



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

JOÃO PEDRO BESSA DE SOUZA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA EM CULTIVO
ESTÁTICO E AGITADO**

FORTALEZA
2019

JOÃO PEDRO BESSA DE SOUZA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA EM CULTIVO
ESTÁTICO E AGITADO

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador didático-pedagógico: Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fechine

Orientadora profissional: Dra. Ana Iraidy Santa Brígida

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S238p Souza, João Pedro Bessa de.
Produção e caracterização de celulose bacteriana em cultivo estático e agitado / João Pedro Bessa de Souza. – 2019.
54 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Química, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fechine.

Coorientação: Profa. Dra. Ana Iraidy Santa Brígida.

1. Biopolímero. 2. Exopolissacarídeo. 3. Caracterização. I. Título.

CDD 540

JOÃO PEDRO BESSA DE SOUZA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA EM CULTIVO
ESTÁTICO E AGITADO

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fechine (Orientador didático-pedagógico)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Ana Iraídy Santa Brígida (Orientadora profissional)
Embrapa Agroindústria Tropical (Embrapa)

Dra. Morsyleide de Freitas Rosa
Embrapa Agroindústria Tropical (Embrapa)

À vida.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao meu irmão, Davi Bessa de Sousa.

À Dra. Ana Iraidy Santa Brígida e ao Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fechine, pela ótima orientação.

À Dra. Morsyleide de Freitas Rosa, examinadora, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos órgãos de fomento e programas de pesquisa, por viabilizarem o avanço científico.

À Embrapa Agroindústria Tropical, por disponibilizar suas estruturas físicas e intelectuais e por se manter de portas abertas aos estudantes de graduação.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia da Biomassa, pela parceria no desenvolvimento da pesquisa e pelo ambiente frutífero e cooperativo. Agradeço, especialmente, a Matheus e Natália, pelas colaborações diretas e fundamentais. Agradeço também a Sarah e Renata pela continuidade. Agradeço a todos por se manterem disponíveis, abertos e pelo ótimo trabalho em equipe.

Aos colegas do Grupo de Química de Materiais Avançados, pelas reflexões, críticas e sugestões.

Aos colegas do PET, pelo crescimento pessoal e profissional em ambiente próspero e diverso.

Aos meus amigos, sem os quais eu dificilmente teria chegado até esse ponto.

Aos meus primos, pelos sorrisos.

A minha parceira, Guida, corresponsável por muitas das conquistas que me levaram até aqui.

Aos meus pais, Marly e Chagas.

Ao Jesus Cristo, por me lembrar de que podemos ser melhores.

“Tools don't make discoveries. People do.”

-Pierre Curie (personagem)

National Geographic's Genius (2017)

RESUMO

A celulose bacteriana (CB) é um biopolímero produzido através de fermentação por microorganismos. Esse material se destaca para diversas aplicações por sua alta cristalinidade, alta resistência mecânica, biocompatibilidade, biodegradabilidade, transparência e alta estabilidade química. Quando comparada com celulose de origem vegetal, a CB é obtida com alto índice de pureza por métodos de purificação muito mais simples. As características estruturais da CB são diretamente dependentes das suas condições de síntese. Nesse trabalho, foram utilizadas três diferentes cepas em duas formas de cultivo, agitado e estático, para produzir CB por fermentação em meio sintético Hestrin-Schramm (HS). As cepas utilizadas foram *Komagataeibacter* (antigamente *Gluconacetobacter*) *xylinus* ATCC 53582, *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 e *Komagataeibacter xylinus* ATCC 700178. A CB produzida após 5 dias de fermentação foi purificada e caracterizada por difração de raios-X (DRX), espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA) e termoporometria por calorimetria exploratória diferencial (TP-DSC). A maior produção de CB foi alcançada pela *K. xylinus* ATCC 53582, com 1,4 g.L⁻¹ para cultivo agitado e 2,08 g.L⁻¹ para cultivo estático. Os maiores rendimentos também foram encontrados para essa cepa, tendo sido 22 % para o cultivo estático e 9 % para o cultivo agitado. A diferença morfológica entre as CB's produzidas em cada forma de cultivo foi evidente. Todos os resultados de teste de umidade foram superiores a 99%, comprovando a alta capacidade da CB de reter água. No cultivo estático, produziram-se películas de CB's com formato da superfície do meio em que estava contida durante a fermentação; no cultivo agitado, formaram-se pelotas fibrosas. A espectroscopia FTIR constatou que o material produzido é celulose e, junto dos resultados de TGA, sua pureza. Os difratogramas indicaram alta cristalinidade do material. Os resultados de TGA apontam uma maior estabilidade térmica para a CB obtida em cultivo agitado. Os resultados de TP-DSC mostram poros com diâmetros principalmente inferiores a 10 nm, mas com distribuição polidispersa.

Palavras-chave: Biopolímero. Exopolissacarídeo. Caracterização.

ABSTRACT

Bacterial cellulose (BC) is a biopolymer produced by fermentation by microorganisms. This material stands out for various applications because of its high crystallinity, high mechanical strength, biocompatibility, biodegradability, transparency and high chemical stability. When compared to cellulose of vegetable origin, CB is obtained with a high purity index by much simpler purification methods. The structural characteristics of BC are directly dependent on their synthesis conditions. In this work, three different strains were used in two culture forms (static and agitated) to produce BC by fermentation in Hestrin-Schramm (HS) synthetic medium. The strains used were *Komagataeibacter* (formerly *Gluconacetobacter*) *xylinus* ATCC 53582, *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 and *Komagataeibacter xylinus* ATCC 700178. The produced CB was characterized by X-ray diffraction (DRX), Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy, thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry thermoporometry (TP-DSC). The highest production was achieved by *K. xylinus* ATCC 53582, with 1.4 g.L⁻¹ for shake cultivation and 2.08 g.L⁻¹ for static cultivation. The highest yields were also found for this strain, with 22% for static cultivation and 9% for agitated cultivation. The morphological difference between BCs produced in each culture form was evident. All moisture analysis results were greater than 99%, confirming the CB's high ability to retain water. In static culture, BC films were produced with the surface shape of the medium in which it was contained during the fermentation. In the agitated culture, fibrous pellets were formed. FTIR spectroscopy and TGA results found that the material produced is purified cellulose. The diffractograms show high crystallinity of the material. TGA results indicate a higher stability for CB obtained by agitated cultivation. TP-DSC results show pores with diameters mainly lower than 10 nm, but with polydispersed distribution.

Keywords: Biopolymer. Exopolysaccharide. Characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura da celulose.....	16
Figura 2	– Formas de celulose e como obtê-las.....	17
Figura 3	– Estruturas cristalinas da celulose.....	17
Figura 4	– Microscopia eletrônica de varredura apresentando bactéria de <i>K. xylinus</i> produzindo fibra de celulose.....	19
Figura 5	– Rota bioquímica simplificada de síntese de CB a partir de glicose.....	20
Figura 6	– Imagem promocional de membrana regeneradora porosa, produto a base de CB.....	21
Figura 7	– Tipos de água diferenciados por TP-DSC.....	24
Figura 8	– Fluxograma simplificado de metodologia utilizada.....	26
Figura 9	– Termogramas DSC para uma amostra de CB, com destaque para os eventos endotérmicos.....	30
Figura 10	– Produção de CB (g.L ⁻¹).....	32
Figura 11	– CB obtida em cultivo estático.....	35
Figura 12	– CB obtida em cultivo agitado.....	35
Figura 13	– Difractogramas de raios X.....	37
Figura 14	– Curvas termogravimétricas.....	38
Figura 15	– Curvas termogravimétricas derivadas.....	39
Figura 16	– Espectros FTIR.....	41
Figura 17	– Distribuição acumulada de tamanho de poros.....	42
Figura 18	– Distribuição acumulada de tamanho de poros e curvas encontradas.....	44
Figura 19	– Termogramas de DSC.....	45
Figura 20	– DRP em barras por faixa de diâmetro.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição nutricional do meio sintético HS.....	26
Tabela 2 – Açúcar consumido, rendimento e produção de CB.....	33
Tabela 3 – Demais parâmetros e resultados de teste de Tukey.....	33
Tabela 4 – Umidades (% em massa) de amostras.....	36
Tabela 5 – Índice de cristalinidade e resultado de teste de Tukey.....	37
Tabela 6 – Temperaturas iniciais e máximas do evento de degradação da celulose e perda de massa.....	40
Tabela 7 – Regressão de tamanho de poros de cada CB.....	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivos gerais	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	Celulose	16
3.2	Celulose bacteriana	18
3.2.1	<i>Síntese</i>	18
3.2.2	<i>Características e aplicações</i>	20
3.2.3	<i>Cultivo em meio agitado e em meio estático</i>	21
3.2.4	<i>Porosidade</i>	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1	Produção de CB	26
4.1.1	<i>Meio de cultura</i>	26
4.1.2	<i>Cepas</i>	27
4.1.3	<i>Fermentação e análise do meio</i>	27
4.2	Purificação e neutralização de CB	28
4.3	Produção	28
4.4	Caracterização de CB	28
4.4.1	<i>Umidade</i>	28
4.4.2	<i>Difração de Raios-X (DRX)</i>	29
4.4.3	<i>Análise termogravimétrica (TGA)</i>	29
4.4.4	<i>Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i>	29
4.4.5	<i>Termoporometria por calorimetria exploratória diferencial (TP-DSC)</i>	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1	Produção de CB e análise do meio fermentado	32
5.2	Caracterização de CB	35
5.2.1	<i>Umidade</i>	35
5.2.2	<i>Difração de Raios-X (DRX)</i>	36
5.2.3	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	38
5.2.4	<i>Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i>	40

5.2.5	<i>Termoporometria por calorimetria exploratória diferencial (TP-DSC).....</i>	42
6	CONCLUSÕES.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

Vários fatores vêm contribuindo para aumentar a demanda por polímeros biodegradáveis, de fontes renováveis e de grande potencial de aplicação em larga escala (SILVA, 2018). Pode-se citar, por exemplo, os crescentes impactos ambientais de plásticos e demais materiais de origem fóssil. Nesse contexto, um biopolímero com as características desejadas se destaca: a celulose bacteriana (CB)

A celulose é o material de origem natural utilizado pela indústria mais abundante do planeta, mas a maior parte é sintetizada por vegetais (GUPTA et al., 2019; MOURA et al., 2018). A celulose bacteriana, por outro lado, apresenta diversas propriedades superiores à celulose de origem vegetal, incluindo maior cristalinidade, resistência mecânica, capacidade de retenção de água, dentre outras (GAO et al., 2019; BARROS, 2016). Enquanto a celulose vegetal é obtida atrelada a lignina e hemicelulose, a CB é isenta desses macrocomponentes, o que torna seu processo de purificação mais simples, tendo menor impacto ambiental. Essas características a torna interessante para aplicações em diversas áreas, desde a indústria alimentícia a engenharia de tecidos (AZEREDO et al., 2019; VAN ZYL; COBURN, 2019). No entanto, os métodos de produção de celulose bacteriana ainda são considerados caros em comparação a sua homônima de origem vegetal (SILVA, 2019). Além disso, dependendo da aplicação exigida para a celulose bacteriana, diferentes características estruturais são exigidas (CHEN, 2019). Essas características podem variar bastante com as condições de cultivo, incluindo agitação do meio e micro-organismo produtor utilizado. A compreensão apropriada da relação entre condições de cultivo e características do material é fundamental para a escolha de método no desenvolvimento de novas tecnologias de CB.

Nesse contexto, o presente trabalho busca determinar as características físico-químicas e estruturais de celulose bacteriana produzida por três variedades de micro-organismos em cultivo agitado e cultivo estático. Os resultados dessa pesquisa servirão de base para a escolha das condições de síntese para futuros trabalhos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Determinar os efeitos das condições de síntese nas características estruturais da celulose bacteriana de *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582, *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 e *Komagataeibacter xylinus* ATCC 700178 utilizando meio de cultura sintético HS em cultivos agitado e estático.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar produção de CB e rendimento para cada cepa e forma de cultivo utilizadas.

Caracterizar as propriedades físico-químicas e morfológicas das amostras de celulose bacteriana obtidas.

