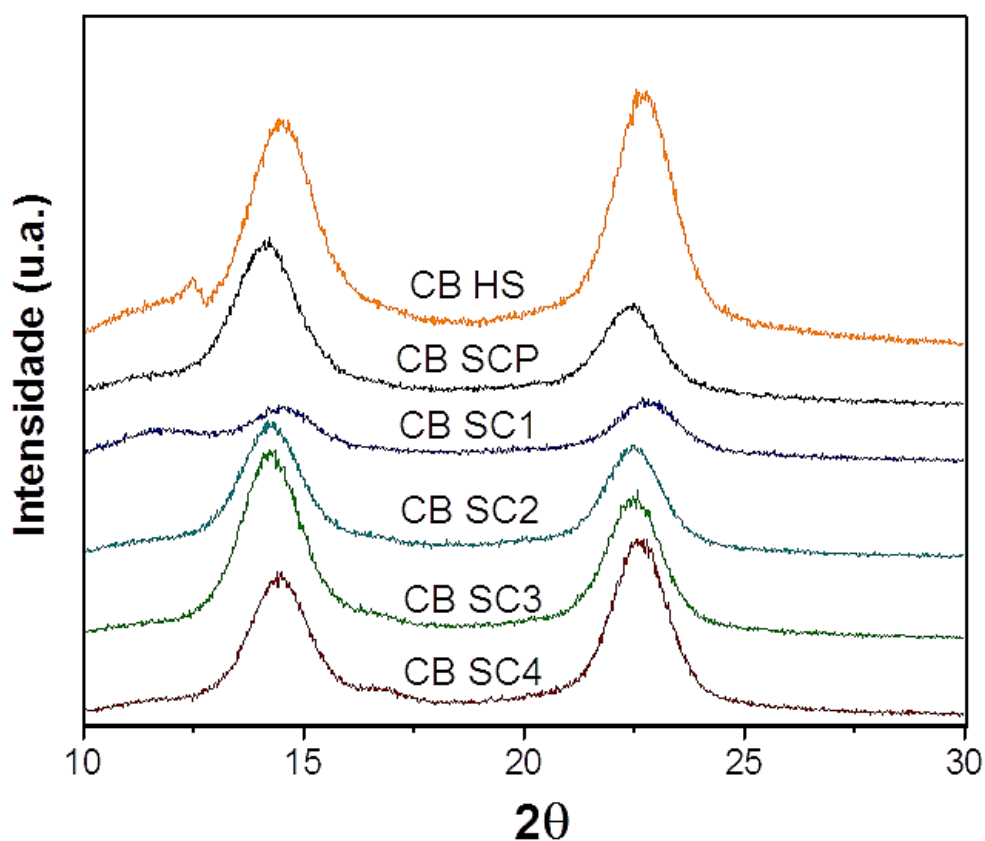


Apenas bandas características de CB estão presentes nos espectros confirmando a eficiência da etapa de purificação das películas. O alto grau de pureza obtido após o tratamento alcalino é característica da CB que é naturalmente livre de lignina, pectina e hemicelulose em sua estrutura.

#### 5.3.4 Difração de Raios-X (DRX)

Os difratogramas das películas produzidas nos diferentes meios, mostrados na figura 11, apresentaram picos de difração mais evidentes em aproximadamente  $14,4^\circ$  e  $22,5^\circ$  que são atribuídos às fases  $I\alpha$  e  $I\beta$  da estrutura cristalina de celulose I (JEON, et al., 2010).

Figura 11 – Difratogramas das películas de CB SCP, CB SC1, CB SC2, CB SC3, CB SC4 e CB HS.



Os índices de cristalinidades para todas as películas foram bem próximos e variaram de 81 a 83% (Tabela 7). Os valores de IC para a celulose bacteriana obtida foram elevados o que a confere alta resistência mecânica, característica importante que a diferencia da celulose de origem vegetal que geralmente apresenta IC menor.

A celulose bacteriana, no geral, apresenta índice de cristalinidade entre 60 e 95%, (TOMÉ, 2008; TROVATTI, 2011). As películas de CB produzidas em todos os meios apresentaram valores dentro da faixa relatada na literatura.

FANG e CATCHMARK (2015) obtiveram celulose bacteriana, produzida por *Gluconacetobacter hansenii*, com índice de cristalinidade de aproximadamente 76%.

Tabela 7 – Índices de Cristalinidade das películas produzidas nos meios HS, SCP, SC1, SC2, SC3 e SC4.

<b>Películas</b>	<b>Índice de Cristalinidade (%)</b>
<b>HS</b>	81,7
<b>SCP</b>	81,0
<b>SC1</b>	82,0
<b>SC2</b>	83,0
<b>SC3</b>	82,0
<b>SC4</b>	82,3

### 5.3.5. Análise Termogravimétrica (TGA)

As curvas termogravimétricas (TGA e DTG) de todas as películas produzidas estão mostradas nas figuras 12 e 13, respectivamente.

Figura 12 – Curvas termogravimétricas de TGA das películas CB HS, CB SCP, CB SC1, CB SC2, CB SC3 e CB SC4.

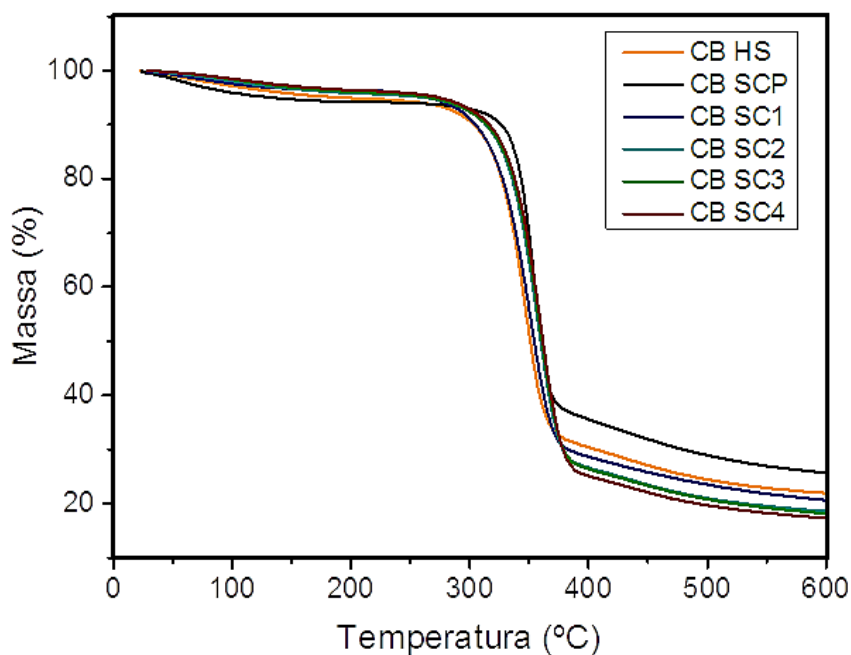
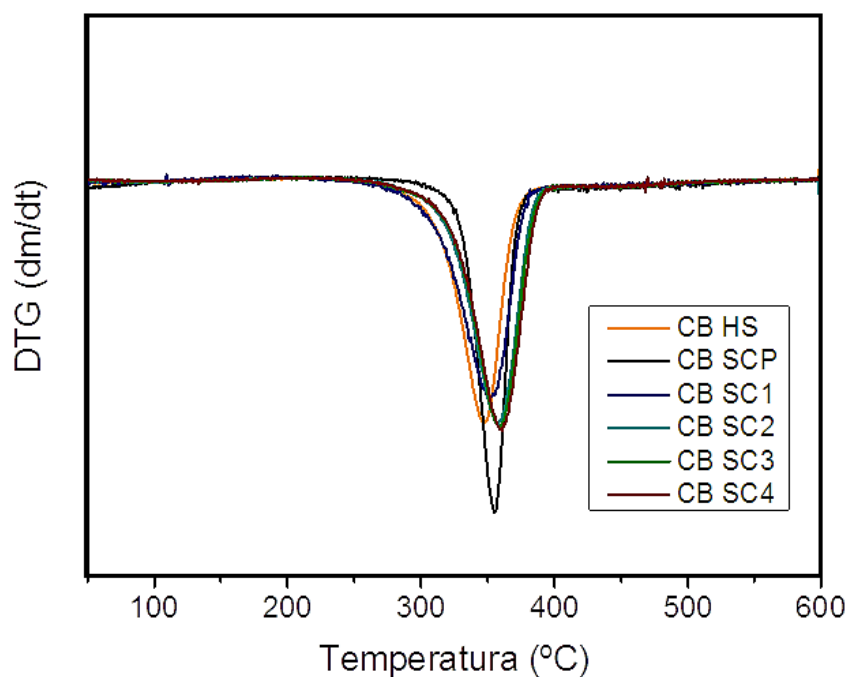


Figura 13 – Curvas termogravimétricas de DTG das películas CB HS, CB SCP e CB SC4.