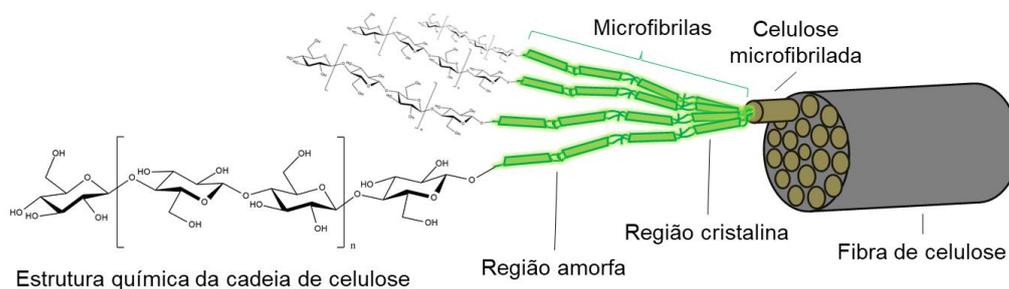
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Celulose

Biodegradável e um recurso renovável, celulose é a substância natural usada em propósitos industriais mais abundante na natureza. Estima-se que entre 10^{11} e 10^{12} toneladas sejam biossintetizadas por ano (GUPTA et al., 2019) Pelo menos até 2015, o Brasil possuía o menor preço por tonelada de celulose produzida. Isso se deve, principalmente, ao clima favorável e à utilização de biotecnologia e engenharia genética na produção brasileira (MOURA et al., 2018).

A celulose é um polissacarídeo linear constituído por ligações consecutivas entre dímeros celobiose. Esse dímero, por sua vez, é formado por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) (LAMPUGNANI et al., 2019). As hidroxilas da celulose, típica de carboidratos, formam ligações de hidrogênio inter e intramoleculares responsáveis por algumas das propriedades da celulose, incluindo tendência em formar cristais. Ao agrupar umas com as outras, as moléculas de celulose lineares formam microfibrilas e fibras, conforme a Figura 1. As microfibrilas possuem regiões amorfas e cristalinas, sendo seu grau de cristalinidade variável de acordo com a fonte e o método de extração (WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019). Os espaços interfibrilares, genericamente chamados de poros, são geralmente irregulares quanto ao formato e ao tamanho. Os poros estão relacionados com a movimentação de líquidos e difusão de solutos através da celulose (NOMENA; VELIKOV, 2019).

Figura 1 – Estrutura da celulose.

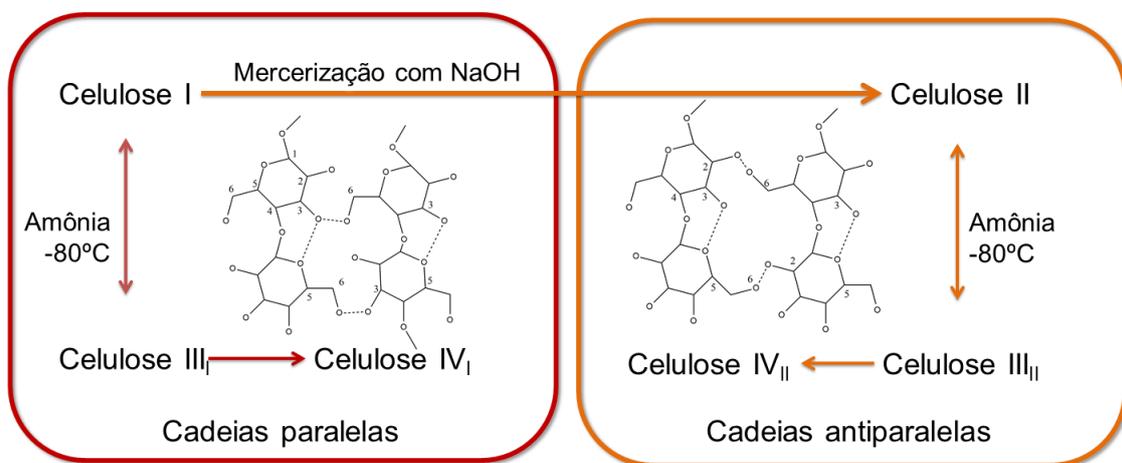


Fonte: Lavoine et al. (2012, com adaptações).

A celulose é um material polimorfo, isto é, apresenta diferentes arranjos entre as cadeias (I, II, III e IV), conforme Figura 2. O tipo I ocorre naturalmente e é classificada em celulose I_{α} (triclínica) e I_{β} (monoclínica). As estruturas cristalinas da celulose I_{α} e I_{β} são apresentadas na Figura 3. Celulose II pode ser obtida a partir de celulose I por dois métodos:

recristalização (solubilização seguida de uma segunda cristalização) ou mercerização (tratamento alcalino, geralmente com hidróxido de sódio). Enquanto em celulose I as cadeias são paralelas entre si, na celulose II há um arranjo antiparalelo entre as cadeias. Essas características são mantidas nas demais formas de celulose sintetizadas a partir dessas. Celulose III_I e do tipo III_{II} podem ser obtidas via tratamento com amônia a partir de, respectivamente, celulose I e II. Por fim, aquecimento em glicerol de celulose III_I e III_{II} forma, respectivamente, celulose IV_I e IV_{II} (FEITOSA, 2019; Huber et al., 2012).

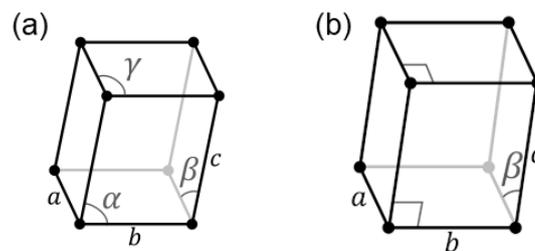
Figura 2 – Formas de celulose e como obtê-las.



Fonte: Lavoine et al. (2012, com adaptações).

Figura 3 – Estruturas cristalinas da celulose

(a) I_α, triclínica, e (b) I_β, monoclínica.



Fonte: elaborado pelo autor.

3.2 Celulose bacteriana

Diferentemente da celulose provinda de vegetais, normalmente contaminadas com lignina e hemicelulose, a celulose produzida por bactérias (CB) é isenta desses macrocomponentes, o que torna seu processo de purificação mais simples, tendo menor impacto ambiental. A CB é biossintetizada via fermentação, sendo constituída por uma rede porosa de fibras de diâmetro nanométrico. Esse material chama atenção devido a suas características como alta cristalinidade, maior resistência mecânica, biocompatibilidade, biodegradabilidade, transparência e alta estabilidade química (GAO et al., 2019). Suas propriedades, compostos e funcionalizações permitem aplicações em condutores, explosivos, fabricação de papel, antimicrobianos, dentre outros, incluindo áreas como indústria alimentícia e biomedicina (LIN et al., 2013; CAMPANO et al, 2015; WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019).

3.2.1 Síntese

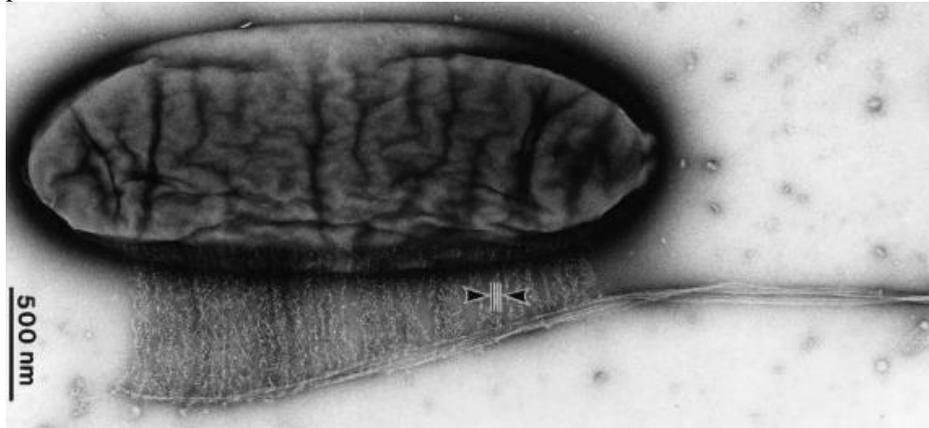
A primeira descrição de CB na literatura data de 1886, quando Adrian J. Brown, químico britânico, ao estudar culturas de bactérias em vinagre, percebeu a formação de uma “membrana gelatinosa” sobre o meio (BROWN, 1886). Essa membrana foi, posteriormente, identificada como celulose. Desde então, diversos produtos de celulose, produzidos por diferentes bactérias, foram desenvolvidos, apresentando diferentes morfologias, estruturas, propriedades e aplicações (WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019).

As bactérias biossintetizantes de CB são, em geral, gram-negativas, apresentam forma de bacilos (CAMPANO et al., 2015). Dentre as bactérias produtoras de CB, o gênero *Komagataeibacter* (anteriormente *Gluconacetobacter* e primeiramente *Acetobacter*) em específico, é comumente usado pelo seu alto rendimento. A *K. xylinus*, até onde se sabe, é a bactéria mais eficiente na produção de CB (GAO et al., 2019; CAMPANO et al, 2015). Essa espécie é aeróbica, não fotossintetizante, e capaz de transformar diversas fontes de carbono em CB em poucos dias.

CB é biossintetizada pelas bactérias via fermentação, que metaboliza açúcares, como a glicose, para formar a celulose. Essa biossíntese ocorre entre a membrana externa e a membrana citoplasmática dos micro-organismos (CAMPANO et al., 2015). À medida que é formada, a celulose é secretada pelos poros da membrana plasmática. Fora da célula, as cadeias de celulose se unem por pontes de hidrogênio, formando as fibras (Figura 4).

Acredita-se que a CB é sintetizada com o objetivo de proteger o organismo de radiação ultravioleta e ambiente quimicamente severo.

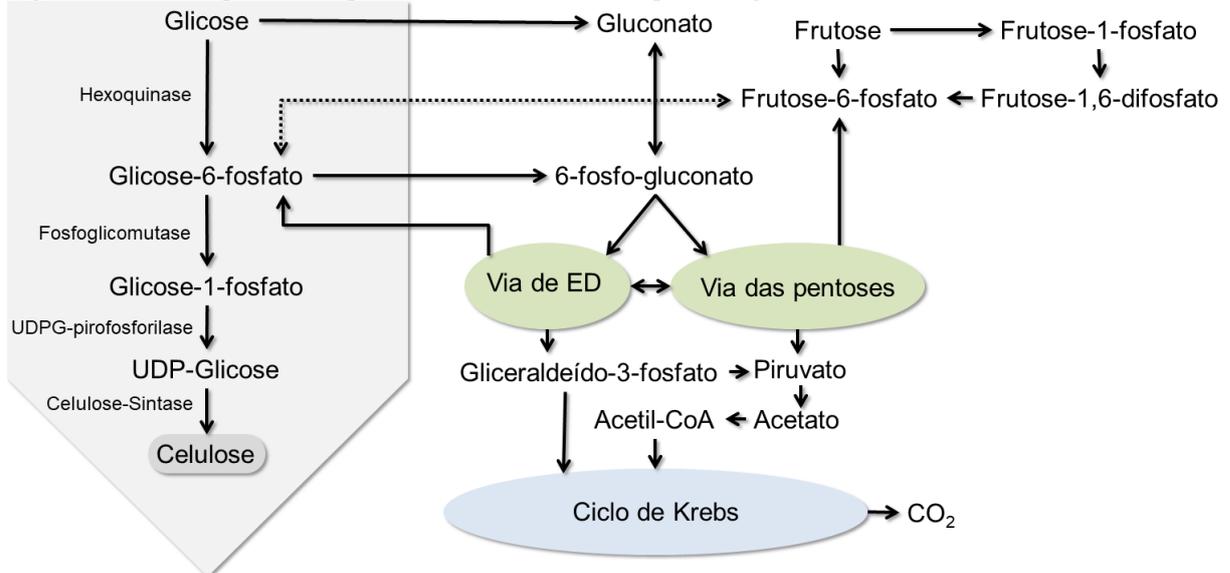
Figura 4 – Microscopia eletrônica de transmissão apresentando bactéria de *K. hansenii* produzindo microfibras de celulose.



Fonte: Hirai, Tsuji e Horii (2002).

Colvin e Leppard (1977) sugeriram uma rota bioquímica de produção de CB para a *K. xylinus*. Nessa rota, a glicose reage para formar a glicose-6-fosfato, em seguida glicose-1-fosfato, então uridina-difosfato-glicose (UDP-Glicose ou UDPG), e por fim celulose. Para que haja o controle apropriado dessas reações, é necessária a ação de enzimas-chave, tais como hexoquinase, isomerase, fosfoglicomutase, UDPG-pirofosforilase e a celulose-sintase. Ullah et al. (2015) sintetizaram celulose por enzimas obtidas a partir de *G. hansenii* PJK (KCTC 10505BP) e apresentaram rotas baseadas em seus resultados e na literatura anterior. Essa rede de reações está associada à via das pentoses, à via de Entner–Doudoroff (ED) e ao ciclo de Krebs (UI-ISLAM, 2017; LIN et al., 2013). Essas relações são indicadas de forma simplificada na Figura 5. Nela, nota-se também a rota de produção de celulose a partir da frutose. A maioria das bactérias produtoras de celulose conhecidas oxidam etanol e produzem ácidos orgânicos a partir de açúcares tais como a glicose (CAMPANO et al., 2015). Apesar das propostas e pesquisas até o momento, muito ainda tem de ser estudado sobre os mecanismos de produção de CB, especialmente para se entender as particularidades de cada espécie. A compreensão do mecanismo de síntese de CB por cada espécie pode ser fator determinante no avanço tecnológico nessa área. Entende-se que, conhecendo o mecanismo, será possível planejar estratégias de pesquisa e novos processos com maior capacidade de previsão e maior eficiência.