Através das curvas termogravimétricas, observa-se um acentuado evento de perda de massa, em torno de 355°C, atribuído à degradação da cadeia glicosídica da celulose. Os resultados estão de acordo com a literatura, que relata a ocorrência do evento de degradação no intervalo de 200 – 400°C. O evento referente à perda de água referido na literatura (em torno de 100°C) não foi expressivo para as películas produzidas (VAZQUEZ, *et al* 2013; LIMA, 2014; NASCIMENTO, 2014).

A tabela 8 apresenta os valores de temperaturas e perda de massa das películas no evento de degradação polimérica. Observa-se que a temperatura máxima de degradação e a perda de massa das películas CB SC3 e CB SC4 foram as mais elevadas.

Tabela 8 – Temperaturas e perda de massa, no evento de degradação, obtidas do TGA e DTG das películas CB HS, CB SCP, CB SC1, CB SC2, CB SC3 e CB SC4.

<b>CB</b>	<b>Temperatura Inicial de degradação (°C)</b>	<b>Temperatura máxima de degradação (°C)</b>	<b>Perda de massa (%)</b>
<b>HS</b>	280	347	62
<b>SCP</b>	300	354	56
<b>SC1</b>	280	352	64
<b>SC2</b>	280	357	66
<b>SC3</b>	280	360	70
<b>SC4</b>	280	360	70

Todas as películas se mostraram estáveis a elevadas temperaturas, sendo a película produzida em suco de caju puro a que se mostrou mais estável termicamente, com temperatura inicial de degradação em 300°C e com menor perda de massa (56%).



O fato de as películas analisadas apresentarem apenas eventos característicos de CB confirma a eficiente eliminação de impurezas na etapa de purificação. Na literatura, relata-se o aparecimento de um evento de perda de massa em torno de 158°C para películas impuras, e este é atribuído à degradação de componentes proteicos do meio de cultivo que permaneceram na película.

### 5.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias das películas de CB produzidas estão mostradas na figura 14, 15 e 16.

Figura 14 – Micrografias das películas (A e B) CB SCP 5000x e 10000x, (C e D) CB SC1 5000x e 10000x. (E e F) CB SC2, (G e H) CB SC3, (I e J) CB SC4 e (K e L) CB HS.

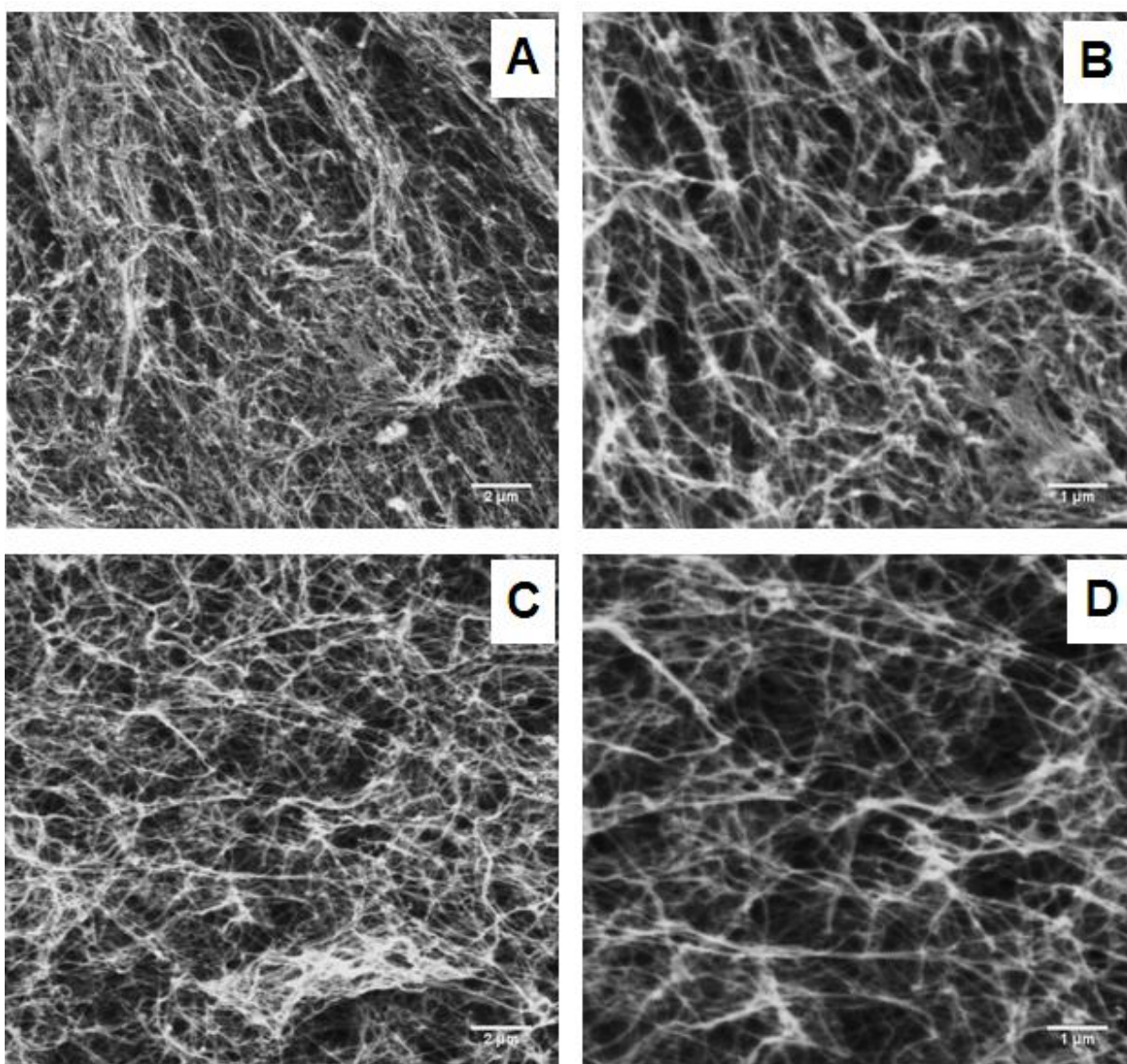


Figura 15 – Micrografias das películas (A e B) CB SC2 5000x e 10000x, (C e D) CB SC3 5000x e 10000x.