Figura 5 – Rota bioquímica simplificada de síntese de CB a partir de glicose.



Fonte: elaborado pelo autor.

3.2.2 Características e aplicações

Além de um processo mais simples para alcançar alto índice de pureza quando comparada com celulose de origem vegetal, dispensando etapas complexas de purificação, a CB apresenta outras características convenientes para diversas aplicações. Muitas dessas características estão relacionadas à estrutura nanométrica de suas fibras e ao modo como elas se distribuem no espaço, particularidades da CB.

Características notáveis da CB incluem biocompatibilidade, alta porosidade e grande capacidade de retenção de água, as quais permitem que ela seja aplicada de diversas formas na biomedicina. Os primeiros registros de uso da CB em biomedicina são de origem brasileira, na década de 1980. Naquela época, o produto Biofill[®] recebeu uma série de patentes que descrevem seu uso como substituto temporário de pele para queimaduras e úlceras. Produtos semelhantes foram fabricados com o passar dos anos, recebendo o nome comercial de membrana regeneradora porosa (Figura 6). Paralelamente, a Johnson & Johnson explorava o uso da CB como carregador de líquido para curar feridas (STUMPF et al., 2018). Na área de engenharia de tecidos, a CB pode ser usada como *scaffold*, pois dependendo do modo como é cultivada, ela pode assumir diversos formatos (WANG et al., 2018). Outras possíveis aplicações biomédicas da CB incluem: entrega controlada de fármacos e sensores baseados em células vivas (BADSHAH et al., 2018; VAN ZYL; COBURN, 2019).

Figura 6 – Imagem promocional de membrana regeneradora porosa, produto a base de CB.



Fonte: MC Surgical (2019).

Na alimentação, a aplicação mais conhecida da CB é na sobremesa “nata de coco”, originária das Filipinas, mas consumida internacionalmente. Esse alimento é produzido pela fermentação da água de coco. Outras aplicações potenciais da CB na indústria de alimentos incluem atuação como embalagem ou agente gelificante (AZEREDO et al., 2019).

Assim como a celulose vegetal foi utilizada para a produção de explosivos, a CB também tem essa possível aplicação. Por apresentar grande área superficial, rede de nanofibras ultrafinas e alta pureza quando comparada à celulose vegetal, foi possível obter resultados promissores com nitrocelulose feita a partir de CB (SUN et al., 2010).

3.2.3 Cultivo em meio agitado e em meio estático

As características da CB produzida estão diretamente relacionadas às formas em que as bactérias produtoras foram cultivadas (WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019). Existem várias formas de cultivos possíveis, assim como classificações. Do ponto de vista da movimentação do sistema, pode-se destacar: o cultivo estático, em que o recipiente em que o meio está contido permanece imóvel durante todo o processo; e o cultivo em meio agitado,

em que há movimentação, geralmente, constante.

Em muitos casos, a produção de CB em meio agitado é inferior quando comparada ao cultivo estático. Isso ocorre, pois, em ambiente de maior estresse, as células não produtoras se desenvolvem com maior facilidade. Conseqüentemente, com o passar das gerações, a fração de células produtoras, menos desenvolvidas e, portanto, menos reproduzidas, diminui (CAMPANO et al., 2015). No entanto, isso não é regra, podendo acontecer a situação inversa para algumas cepas ou condições (CHEN et al., 2019). Geralmente, para o cultivo agitado, são observadas diferenças estruturais como: diminuição do grau de polimerização e índice de cristalinidade, aumento da fração de celulose do tipo I_{α} e do tamanho do cristalito (SINGHSA; NARAIN; MANUSPIYA, 2018).

Em meio estático, a CB se apresenta como uma fina película na superfície do meio com maior densidade na área exposta ao ar. Durante a fermentação o material costuma flutuar. Uma das razões é o acúmulo de bolhas de carbono provenientes das bactérias (AZEREDO et al., 2019). Além disso, a busca dos micro-organismos por oxigênio faz com que eles se desenvolvam preferencialmente próximos à superfície. Como o formato da película se adapta ao formato do recipiente, tal propriedade é fundamental para algumas de suas possíveis aplicações, como o já citado exemplo de *scaffolds*.

O cultivo agitado, por outro lado, permite uma maior homogeneidade da concentração dos nutrientes no meio no decorrer do processo, graças à convecção proveniente da agitação. A CB produzida por essa forma não se limita a superfície do meio, apresentando formato dependente da velocidade de agitação (UL-ISLAM et al., 2017).

3.2.4 Porosidade

A porosidade da CB está diretamente relacionada às suas possíveis aplicações, uma vez que a funcionalização da superfície, a área superficial e a capacidade de retenção de água dependem diretamente dela. Existem diversas técnicas para se estudar a porosidade de um sólido, as quais se pode destacar a adsorção e dessorção de gás, a permeabilidade de gás e a intrusão de mercúrio (ORSOLINI, 2017). No entanto, essas técnicas se limitam a estudos de materiais seco.

A calorimetria exploratória diferencial (DSC, do inglês *differential scanning calorimetry*) é uma técnica termoanalítica que permite medir o fluxo de calor em uma amostra, mesmo que úmida, em comparação com uma referência em temperaturas

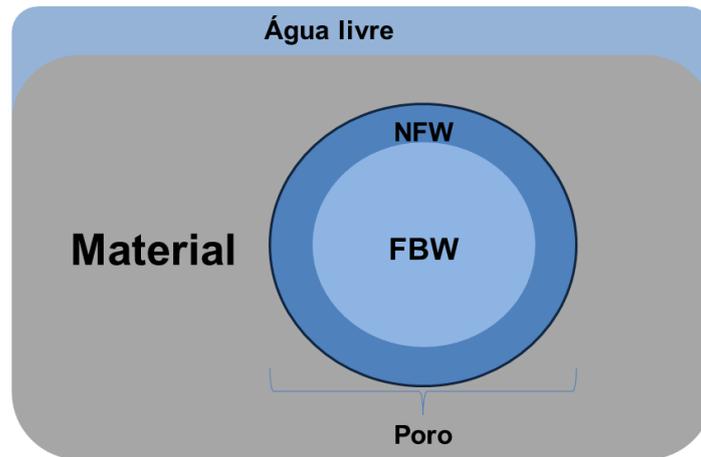
programadas. A DSC evita a hornificação, ou seja, alterações físico-químicas na fibra de celulose devido ao processo de secagem. Esse fenômeno pode alterar significativamente a estrutura da celulose e, conseqüentemente, o tamanho dos poros, levando a erros (OLIVEIRA, 2014). Com a variação de temperatura, transformações químicas e físicas associadas a fluxo de calor podem acontecer com a amostra, e a DSC permite o estudo dessas alterações.

Nesse tipo de análise, a amostra e a referência podem estar no mesmo forno, equipamento conhecido como calorímetro exploratório diferencial (também DSC, do inglês *differential scanning calorimeter*) de fluxo de calor, ou em fornos idênticos porém separados, técnica do tipo DSC de compensação de potência. No DSC de fluxo de calor, a entalpia associada às alterações endotérmicas ou exotérmicas é medida baseada na diferença de temperatura entre a amostra e a referência durante o fenômeno. Já no DSC de compensação de potência, a amostra e a referência são mantidas na mesma temperatura por resistências distintas. A medida da entalpia é realizada pela diferença na potência fornecida à amostra e à referência com o objetivo de mantê-las na mesma temperatura. Quando o processo é endotérmico, a potência fornecida à amostra é aumentada; quando é exotérmico, a potência fornecida à referência é aumentada (HÖHNE et al, 2013).

A termoporometria, também chamada de criometria, é uma técnica de análise de tamanho de poros em sólidos. A técnica se baseia na análise de um sinal referente à transição de fase sólida para líquida de uma substância contida nos poros. Para a termoporometria por calorimetria, esse sinal é o calor associado à transição de fase. Para a análise de celulose, a substância normalmente utilizada é a água.

A TP-DSC consegue diferenciar três tipos de água de acordo com sua interação com os poros. A água livre (FW, do inglês *free water*), também chamada de água não ligada, encontrada fora dos poros e que funde a 0°C; a água confinada congelável (FBW, do inglês *freezing bound water*), que apresenta ponto de fusão inferior ao da FW devido às interações com o material; e água não congelável (NFW, do inglês *non-freezing water*), tão ligada ao material que não chega a atingir o estado sólido. A Figura 7 ilustra os tipos de água em relação a um poro imaginário.

Figura 7 – Tipos de água diferenciados por TP-DSC.



Fonte: elaborado pelo autor.

A temperatura de transição de fase de uma substância confinada em um poro é diferente da temperatura de fusão sem confinamento, e essa diferença pode ser expressa conforme as equações (1) e (2). Essa diferença ocorre, pois a pressão a qual a substância, no caso a água, está submetida no interior do poro é diferente da pressão externa ao material (OLIVEIRA, 2014).

$$\Delta T = -K_c \frac{S}{V} \quad (1)$$

$$\Delta T = -K_c \frac{\delta S}{\delta V} \quad (2)$$

Onde S é a área da interface sólido-líquido, V é o volume da fase sólida, e K_c é uma função (3) da densidade do líquido (ν_l), da energia de interface sólido-líquido (γ_{sl}), da temperatura de fusão sem confinamento (T^o) e da entalpia de fusão (ΔH) do sólido.

$$K_c = -\nu_l * \gamma_{sl} \frac{T^o}{\Delta H} \quad (3)$$

Apesar dos poros para CB provavelmente serem irregulares, as aproximações comumente realizadas na literatura consideram formas cilíndricas, conforme a equação (4).

$$d = -\frac{2K_c}{\Delta T} \quad (4)$$

A melhor definição da linha de base na TP-DSC é alcançada usando o método de aquecimento passo-a-passo. Para isso, a amostra é congelada e aquecida em N intervalos. Ao final de cada um, segue um intervalo isotérmico para definição da linha de base.

Para se conhecer o tamanho do poro, utiliza-se a relação entre massa e volume para a substância confinada, normalmente a água. A massa de gelo (M) fundido em cada passo de aquecimento (i) pode ser encontrada pela equação (5).

$$M_i = \frac{Q_i - C_i * \delta T}{q_i} \quad (5)$$

Onde Q é o calor medido no passo de aquecimento, C_i é a capacidade calorífica da amostra, δT é a variação de temperatura no passo de aquecimento e q_i é a entalpia de fusão do gelo. Define-se Q_i e q_i como positivos. Normalmente utilizam-se valores tabelados de q_i e estima-se C_i a partir do primeiro e último passos de aquecimento, quando a transição de fase é pequena ou inexistente.

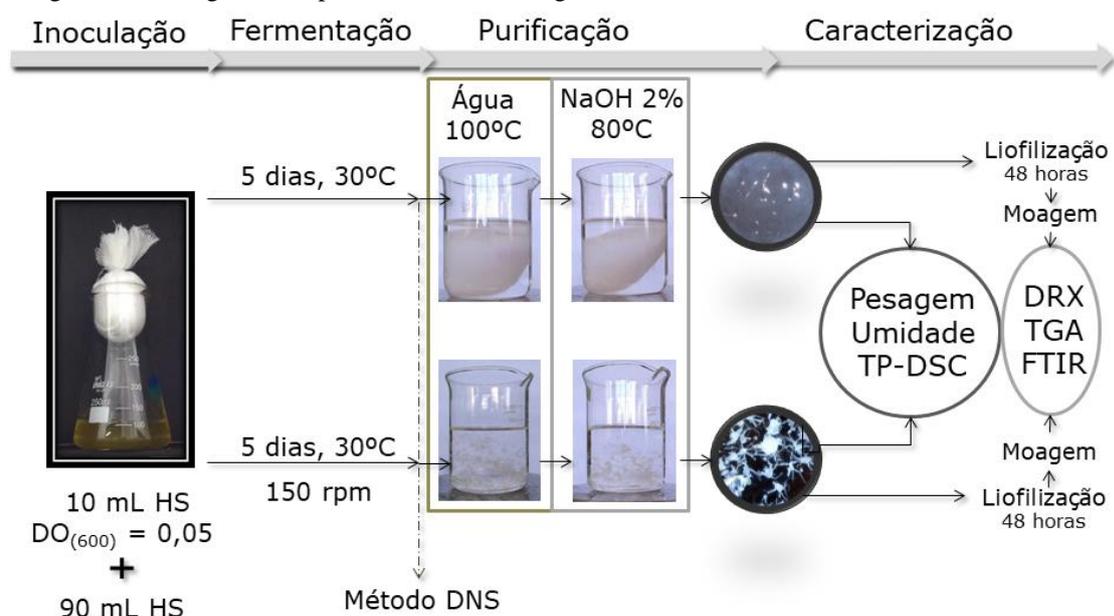
Em comparação com outros materiais, a aplicação de termoporometria em celulose bacteriana foi pouco abordada na literatura. Na literatura recente, até onde se sabe, somente Driemeier, Mendes e Oliveira (2012) citaram estudos do gênero para esse material. Os autores realizaram um estudo sobre termoporometria em materiais celulósicos, mas reportaram pouca repetibilidade nos resultados para CB.

Variações de características da CB de acordo com a forma de cultivo, incluindo estudo de porosidade por TP-DSC, são abordadas nesse trabalho.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A Figura 8 apresenta o esquema simplificado da metodologia utilizada nesse trabalho.

Figura 8 – Fluxograma simplificado de metodologia utilizada.



Fonte: elaborado pelo autor.

4.1 Produção de CB

4.1.1 Meio de cultura

Utilizou-se o meio de cultura sintético HS (HESTRIN; SCHRAMM, 1954), cuja composição pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição nutricional do meio sintético HS

Parâmetros	Concentração (g.L ⁻¹)
Glicose	20,0
Extrato de levedura	5,0
Peptona	5,0
Ácido cítrico	1,5
Fosfato de sódio	2,7

Fonte: Hestrin e Schramm (1954)

4.1.2 Cepas

Para a produção de CB utilizou-se três cepas provenientes da coleção *American Type Culture Collection* (ATCC). São elas as bactérias *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582, *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 e *Komagataeibacter xylinus* ATCC 700178. O pré-inóculo foi preparado através da ativação do micro-organismo em caldo HS sólido (ágar 16,67 g.L⁻¹) esterilizado a 121 °C por 15 minutos e incubado por 48h a 30 °C em cultivo estático em ágar inclinado.

4.1.3 Fermentação e análise do meio

Inicialmente, cada cepa foi inoculada em erlenmeyer contendo o meio de cultura HS esterilizado a 121°C por 15 min. Para manter a concentração de bactéria aproximadamente constante, utilizou-se da técnica de espectroscopia de absorção UV-Vis, mantendo-se densidade óptica (DO) de 0,05 em 600 nm. 10 mL dessa mistura foram adicionados a erlenmeyers com 90 mL de meio de cultura, onde foi realizada a fermentação. A produção em meio estático foi realizada em estufa com demanda biológica de oxigênio (BOD), por 5 dias a 30 °C. A fermentação em meio agitado foi realizada em incubadora com agitação orbital (Tecnal[®], TE-420) por 5 dias a 30°C e 150 rpm.

Ao fim da fermentação, a CB foi removida. Em seguida, quantificaram-se os açúcares do meio residual pelo método de DNS (MILLER, 1959). O rendimento de CB ($\gamma_{CB/S}$) foi calculado de acordo com a equação (6) e, o açúcar consumido, de acordo com a equação (7).

$$\gamma_{CB/S} = \frac{m_{CB} \cdot 100}{S_i - S_f} \quad (6)$$

$$\text{Açúcar consumido (\%)} = \frac{(S_i - S_f) \cdot 100}{S_i} \quad (7)$$

Onde m_{CB} é a massa seca de celulose produzida, S_i é a massa de açúcar inicial (antes da fermentação) e S_f é a massa de açúcar final (após o processo fermentativo).

4.2 Purificação e neutralização de CB

A CB produzida em meio estático foi purificada por lavagem em água a 100 °C por 1 hora seguida de banho em solução de NaOH 2,0 % (m.V⁻¹) a 80 °C até remoção total de excesso de meio de cultura e organismo fermentador. Neutralizou-se o pH da CB através de sucessivas lavagens com água. A CB em meio agitado foi purificada e neutralizada por processo análogo com auxílio de peneira de 1,0 mm de malha.

4.3 Produção

A produção de celulose foi determinada utilizando-se a equação (8).

$$P [\text{g.L}^{-1}] = m_{\text{CB}} \cdot V^{-1} \quad (8)$$

Onde m_s é a massa seca de celulose produzida e V é o volume de meio de cultura (0,100 L). Obteve-se o valor de m_s por secagem da CB produzida em balança de infravermelho (Marte – ID2000) à 170°C.

4.4 Caracterização de CB

Após processo de purificação, parte da CB foi imersa durante 24 horas em água deionizada para futura análise de umidade e TP-DSC. Outra parte foi congelada em freezer Ultra Low Sanyo[®] a -80°C para, em seguida, ser liofilizada por 48 horas em liofilizador Beta 1-8 LSCbasic Martin Christ[®]. A CB liofilizada foi moída em moinho analítico de corte (IKA modelo A11 basic) para, então, ser caracterizada por FTIR, TGA e DRX.

4.4.1 Umidade

A umidade percentual das amostras de CB foi determinada através da equação (9).

$$U(\%) = \left(\frac{m_u - m_{\text{CB}}}{m_u} \right) * 100 \quad (9)$$

Onde m_u é a massa de CB úmida obtida em balança analítica de precisão e m_{CB} é a massa de CB seca e pesada em balança de infravermelho (Marte – ID2000) a 170°C.

Os valores encontrados de umidade são divididos nos feitos em triplicata, portanto com erro associado; e os encontrados para amostra levada ao DSC. Como a análise de DSC exige umidade da amostra em questão, ela foi apresentada a parte.

4.4.2 Difração de Raios-X

As análises de DRX foram realizadas no laboratório de Raios-X do Departamento de Física, da Universidade Federal do Ceará. Os gráficos de difração de raios X foram obtidos em difratômetro para amostras policristalinas modelo XPert Pro MPD – Panalytical, com tubo de Co em 40 kV e 40 mA na escala 2θ . O intervalo angular utilizado foi de 3° a 50° com uma velocidade de varredura de $0,5^\circ/\text{min}$. O índice de cristalinidade (IC) foi estimado pelo método descrito por Segal et al. (1959) utilizando a equação 10:

$$IC(\%) = \left[\frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \right] * 100 \quad (10)$$

Onde I_{002} é a intensidade máxima do pico de difração para o plano 002 (celulose tipo I) e I_{am} é a intensidade da parte amorfa da amostra. Quando se usa um tubo de cobre (radiação Cu-K α , $\gamma = 1,5\beta 4 \text{ \AA}$), $2\theta \sim 22^\circ$ para I_{002} e $2\theta \sim 18^\circ$ para I_{am} . Em casos em que se utiliza tubo de cobalto (radiação Co-K α , $\gamma = 1,79026 \text{ \AA}$), como no presente trabalho, $2\theta \sim 26^\circ$ para I_{002} e $2\theta \sim 21^\circ$ para I_{am} (DEMUNER, 2017).

4.4.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas foram conduzidas entre 25 e 800°C com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de $40 \text{ mL}/\text{min}$ em analisador térmico PerkinElmer[®] modelo STA 6000. As massas das amostras variaram de 4,5 a 10 mg.

4.4.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas em espectrômetro FTIR PerkinElmer[®] modelo Spectrum Two, com faixa de leitura de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras. As leituras foram feitas em partilha de KBr com 5% (em massa) da amostra macerada.

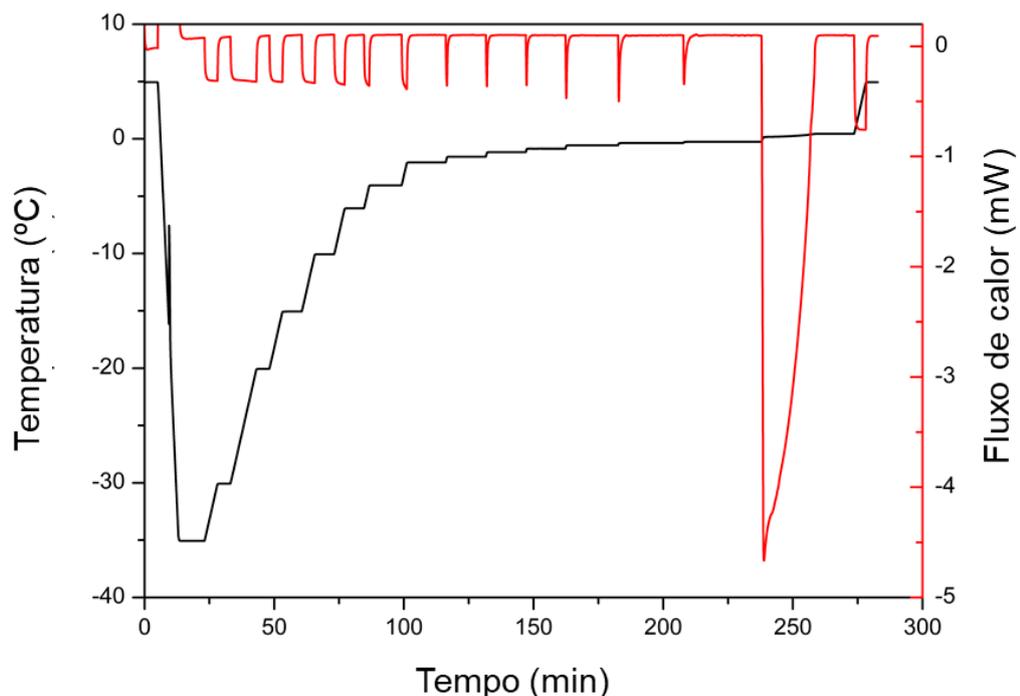
4.4.5 Termoporometria por calorimetria exploratória diferencial (TP-DSC)

As medidas de termoporometria foram feitas por calorimetria exploratória

diferencial (Differential Scanning Calorimetry, em inglês) utilizando o calorímetro Q20 TA Instruments® acoplado a um sistema de refrigeração RCS90 da mesma marca e amostrador automático. As amostras grandes demais para o procedimento são cortadas com bisturi até atingirem dimensões milimétricas.

Segue-se, então, o método com parâmetros definidos por Rojo et al. (2015) para nanofibras de celulose com ausência de lignina. A análise se inicia mantendo a amostra a 5 °C por 5 minutos. Então, ela é esfriada a -35°C com rampa de esfriamento de 5 °C.min⁻¹ e fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹, seguido de uma isoterma de 10 minutos para equilibrar o sistema, de modo a garantir que a água esteja congelada. Em seguida, o sistema sofre aquecimento em 14 etapas, até alcançar 5 °C, acima, portanto, do ponto de fusão da água livre (0°C). Cada etapa de aquecimento é composta por uma rampa de aquecimento de 1 °C.min⁻¹ seguida de isoterma com tempo suficiente para a fusão daquela etapa ser concluída. As isotermas são feitas nas seguintes temperaturas: -35,00, -30,00, -20,00, -15,00, -10,00, -6,00, -4,00, -2,00, -1,50, -1,10, -0,80, -0,50, -0,30, -0,20, -0,50, 5,00 °C. Os resultados brutos coletados pela técnica são obtidos como curvas de temperatura e fluxo de calor conforme Figura 9.