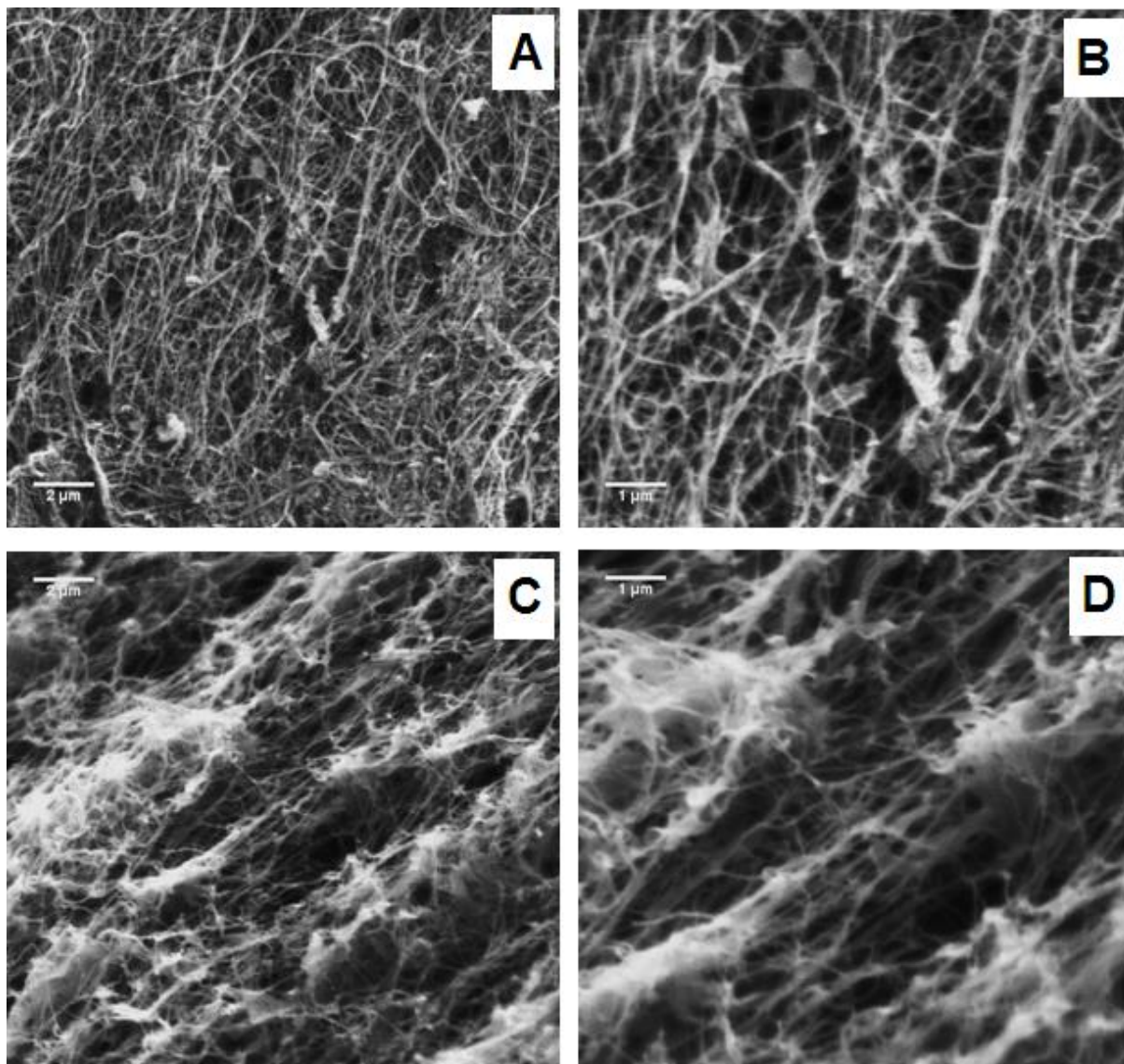
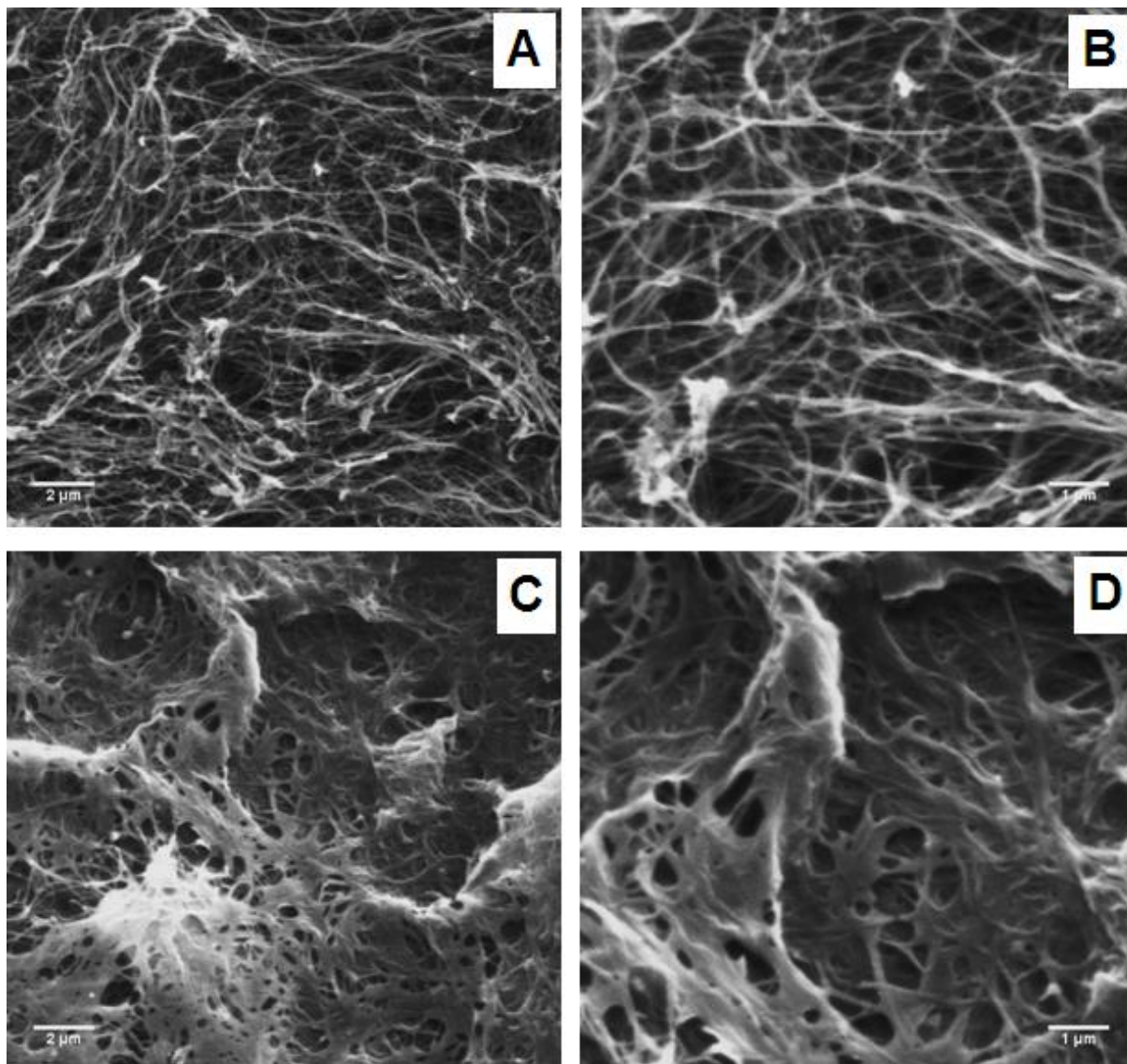




Figura 16 – Micrografias das películas (A e B) CB SC4 5000x e 10000x, (C e D) CB HS 5000x e 10000x.