Figura 9 – Termogramas DSC para uma amostra de CB, com destaque para os eventos endotérmicos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

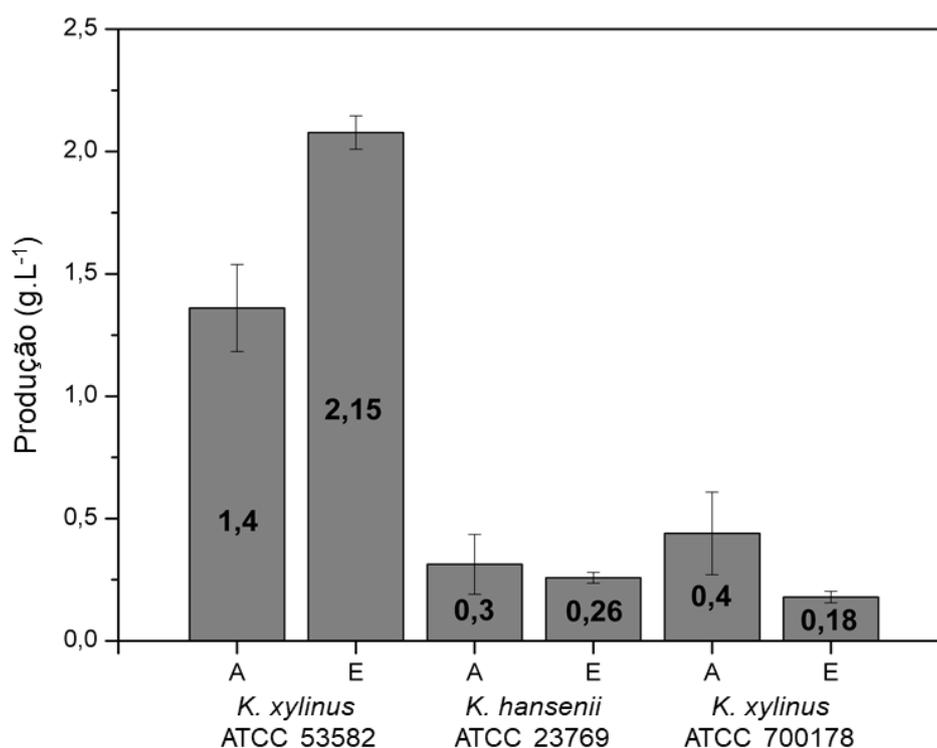
Após a medida da termoporometria, determina-se a massa do cadinho para verificar se houve perda de água. Na sequência, a tampa do cadinho é perfurada e o recipiente é inserido em estufa com o objetivo de evaporar toda a água. Após a evaporação, determina-se novamente a massa do cadinho, do que se obtêm, por diferença, a massa de água que havia na amostra e, conseqüentemente, também a massa da amostra seca. Esses valores são comparados com os obtidos por balança de infravermelho, de modo a confirmar sua exatidão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Produção de CB e análise do meio fermentado

Na Figura 10 é possível observar os resultados das produções de celulose bacteriana de todos os meios de cultura utilizados.

Figura 10 – Produção de CB (g.L^{-1}) obtida por cada cepa em cultivo agitado (A) e estático (E).



Fonte: elaborado pelo autor.

Também foi realizada a análise de açúcares totais no meio após a fermentação comparando com a quantidade inicial e a massa de CB produzida. A partir desses resultados, foi possível calcular o rendimento de CB em relação ao açúcar consumido pelos micro-organismos. Cada um dos parâmetros obtidos foi submetido ao teste de Tukey (1984) Os resultados são expressos na Tabela 2 e Tabela 3.

Tabela 2 – Açúcar consumido, rendimento (γ) e produção de CB em cultivo agitado (A) e estático (E) pelas cepas ATCC 53582 (CB1), ATCC 23769 (CB2) e ATCC 700178 (CB3).

Produtora	Açúcar consumido (%)	Tukey (Grupo)	$\gamma_{CB/S}$ (%)	Tukey (Grupo)	Produção (g.L⁻¹)	Tukey (Grupo)
CB1 A	76,7 ± 1,1	2	8,88 ± 1,20	2	1,36 ± 0,17	1
CB1 E	47,1 ± 5,1	1	22,2 ± 1,66	3	2,08 ± 0,07	2
CB2 A	87,2 ± 0,9	3	1,80 ± 0,70	1	0,31 ± 0,12	3
CB2 E	53,9 ± 0,9	1	2,40 ± 0,22	1	0,26 ± 0,02	3
CB3 A	81,0 ± 0,3	2, 3	2,71 ± 1,04	1	0,44 ± 0,17	3
CB3 E	62,1 ± 0,5	4	1,44 ± 0,20	1	0,18 ± 0,02	3

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 3 – Demais parâmetros e resultados de teste de Tukey.

	α	MS	Df
Açúcar consumido (%)	0,0500	6,2972	11,000
$\gamma_{CB/S}$ (%)	0,0500	2,1977	11,000
Produção (g.L⁻¹)	0,0500	0,04237	11,000

Fonte: elaborada pelo autor.

É importante destacar que os erros associados às medidas de produção e rendimento para o cultivo agitado podem não estar relacionados à fermentação em si, mas ao processo de purificação, em que consecutivas lavagens em peneira podem ter causado perda variável de massa de CB. Um indicativo disso é o erro em cultivo agitado ser maior (uma ordem de grandeza) nas medidas de produção, associadas diretamente a massa de CB pesada. Discussão análoga pode ser utilizada para explicar as semelhanças entre os rendimentos (*K. xylinus* ATCC 53582 foi a única a se destacar) e as medidas de açúcar consumido durante o cultivo agitado.

O teste de Tukey realizado não permitiu distinguir a produção de acordo com as cepas e formas de cultivo, com exceção das CB's produzidas pela *K. xylinus* ATCC 53582. Esses resultados evidenciam uma maior produção por essa cepa, o que está de acordo com a literatura (GAO et al., 2019; CAMPANO et al, 2015). Além disso, apontam produções semelhantes entre as demais variedades. Se houverem tendências entre as demais formas de

cultivo, é possível que elas tenham sido ocultadas pelo baixa quantidade de amostras envolvidas nas análises. Para esse trabalho, utilizaram-se triplicatas para cada condição. Maiores repetições permitiriam uma diminuição do erro associado a cada processo e, possivelmente, uma melhor diferenciação entre os grupos amostrais. As discussões a seguir levam isso em conta e, em determinados momentos, compara grupos estatisticamente iguais por Tukey.

Para todos os micro-organismos, a quantidade de açúcar consumida em meio estático foi inferior ao cultivo agitado. Isso pode estar associado ao maior estresse ao qual foram submetidos na agitação; ao aumento na taxa respiração devido a maior quantidade de oxigênio dissolvido; e a mais rápida reposição de concentração de açúcares por convecção, não estando limitada a difusão como no caso do meio estático (CAMPANO et al, 2015; AZEREDO et al., 2019). É importante destacar que um elevado consumo de açúcar não implica necessariamente em uma maior produção de CB. Isso acontece, pois, além da fermentação, o açúcar também é consumido durante o processo de respiração do microrganismo.

A *K. xylinus* ATCC 53582 foi a variedade que apresentou maior produção de CB tanto em meio estático ($2,15 \pm 0,07 \text{ g.L}^{-1}$) como em meio agitado ($1,4 \pm 0,2 \text{ g.L}^{-1}$). Isso está de acordo com a literatura, na qual a espécie *K. xylinus* é apontada como a maior produtora de CB (GAO et al., 2019; CAMPANO et al, 2015). A *K. hansenii* ATCC 23769 foi a segunda maior produtora, apresentando produção próxima a da variedade *K. xylinus* ATCC 700178 quando cultivadas em meio agitado. Tendência semelhante foi alcançada por Fang e Catchmark (2015) por fermentação durante três dias a 125 rpm, apesar de os valores destes terem sido inferiores, o que é condizente com o menor tempo do processo.

Quanto à morfologia, a CB foi formada em cultivo estático como uma membrana na superfície do meio, com o formato arredondado, apresentado na Figura 11, adaptando-se ao recipiente em que estava contida.

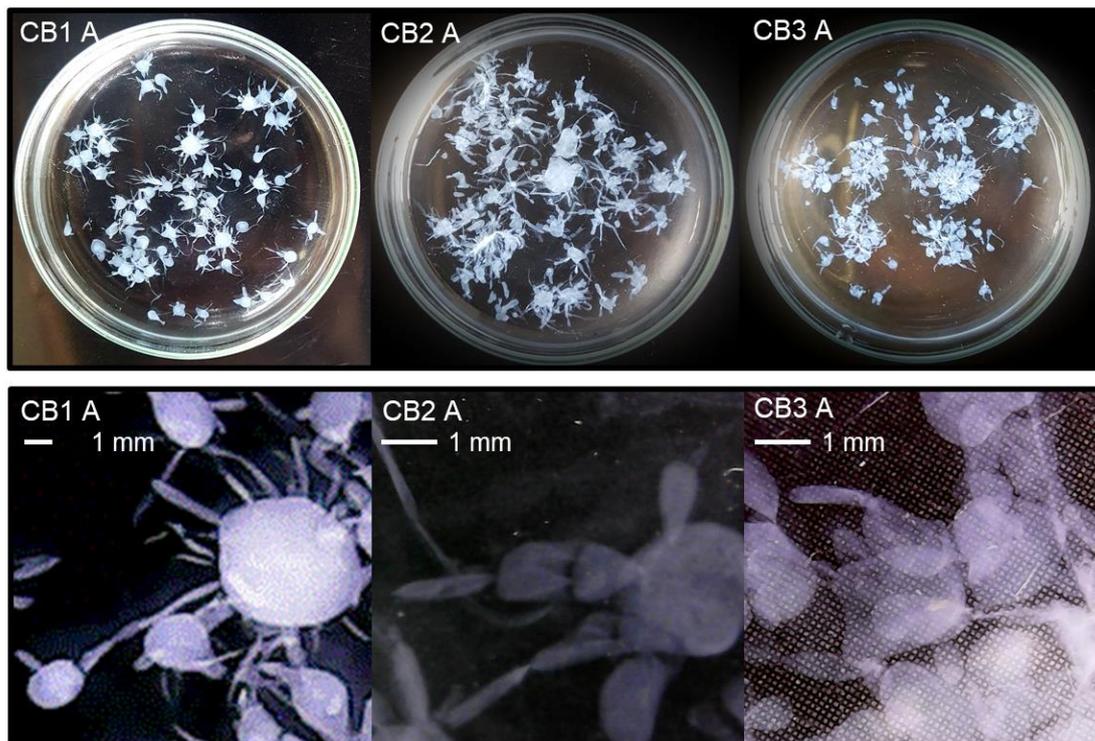
Em cultivo agitado, a CB produzida não se acumulou em um único espaço, apresentando-se como diversas pelotas com fibras ao seu redor, conforme Figura 12. Muitas pelotas apresentam formato arredondado, outras são mais alongadas, com dimensões variando entre 1 e 3 mm. Algumas poucas partículas apresentam maiores dimensões, como, por exemplo, a de ~6,7 mm de diâmetro da foto de CB1 A na Figura 12 (inferior). A presença de fibras ao redor das pelotas é associada ao do processo de formação do material e ao desmantelamento deste pela água. A imagem de CB3 A na Figura 12 (inferior), com fundo quadriculado, demonstra o caráter translúcido do material.

Figura 11 – CB obtida em meio HS por cepas ATCC 53582 (CB1), ATCC 23769 (CB2) e ATCC 700178 (CB3) em cultivo estático (E).



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 12 – CB obtida em meio HS por cepas ATCC 53582 (CB1), ATCC 23769 (CB2) e ATCC 700178 (CB3) em cultivo agitado (A).



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Caracterização de CB

5.2.1 Umidade

Durante o processo de análise, em que ocorre a desidratação do material, a

estrutura de todas as amostras foi colapsada. Tal característica evidencia a necessidade de liofilização para análises estruturais realizadas a seco.

A Tabela 4 expressa os valores de umidade encontrados para todas as variedades de CB produzidas. Os valores encontrados de umidade são divididos nos feitos em triplicata, portanto com erro associado; e os encontrados para amostra levada ao DSC. Como a análise de DSC exige umidade da amostra em questão, ela foi apresentada à parte.

Tabela 4 – Umidades (% em massa) de amostras de CB produzidas em meio agitado (A) e estático (E) feitas em triplicata e de amostras destinadas a DSC (Umidade DSC).

Bactéria produtora	Cultivo	Umidade (%)	Umidade DSC (%)
<i>K. xylinus</i>	A	99,13 ± 0,06	99,42
ATCC 53582	E	99,05 ± 0,02	99,31
<i>K. hansenii</i>	A	99,60 ± 0,15	99,56
ATCC 23769	E	99,57 ± 0,06	99,58
<i>K. xylinus</i>	A	99,23 ± 0,40	99,18
ATCC 700178	E	99,68 ± 0,11	99,62

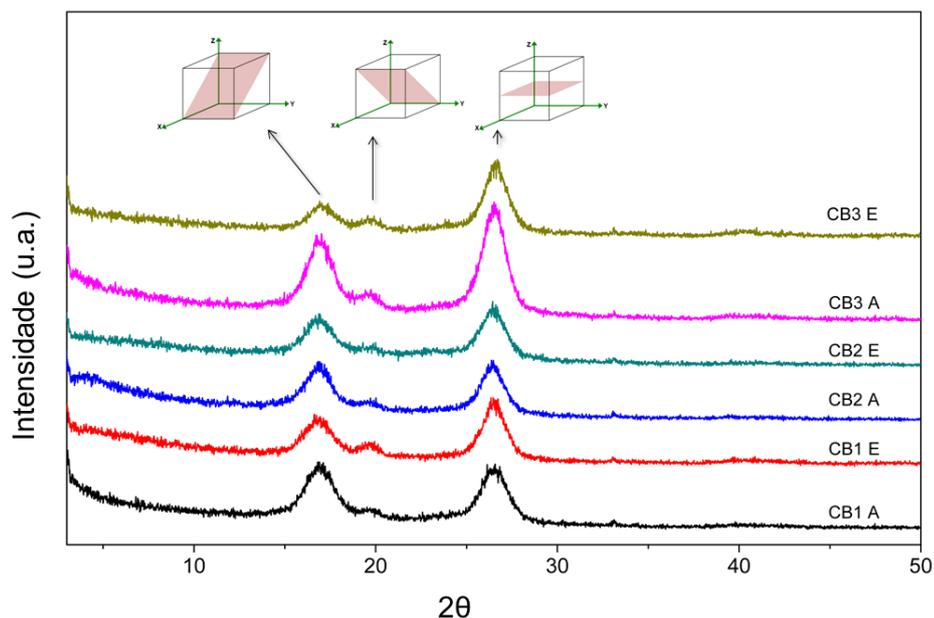
Fonte: elaborada pelo autor.

A alta umidade das amostras evidencia a alta capacidade da CB de reter água (~99%). O material a base de CB quando úmido trata-se, portanto, de um hidrogel. Tal característica já é bem conhecida pela literatura, que relata capacidade de retenção de água para celulose bacteriana superiores a 99% (ZMEJKOSKI et al., 2018). Um melhor entendimento sobre o processo de retenção e perda de água da CB pode levar a aplicações mais específicas para o material. Por exemplo, na área biomédica, em que a fração de água nos tecidos humanos é, em média, de 70% para pele, 80% para cartilagens e 75% para músculos (REBELO et al., 2018).

5.2.2 Difração de Raios-X (DRX)

A Figura 13 apresenta os difratogramas das CB's produzidas. Todos os difratogramas apresentam os três picos claros de cristalinidade em, aproximadamente, 16°, 19° e 21°, estando associados, respectivamente, aos planos cristalográficos (101), (10T) e (002), característicos de celulose tipo I (MARTINS, 2016). Isso era de se esperar, uma vez que celulose tipo I é comumente produzido por bactérias.

Figura 13 – Difratomogramas de raios X de cada CB produzida em cultivo agitado (A) e estático (E) pelas cepas ATCC 53582 (CB1), ATCC 23769 (CB2) e ATCC 700178 (CB3) (E).



Fonte: elaborado pelo autor.

Os índices de cristalinidade (IC) das amostras são apresentados na Tabela 5

Tabela 5- Índice de cristalinidade e resultado de teste de Tukey de amostras de CB produzidas em cultivo agitado (A) e estático (E).

Bactéria produtora	Cultivo	Índice de Cristalinidade (%)	Tukey (Grupo)
<i>K. xylinus</i>	A	84,2 ± 0,4	1
ATCC 53582	E	89,8 ± 0,8	2, 3
<i>K. hansenii</i>	A	85,6 ± 0,6	1, 2
ATCC 23769	E	83,9 ± 2,2	1
<i>K. xylinus</i>	A	90,6 ± 0,7	3
ATCC 700178	E	89,3 ± 0,5	2, 3

Fonte: elaborado pelo autor.

Os valores de erro obtidos indicam que o algarismo duvidoso se encontra na casa dos décimos de porcentagem. No entanto, erro associado a cada valor médio se refere a medidas em uma única amostra do material. Portanto, para discussões mais gerais, convém considerar o algarismo duvidoso como na casa de unidades de porcentagem, conforme

costuma ser apresentado na literatura (FEITOSA, 2019; CAMPANO, 2015). Para discussão apropriada do teste de Tukey, optou-se por representar as medidas de erro e os algarismos de décimos de porcentagem.

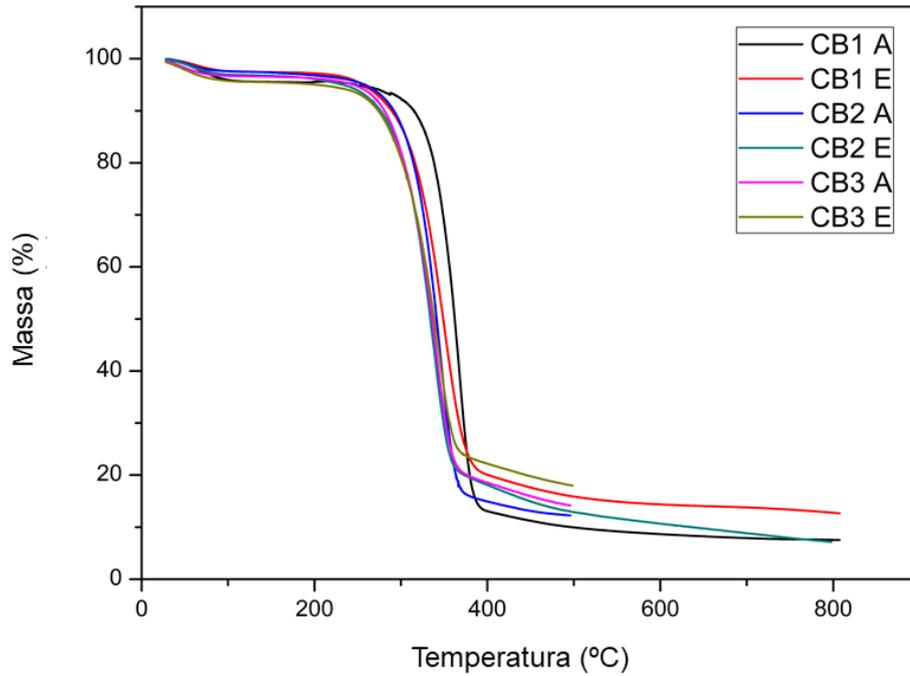
Comparando-se com os valores da celulose de origem lignocelulósica, que varia de 52 a 82% (FEITOSA, 2019), os IC encontrados para CB foram superiores (84 a 90%). Considerando os possíveis erros, esses valores encontram-se dentro dos valores esperados para CB (CAMPANO, 2015). Essa característica provê a CB maior resistência mecânica.

A cepa que apresentou clara distinção de índice de cristalinidade de acordo com a forma de cultivo foi a *K. xylinus* ATCC 53582. Para essa cepa, há um aumento do índice de cristalinidade em cultivo estático, o que está de acordo com a literatura (SINGHSA; NARAIN; MANUSPIYA, 2018). Para as demais cepas, no entanto, não houve diferença estatisticamente decorrente da agitação do meio. A variedade de microrganismo, no entanto, apresentou diferença significativa: a *K. xylinus* 700178 apresentou cristalinidade elevada semelhante a *K. xylinus* ATCC 53582 em cultivo estático; enquanto a *K. hansenii* apresentou índice de cristalinidade inferior, semelhante a *K. xylinus* ATCC 53582 em cultivo agitado.

5.2.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

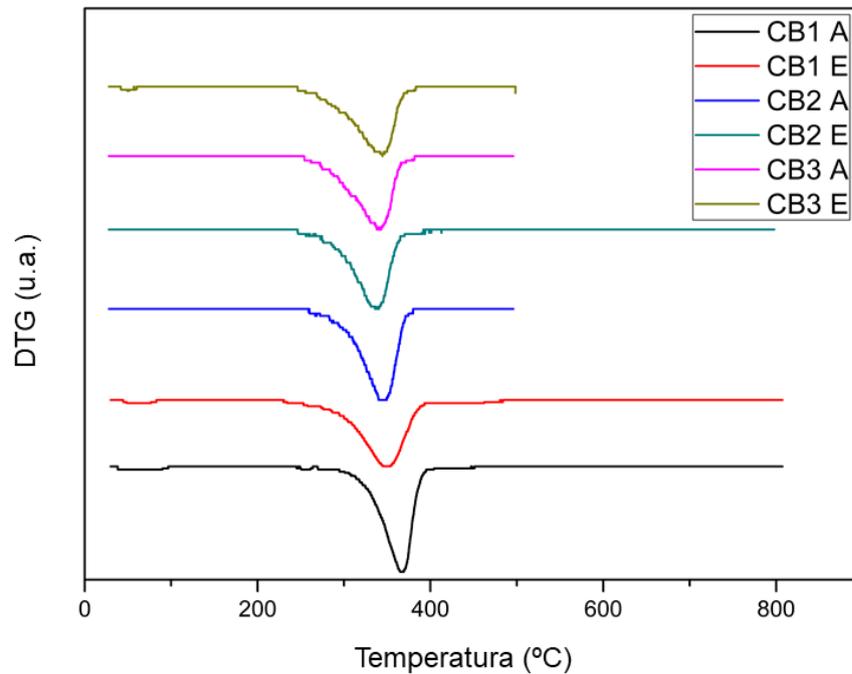
As curvas termogravimétricas (TGA e DTG) das amostras de CB são exibidas nas figuras 14 e 15, respectivamente. Foram observados eventos referentes à perda de água adsorvida (até 100 °C) e à degradação das cadeias de celulose. A ausência de outros eventos não relacionados à celulose indica uma purificação efetiva do material. A literatura aponta eventos entre 150 e 250 °C como referentes a proteínas residuais do micro-organismo e do meio de cultura utilizados no processo fermentativo (TURECK, 2017; CARNEIRO, 2015; GEA et al., 2011). A ausência de eventos nessa faixa reforça a afirmativa de que a remoção de impurezas foi eficiente.

Figura 14 – Curvas termogravimétricas obtidas para cada CB produzida em cultivo agitado (A) e estático (E) pelas cepas ATCC 53582 (CB1), ATCC 23769 (CB2) e ATCC 700178 (CB3) (E).



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 15 – Curvas termogravimétricas derivadas (DTG).



Fonte: elaborado pelo autor.

A Tabela 6 apresenta os valores de temperaturas iniciais e máximas de degradação, assim como o percentual de perda de massa para cada CB obtida. Todo o material produzido apresenta resistência a altas temperaturas (até ~230 °C) e comportamentos térmicos semelhantes. A CB que apresentou maior temperatura inicial de degradação foi a produzida pela *K. xylinus* ATCC 53582 em cultivo agitado, 269 °C, enquanto que a com menor foi sintetizada pela mesma cepa, mas em cultivo estático, ~230 °C. Essa diferença indica que a cepa utilizada para a produção de CB pode não ser fator determinante para a resistência térmica do material. Por outro lado, nota-se uma tendência quanto a forma de cultivo: a temperatura inicial de degradação para cultivo agitado tende a ser maior que para cultivo estático, o que indica uma maior estabilidade térmica. De forma semelhante, a faixa de temperatura em que ocorre o evento de degradação (diferença entre a temperatura final e a inicial) se mostrou menor no cultivo agitado.

Tabela 6 – Temperaturas iniciais e máximas do evento de degradação da celulose e perda de massa para cada CB provinda de cultivo agitado (A) e estático (E).

Bactéria produtora	Temperatura Inicial de Degradação (°C)	Temperatura com Máximo de Degradação (°C)	Temperatura Final de Degradação (°C)	Perda de Massa por Degradação (%)
CB1 A	269	367	449	83,0
CB1 E	230	350	484	80,4
CB2 A	259	345	380	79,0
CB2 E	245	338	401	81,1
CB3 A	250	341	381	75,1
CB3 E	244	345	383	70,5

Fonte: elaborado pelo autor.

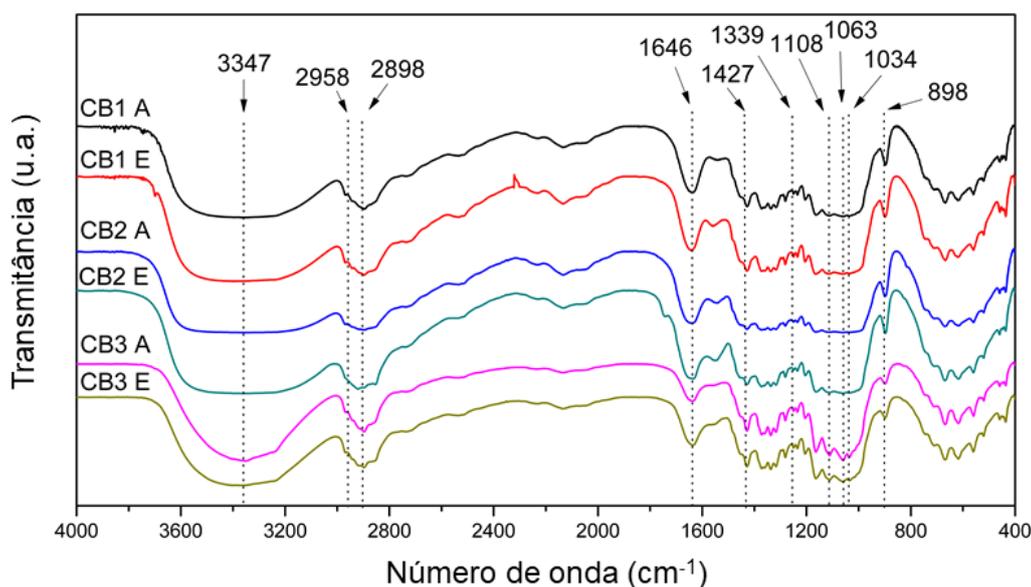
Os valores de temperatura de máximo de degradação e de perda de massa por degradação são semelhantes e não apresentam tendência evidente. A semelhança entre esses valores destaca a pouca variedade de resistência a altas temperaturas entre as CB's. O mesmo pode-se afirmar das perdas de massa por degradação da celulose, que se mantiveram na faixa de 75 a 83 %. Exceção é a amostra CB3 E, que apresentou uma menor perda de massa por degradação, assim como o maior teor de cinzas de todas as amostras.