Em todas as micrografias se observa um emaranhado de fibras nanométricas, dimensão característica de fibras de celulose bacteriana. Ao realizar a medida das dimensões das fibras obtiveram-se valores variando de 69 a 76 nm (tabela 9), que estão de acordo com a literatura. Segundo Pecoraro, *et al.*, (2008) a celulose bacteriana apresenta fibras com dimensões de 70 – 80 nm, enquanto as fibras de celulose vegetal variam de  $1,4 - 4,0 \times 10^{-2}$  mm.

As micrografias mostram estruturas bastante porosas o que justifica a alta capacidade das películas produzidas em absorver água rapidamente.

Tabela 9 – Dimensões das fibras das películas: CB SCP, CB SC1, CB SC2, CB SC3, CB SC4.

<b>Películas de CB</b>	<b>Dimensões (nm)</b>
<b>SCP</b>	$75,0^a \pm 14,0$
<b>SC1</b>	$69,0^a \pm 8,0$
<b>SC2</b>	$76,0^a \pm 8,0$
<b>SC3</b>	$76,0^a \pm 14,0$
<b>SC4</b>	$70,0^a \pm 9,0$

## 6 CONCLUSÕES

Foi possível produzir celulose bacteriana por *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 53582 sob cultivo estático, por um período de incubação de 10 dias utilizando como meio de cultivo o suco de caju puro e com suplementação.

No meio com suco de caju puro, a produção de CB foi inferior à obtida em meio sintético HS. Porém ainda assim a produção foi bastante expressiva quando comparada com resultados da literatura que utilizaram outros sucos de fruta como meio alternativo. Portanto, o suco de caju puro tem grande potencial para ser utilizado como meio de cultivo na produção de celulose bacteriana.

A produção de CB aumentou com a suplementação do meio de cultivo. Obteve-se a maior produção ao suplementar com extrato de levedura, peptona, ácido cítrico e fosfato de sódio, sendo tal produção estatisticamente semelhante à produção obtida em meio sintético padrão.

As películas produzidas apresentaram características típicas de celulose bacteriana, com elevados índices de cristalinidade, fibras com dimensões nanométricas, alta capacidade de absorver água e estabilidade térmica.

## 7 REFERÊNCIAS

ABDUL KHALIL, H. P. S.; BHAT, A. H.; IREANA YUSRA, A. F. Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 963–979, 2012.

AGOSTINI COSTA, T. S.; JALES, K. A.; GARRUTTI, D. S.; PADILHA, V. A.; AGUIAR, M. J.; LIMA, J. B.; PAIVA, J. Teores de ácido anacárdico em pedúnculos de cajueiro *A. microcarpum* e em oito clones de *A. occidentale* disponíveis no Nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, 2004.

ALMEIDA, D. M.; WOSIACKI, G.; JUNIOR, G. S.; MADALAZZO, E. S.; ZANLORENZI, M. M. Crescimento do *Acetobacter xylinum* (ATCC 23769) e a produção de celulose bacteriana. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 2, p. 95-103, 2008.

AZIZI SAMIR, M. A. S.; ALLOIN, F.; DUFRESNE, A. Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 612–626, 2005.

BESSUEILLE, L.; BULONE, V. A survey of cellulose biosynthesis in higher plants. **Plant Biotechnology**, v. 25, p. 315–322, 2008.

BRACELPA. Conjuntura Bracelpa. Disponível em: <<http://bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/conjuntura/CB-064.pdf>>. Acesso em: 21/02/ 2015.

BROWN, A. J., On an acetic ferment which forms cellulose. **Journal of the Chemical Society**, v. 49, p. 432-439, 1886.

CAJU. Disponível em: <<http://www.sindfrutas.com.br/acao/a-producao-de-caju-e-castanha-no-nordeste-pode-ser-menor/>>. Acessado em: 14 mar. 2015.

CARREIRA, P.; MENDES, J. A S.; TROVATTI, E.; et al. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 15, p. 7354–7360, 2011.

CHÁVEZ-PACHECO, J. L.; MARTÍNEZ-YEE, S.; CONTRERAS-ZENTELLA, M.; ESCAMILLA-MARVÁN, E. Celulosa bacteriana em gluconacetobacter xylinum: Biosíntesis y aplicaciones. **Redalyc**, v. 7, p. 18-25, 2004

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

ÇOBAN, E. P. & BIYIK, H. Evaluation of different pH and temperatures for bacterial cellulose production in HS (Hestrin-Scharmm) medium and beet molasses medium. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, p. 1037–1045, 2011.

COCONUT. Disponível em: <<http://ramfoods.com/nata.php>>. Acessado em: 18 mai. 2015.

CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN, R. M. Microbial cellulose - The natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, p. 145–151, 2006.

DONINI, Í. A. N.; SALVI, D. T. B. DE; FUKUMOTO, F. K.; et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Ecletica Quimica**, v. 35, p. 165 – 178, 2010.

ESA, F.; TASIRIN, S. M.; RAHMAN, N. A. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 113–119, 2014. Elsevier Srl.

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

FONTES, C. P. M. L.; HONORATO, T. L.; RABELO, M. C.; RODRIGUES, S. Kinetic study of mannitol production using cashew apple juice as substrate. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, p. 493–499, 2009.

FONTES, C. P. M. L.; SILVEIRA, M. A.; GUILHERME, A. A.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Substitution of yeast extract by ammonium sulfate for mannitol production in cashew apple juice. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 69-75, 2013.

FU, L.; ZHANG, Y.; LI, C.; et al. Skin tissue repair materials from bacterial cellulose by a multilayer fermentation method. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, p. 12349–12357, 2012.

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

GEORGE, J.; SAJEEVKUMAR, V. A.; KUMAR, R.; RAMANA, K. V.; SABAPATHY, S. N.; BAWA, A. S. Enhancement of thermal stability associated with the chemical treatment of bacterial (*Gluconacetobacter xylinus*) cellulose. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 108, p. 1845-1851, 2008.

GONÇALVES, G. A. B. **Síntese e caracterização de nanocompósitos de TiO<sub>2</sub>/cellulose** **Synthesis and characterization of TiO<sub>2</sub>/cellulose Nanocomposites**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais)-Departamento de Química -Universidade de Aveiro, Aveiro, 2007.

HAMEED, N. D.; AL-JAILAWI, M. H.; JASIM, H. M. Enhancement and Optimization of cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* N2. **Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences)**, v. 13, p. 77–89, 2012.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochemical Journal**, v. 58, p. 345-352, 1954.

HONORATO, T.L.; RODRIGUES, S. Dextranucrase stability in cashew apple juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 105–110, 2010.

HUANG, Y.; ZHU, C.; YANG, J.; et al. Recent advances in bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 21, p. 1–30, 2014.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. IAL. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Ial**, , n. 4<sup>a</sup> ed, p. São Paulo, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro, v.25, p.1-88, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro, v.26, p.1-83, 2013.

JEON, J. H.; OH, I. K.; KEE, C. D.; KIM, S. J. Bacterial cellulose actuator with electrically driven bending deformation in hydrated condition. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 146, p. 307–313, 2010.

KESHK, S. M. A. S., SAMEISHIMA, K. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. **African Journal of Biotechnology**, v.4, p. 478–482, 2005.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.-P.; BOHN, A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 44, p. 3358–93, 2005.

KUROSUMI, A.; SASAKI, C.; YAMASHITA, Y.; NAKAMURA, Y. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 333–335, 2009. Elsevier Ltd.

LAVOINE, N.; DESLOGES, I.; DUFRESNE, A.; BRAS, J. Microfibrillated cellulose - Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 735–764, 2012. Elsevier Ltd.

LIMA, H. L. S. Avaliação do potencial do líquido de sisal e do suco de caju para a produção de celulose bacteriana. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

LIN, D.; LOPEZ-SANCHEZ, P.; LI, R.; LI, Z. Bioresource Technology Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste



beer yeast as nutrient source. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 113–119, 2014. Elsevier Ltd.

MAEHARA, T.; ICHINOSE, H.; FURUKAWA, T.; et al. Ethanol production from high cellulose concentration by the basidiomycete fungus *Flammulina velutipes*. **Fungal Biology**, v. 117, p. 220 – 226, 2013.

MARTÍNEZ-SANZ, M.; LOPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. Optimization of the nanofabrication by acid hydrolysis of bacterial cellulose nanowhiskers. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 228–236, 2011.

MESQUITA, J. P. Nanocristais de celulose para preparação de bionanocompósitos com quitosana e carbonos nanoestruturados para aplicações tecnológicas e ambientais. Tese (Doutorado em Ciências-Química) - Instituto de Ciências Exatas - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

MIHRANYAN, A. Cellulose from cladophorales green algae: From environmental problem to high-tech composite materials. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 119, p. 2449–2460, 2011.

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

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

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

MOVASAGHI, Z., REHMAN, S., REHMAN, I. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, 43, 134–179, 2008.