5.2.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Por ter a mesma estrutura, a CB apresenta espectro vibracional semelhante à celulose vegetal. Os espectros de FTIR para cada material produzido é apresentado na Figura 16.

A banda larga entre 3500 e 3300 cm^{-1} é relacionada ao estiramento dos grupos hidroxila; associa-se a banda em 2898 cm^{-1} e o ombro em 2958 cm^{-1} ao estiramento de CH e ao estiramento assimétrico de CH_2 dos grupos CHOH e CH_2OH . Múltiplos sinais são detectados entre 1430 e 1330 cm^{-1} , região associada a deformações angulares de ligações C-OH e CH. A banda por volta de 1108 cm^{-1} está associada à vibração C-C dos anéis do sacarídeo. Os sinais em 1063 e 1034 cm^{-1} , por sua vez, são associados às deformações C-OH e C-O de carboidratos. A presença desses sinais, típicos de celulose, indica uma síntese efetiva do material (TURECK, 2017; GEA et al., 2011).

Figura 16 – Espectros FTIR de cada CB produzida em cultivo agitado (A) e estático (E) pelas cepas ATCC 53582 (CB1), ATCC 23769 (CB2) e ATCC 700178 (CB3).



Fonte: elaborado pelo autor.

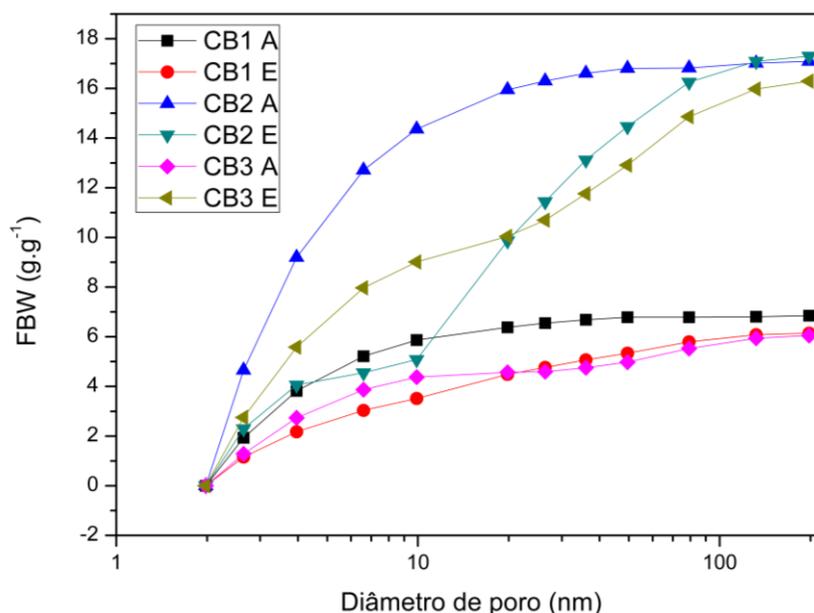
As bandas em 1636 cm^{-1} podem estar associadas ao estiramento da ligação O-H, provenientes de moléculas de água absorvidas, muito comum em CB nas regiões entre 1635 e 1650 cm^{-1} (GEA et al., 2011). Se esse for o caso, a alta intensidade da banda pode indicar uma alta umidade da amostra no instante das análises. Outra possibilidade é que o sinal esteja relacionado ao estiramento da ligação C=O de amidas provenientes das bactérias, talvez em

ácidos nucleicos. Essa hipótese é menos provável, pois os sinais típicos de C=O para moléculas livres fica entre 1700 e 1735 cm^{-1} enquanto que para amidas absorvidas fica próximo a 1538 cm^{-1} (GEA et al., 2011). Mesmo assim, a hipótese é reforçada pela presença de múltiplos sinais entre 1300 e 1150 cm^{-1} , região característica de estiramento de ligação C-N. Se há sinais de substâncias provenientes do meio de cultura ou de células, também deve haver outras impurezas das mesmas fontes. No caso de ácidos nucleicos, deveria haver sinais de estiramento de ligação P-OC entre 1100 e 1050 cm^{-1} . Sinais semelhantes seriam encontrados no caso de fosfolipídios, típicos de membrana celular (FULLER; ANDAYA; MCCLAY, 2018). No entanto, não é claro se esses sinais estão ausentes ou mascarados por vibrações da própria CB. Portanto, os dados obtidos por FTIR não são suficientes para atestar a eficácia do processo de purificação, sendo preciso avalia-los em conjunto com os resultados das demais análises. Os resultados de TGA e DTG elucidam aqueles obtidos por FTIR, indicando ausência de proteínas contaminantes e conseqüentemente uma efetiva purificação do material.

5.2.5 Termoporometria por calorimetria exploratória diferencial (TP-DSC)

A distribuição dos tamanhos de poros é apresentada na Figura 17.

Figura 17 – Distribuição de tamanho de poros de cada CB produzida em cultivo agitado (A) e estático (E) pelas cepas ATCC 53582 (CB1), ATCC 23769 (CB2) e ATCC 700178 (CB3). Os valores para FBW são acumulativos.



Fonte: elaborado pelo autor.

A unidade para FBW, $g.g^{-1}$, se refere a razão entre massa de FBW e massa de amostra seca. Devido aos cálculos envolvidos na TP-DSC, os resultados para água confinada congelável (FBW) são acumulativos. Ou seja, o valor apresentado para FBW em determinada medida se refere a todos os poros com diâmetro igual ou inferior ao indicado.

Encontrou-se uma função sigmoidal $f_{(d)}$ como a que melhor descreve a relação cumulativa da Figura 17, conforme Equação 11.

$$f_{(d)} = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{d}{D_0}\right)^B} \quad (11)$$

Onde A_1 , A_2 , B e D_0 são parâmetros encontrados para cada amostra.

Os dados referentes à regressão estão detalhados na Tabela 7. Eles foram obtidos pelo algoritmo de Levenberg–Marquardt (LEVENBERG, 1944; MARQUARDT, 1963) a partir da equação proposta.

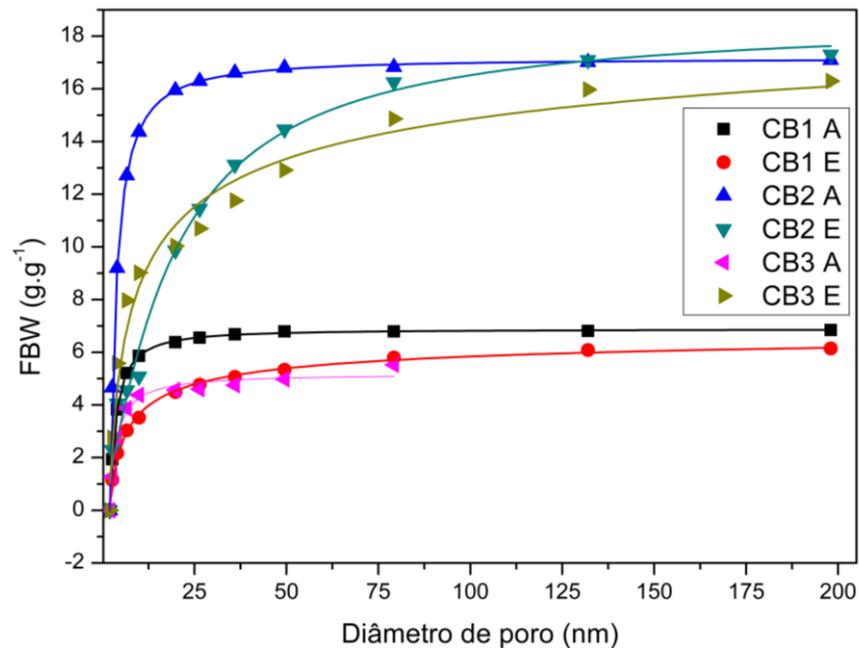
Tabela 7 – Regressão de tamanho de poros de cada CB produzida em cultivo agitado (A) e estático (E) pelas cepas ATCC 53582 (CB1), ATCC 23769 (CB2) e ATCC 700178 (CB3). Ajustes foram realizados para CB3 A*, conforme discussão abaixo.

Cepa	CB1 A	CB1 E	CB2 A
A₁	-111,49776	-35199,95636	-175,78787
A₂	6,87571	7,15203	17,16567
D₀	0,20056	3,77191 X 10 ⁻⁹	0,276
B	1,2165	0,42485	1,18098
R²_{ajustado}	0,99981	0,99519	0,99993
X²_v	9,84574 X 10 ⁻⁴	0,01945	0,00234
Resultado da regressão	Efetiva.	Efetiva.	Efetiva.
Cepa	CB2 E	CB3 A*	CB3 E
A₁	0,0992	-32837,78006	-4326,29179
A₂	18,60157	5,18554	22,18375
D₀	18,03433	5,30738 X 10 ⁻⁴	5,90107 X 10 ⁻⁹
B	1,20531	1,06403	0,27105
R²_{ajustado}	0,98258	0,98054	0,96971
X²_v	0,66708	0,06174	0,79252
Resultado da regressão	Efetiva.	Efetiva*.	Efetiva.

Fonte: elaborado pelo autor.

A Figura 18 ilustra a relação entre os dados experimentais e a Equação 11.

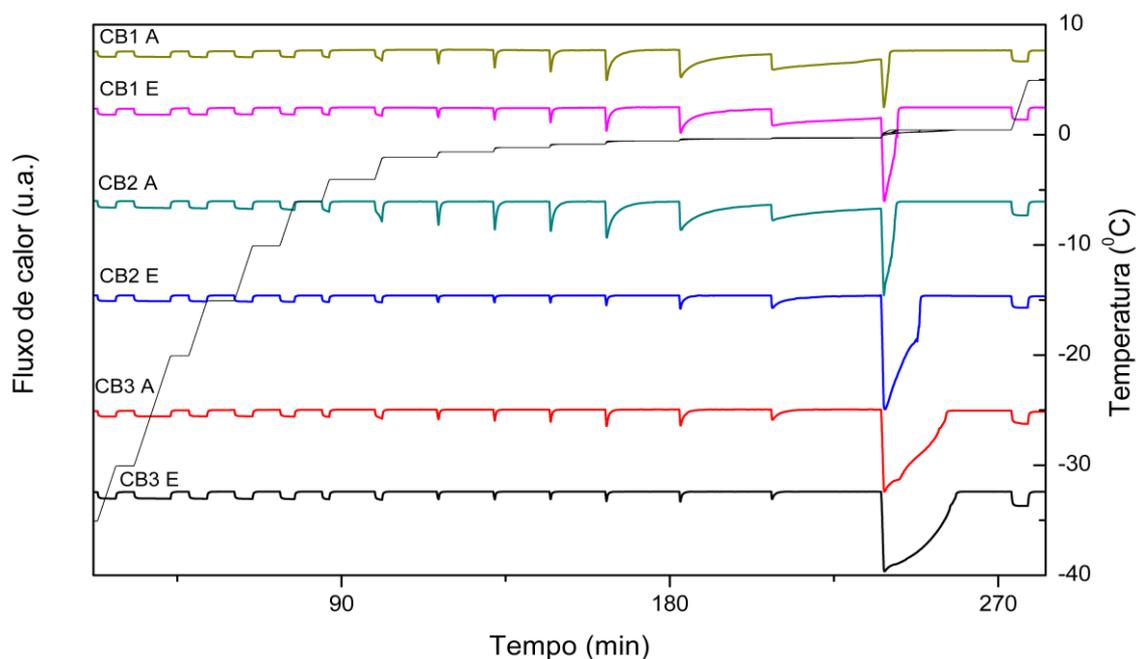
Figura 18 – Distribuição de tamanho de poros experimental e modelada de cada CB produzida em cultivo agitado e estático apresentada em símbolos. Os valores para FBW são acumulativos. Os resultados das regressões são representados em linhas de mesma cor.



Fonte: elaborado pelo autor.