NASCIMENTO, E. S. Extrato de algaroba como fonte alternativa para produção de celulose bacteriana. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

NATA DE COCO. Disponível em: <<http://www.katrinsfoods.com/nata-de-coco/>>. Acessado em: 18 mai. 2015.

PECORARO E.; MANZANI, D.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO SIDNEY, J.L. Bacterial Cellulose from *Gluconacetobacter xylinus*: Preparation, Properties and Applications. In: LTDA. Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources. **Elsevier**. Mohamed Naceur Belgacem Gandini A. v. Único, 2008.cap. 17, p.560.

PHISALAPHONG, M.; CHIAOPRACOBKIJ, N. **Bacterial NanoCellulose: A Sophisticated Multifunctional Material**. CRC Press, 2012, cap. 7, p. 143-156.

PINHEIRO, A. M.; FERNANDES, A. G.; FAI, A. E. C.; PRADO, G. M.; SOUSA, P. H. M.; MAIA, G. A. Avaliação química, físico-química e microbiológica de sucos de frutas integrais: abacaxi, caju e maracujá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 26, p. 98-103, 2006.

RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M.; KUMBHAR, J. V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, p. 2491–2511, 2015.

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

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

SHI, Z.; ZHANG, Y.; PHILLIPS, G. O.; YANG, G. Utilization of bacterial cellulose in food. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 539–545, 2014. Elsevier Ltd.

SHIBAZAKI, H., KUGA, S.; OKANO, T. Mercerization and acid hydrolysis of bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 4, p. 75–87, 1997.

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

SILVA D. J.; ALMEIDA M. L. O. Nanocristais de celulose. **O Papel**, v.70, p. 34 – 52, 2009.

SILVA, N. H. C. S.; RODRIGUES, A. F.; ALMEIDA, I. F.; et al. Bacterial cellulose membranes as transdermal delivery systems for diclofenac: In vitro dissolution and permeation studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, p. 264–269, 2014.

SIQUEIRA, G.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Cellulosic bionanocomposites: A review of preparation, properties and applications. **Polymers**, v. 2, p. 728–765, 2010.

SOLWAY, D. R.; CLARK, W. A.; LEVINSON, D. J. A parallel open-label trial to evaluate microbial cellulose wound dressing in the treatment of diabetic foot ulcers. **International Wound Journal**, v. 8, p. 69–73, 2011.

SON, H. J.; KIM, H. G.; KIM, K. K.; et al. Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 215–219, 2003.

STOICA-GUZUN, A.; STROESCU, M.; TACHE, F.; ZAHARESCU, T.; GROSU, E. Effect of electron beam irradiation on bacterial cellulose membranes used as transdermal drug delivery systems. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 265, p. 434–438, 2007.

TAZI, N., ZHANG, Z., MESSADDEQ, Y., et al. Hydroxyapatite bioactivated bacterial cellulose promotes osteoblast growth and the formation of bone nodules. **AMB Express**, v. 2, p. 61, 2012.

TIBONI, M.; GRZYBOWSKI, A. 1 . Bacterial cellulose: A peculiar polymer for biotechnological applications. **Research Signpost**, v. 661, p. 1–10, 2014.

TOMÉ, L. S. C. Preparação e avaliação da permeabilidade de substratos de celulose modificados. Dissertação (Materiais derivados de recursos renováveis) - Universidade de Aveiro, Aveiro, 2008.

TROVATTI, E.; SERAFIM, L. S.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. *Gluconacetobacter sacchari*: An efficient bacterial cellulose cell-factory, **Carbohydrate polymer**, v. 86, p. 1417-1420, 2011.

TROVATTI, E.; SILVA, N. H. C. S.; DUARTE, I. F.; et al. Biocellulose membranes as supports for dermal release of lidocaine. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 4162–4168, 2011.

UMMARTYOTIN, S.; MANUSPIYA, H. A critical review on cellulose: From fundamental to an approach on sensor technology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 402–412, 2014.

VIEIRA, D. C. M. Produção de biofilme (membrana de biocelulose) por *Gluconacetobacter xylinus* em meio de resíduos de frutas e folhas de chá verde. 2013. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

YOSHINO, A.; TABUCHI, M.; UO, M.; et al. Applicability of bacterial cellulose as an alternative to paper points in endodontic treatment. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 6116–6122, 2013.

WU, J., ZHENG, Y., SONG, W., et al. In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate polymer**, v. 102, p. 762-771, 2014.

ZHOU, T., CHEN, D., JIU, J. et al. Electrically Conductive Bacterial Cellulose Composite Membranes Produced by the Incorporation of Graphite Nanoplatelets in Pristine Bacterial Cellulose Membranes. **Polymer Letters**, v. 7, p. 756–766. 2013.