Todas as regressões foram efetivas, com exceção daquela referente à da CB de *K. xylinus* ATCC 700178 em cultivo agitado, CB3 A. Isso pode ser explicado a partir de uma análise das curvas de fluxo de calor, conforme a Figura 19. Das curvas apresentadas, a referente à CB de *K. xylinus* ATCC 700178 em cultivo agitado se destaca. Nela, é possível observar que o equilíbrio térmico não foi alcançado após o evento endotérmico em ~208 min e antes de se iniciar outro em ~237 min. Isso pode ter causado erro nos cálculos que derivam dessa medida. Uma nova regressão (CB3 A*) foi realizada excluindo os valores provenientes desses cálculos. Situação semelhante foi encontrada durante a análise da CB da mesma cepa, mas em cultivo estático (CB3 E), mas nesse caso o erro não foi suficiente para invalidar a regressão.

Figura 19 – Termogramas de DSC para cada CB produzida em cultivo agitado (A) e estático (E) pelas cepas ATCC 53582 (CB1), ATCC 23769 (CB2) e ATCC 700178 (CB3).

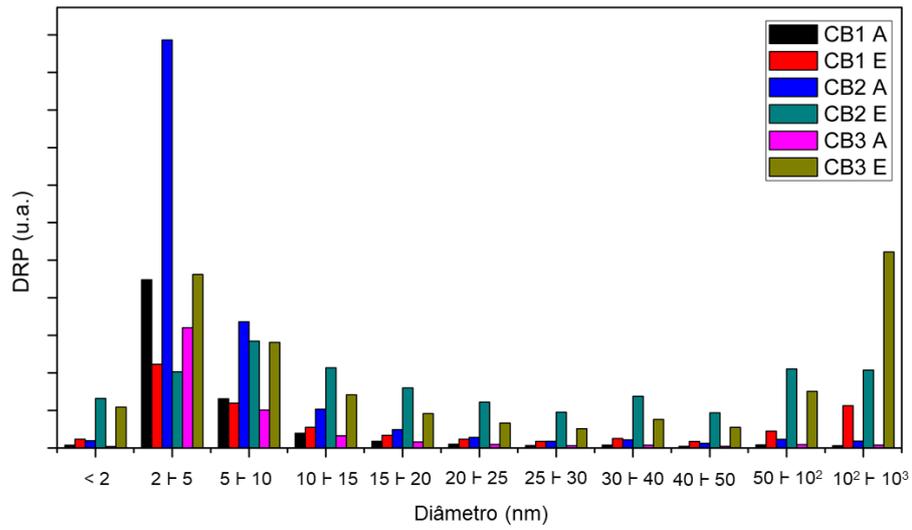


Fonte: elaborado pelo autor.

Uma melhor forma de apresentar os resultados da termoporometria seria por uma distribuição relativa de poros (DRP). A DRP apresenta a fração de poro para cada tamanho. Buscou-se uma DRP pela função derivada em relação ao diâmetro da Equação 11. No entanto, como a Equação 11 provém de uma regressão não linear, os possíveis erros associados a esse procedimento de obtenção de DRP tornam seus resultados não confiáveis. Optou-se, portanto, por apresentar os resultados em forma de gráfico de barra por faixas, conforme a Figura 20.

Os resultados indicam uma maior fração de poros nanométricos com menos de 10 nm para todas as variedades estudadas. Nessa faixa, destaca-se a maior porosidade da CB obtida pela *K. hansenii* ATCC 23769 em meio agitado. Orsolini (2017) encontrou resultados semelhantes para porometria por adsorção de nitrogênio de celulose nanofibrilada seca. Segundo a autora, isso se deve à distribuição polidispersa dos diâmetros das nanofibrilas. Para aplicações que exigem poros de maiores dimensões, pode-se destacar a CB produzida pela *K. xylinus* 700178 em cultivo estático. Nessas condições, obteve-se maior fração de poros com mais de 100 nm.

Figura 20 – DRP por faixa de diâmetro para cada CB produzida em cultivo agitado (A) e estático (E) pelas cepas ATCC 53582 (CB1), ATCC 23769 (CB2) e ATCC 700178 (CB3).



Fonte: elaborado pelo autor.

6 CONCLUSÕES

As características da celulose bacteriana estão diretamente relacionadas com as condições de cultivo, incluindo a cepa utilizada. Das variedades de micro-organismos utilizadas, a *K. xylinus* ATCC 53582 apresentou os melhores resultados de produção e rendimento, assim como uma maior sensibilidade a agitação do meio. Para estudos posteriores com as demais variedades, *K. hansenii* ATCC23769 e *K. xylinus* ATCC 700178, recomenda-se utilizar mais repetições da síntese, de modo a facilitar a visualização de possível diferença entre a produção em cultivo estático e agitado.

O material obtido no processo de fermentação apresentou características típicas de celulose bacteriana com purificação efetiva.

Notou-se uma possível relação entre as características térmicas e o modo de cultivo que merece estudo mais aprofundado.

Para o índice de cristalinidade calculado pelo método de Segal et al. (1959), não houve relação estatisticamente distinguível entre as cepas menos produtoras de acordo com a forma de cultivo. Hoje, sabe-se que esse método, apesar de bem aceito pela comunidade científica, tende a subestimar ou superestimar os IC (FEITOSA, 2019). Assim, para estudos posteriores, recomenda-se o uso do método de módulo de ajuste de pico (*Peak Fitting Module*). No entanto, os resultados apontam que cristalinidade semelhante aos obtidos para *K. xylinus* ATCC 53582 variando somente a cepa escolhida, independente da agitação delas: *X. xylinus* ATCC 700178 para semelhança ao cultivo estático; *K. hansenii* para semelhança ao cultivo agitado.

Os materiais produzidos apresentaram distribuição polidispersa de poros, predominantemente com menos de 10 nm de diâmetro, independente das condições de cultivo estudadas.

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que a escolha do método e cepa escolhidos para um processo de CB não deve ser feita somente visando a produção massiva. Características como índice de cristalinidade, fundamental para a resistência mecânica, e as características morfológicas, dependem das condições escolhidas.

REFERÊNCIAS

AUGIMERI, Richard V.; STRAP, Janice L. The Phytohormone Ethylene Enhances Cellulose Production, Regulates CRP/FNRKx Transcription and Causes Differential Gene Expression within the Bacterial Cellulose Synthesis Operon of *Komagataeibacter* (*Gluconacetobacter*) *xylinus* ATCC 53582. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 6, p.1-15, 22 dez. 2015.

AZEREDO, Henriette M. C. et al. Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. **Frontiers In Sustainable Food Systems**, [s.l.], v. 3, p.1-14, 18 fev. 2019.

BADSHAH, Munair et al. Surface modification and evaluation of bacterial cellulose for drug delivery. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 113, p.526-533, jul. 2018.

BARROS, Matheus de Oliveira. **Avaliação do permeado de caju como meio de cultivo para a produção de celulose bacteriana**. 2016. 42 f. Monografia - Curso de Tecnologia em Processos Químicos, Instituto Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

BASU, Anindya; VADANAN, Sundaravadanam Vishnu; LIM, Sierin. Rational design of a scalable bioprocess platform for bacterial cellulose production. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 207, p.684-693, mar. 2019.

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

CAMPANO, Cristina et al. Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review. **Cellulose**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.57-91, 18 nov. 2015. Springer Nature.

CHEN, Genqiang et al. Performance of nanocellulose-producing bacterial strains in static and agitated cultures with different starting pH. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 215, p.280-288, jul. 2019.

COLVIN, J. Ross; LEPPARD, Gary G. The biosynthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum* and *Acetobacter acetigenus*. **Canadian journal of microbiology**, v. 23, n. 6, p. 701-709, 1977.

DEMUNER, Iara Fontes. **Produção e caracterização de lignocelulose nonofibrilada (LCNF) e celulose nanofibrilada (CNF) e aplicação de LCNF na fabricação de papéis de embalagem nanoestruturados**. 2017. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciência Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

DRIEMEIER, Carlos; MENDES, Fernanda M.; OLIVEIRA, Marcelo M.. Dynamic vapor sorption and thermoporometry to probe water in celluloses. **Cellulose**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.1051-1063, 25 maio 2012.

FANG, Lin; CATCHMARK, Jeffrey M. Characterization of cellulose and other exopolysaccharides produced from *Gluconacetobacter* strains. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 115, p.663-669, jan. 2015.

FULLER, Mark E.; ANDAYA, Christina; MCCLAY, Kevin. Evaluation of ATR-FTIR for analysis of bacterial cellulose impurities. **Journal Of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 144, p.145-151, jan. 2018

GAO, Minghong et al. A natural in situ fabrication method of functional bacterial cellulose using a microorganism. **Nature Communications**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.1-10, 25 jan. 2019.

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

GUPTA, Praveen Kumar et al. An Update on Overview of Cellulose, Its Structure and Applications. **Cellulose [working Title]**, [s.l.], p.1-21, 13 maio 2019.

HERNÁNDEZ-ARRIAGA, Ana M. et al. Genome sequence and characterization of the bcs clusters for the production of nanocellulose from the low pH resistant strain *Komagataeibacter medellinensis* ID13488. **Microbial Biotechnology**, [s.l.], p.1-13, 22 fev. 2019.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*, v. 58, n. 2, p. 345, 1954.

HIRAI, Asako; TSUJI, Masaki; HORII, Fumitaka. TEM study of band-like cellulose assemblies produced by *Acetobacter xylinum* at 4 °C. *Cellulose*, [s.l.], v. 9, n. 2, p.105-113, 2002.

HÖHNE, Günther; HEMMINGER, Wolfgang F.; FLAMMERSHEIM, H.-J. **Differential scanning calorimetry**. Springer Science & Business Media, 2013.

KUMAR, Vinod et al. Efficient and economic process for the production of bacterial cellulose from isolated strain of *Acetobacter pasteurianus* of RSV-4 bacterium. *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 275, p.430-433, mar. 2019.

LAMPUGNANI, Edwin R. et al. Cellulose Synthesis – Central Components and Their Evolutionary Relationships. *Trends In Plant Science*, [s.l.], v. 24, n. 5, p.402-412, maio 2019.

LAVOINE, Nathalie et al. Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydrate Polymers*, [s.l.], v. 90, n. 2, p.735-764, out. 2012.

LEVENBERG, Kenneth. A method for the solution of certain non-linear problems in least squares. *Quarterly of applied mathematics*, v. 2, n. 2, p. 164-168, 1944.

LIN, Shin-ping et al. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. *Cellulose*, [s.l.], v. 20, n. 5, p.2191-2219, 2013.

MARQUARDT, Donald W. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *Journal of the society for Industrial and Applied Mathematics*, v. 11, n. 2, p. 431-441, 1963.

MARTINS, Douglas Ferreira. **Estudo da influência da hidrólise ácida da celulose extraída do capim Mombaça na produção de nanocristais de celulose com diferentes estruturas polimórficas**. 2016. 135 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/18124/1/EstudoInfluenciaHidrolise.pdf>>. Acesso em: 04 maio 2019.

MC SURGICAL (Campo Largo). Curativo Membracel Membrana Regeneradora Porosa – Vuelo Pharma. 2019. Disponível em: <<http://mcsurgical.com.br/curativo-membracel-membrana-regeneradora-porosa-vuelo-pharma/>>. Acesso em: 01 maio 2019.

MOURA, Consultor Jose M. de; SOUZA, Thiago Mattos de; LOURENÇO, Gabriel Zorthea, VILLEGAS, Teresa Aparicio; PINZÓN, Fernando Moreno. **Análise da eficiência e energética em segmentos industriais selecionados: segmento celulose e papel**. Brasil, 2018.

NOMENA, Emma M.; VELIKOV, Krassimir P. Drying of pickering emulsions in a viscoelastic network of cellulose microfibrils. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s.l.], v. 568, p.271-276, maio 2019.

OLIVEIRA, Marcelo Miranda de. **Análise da porosidade nanométrica de materiais lignocelulósicos derivados de bagaço de cana-de-açúcar submetidos à compressão úmida**. 2014. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

ORSOLINI, Paola. **Porous nanofibrillated cellulose functional materials**. 2017. Tese de Doutorado. ETH Zurich.

REBELO, Ana R. et al. Dehydration of bacterial cellulose and the water content effects on its viscoelastic and electrochemical properties. **Science And Technology Of Advanced Materials**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.203-211, 9 mar. 2018.

ROJO, Ester et al. Comprehensive elucidation of the effect of residual lignin on the physical, barrier, mechanical and surface properties of nanocellulose films. **Green Chemistry**, [s.l.], v.

17, n. 3, p.1853-1866, 2015.

SILVA, Renata de Araújo e. **Avaliação de ciclo de vida da produção de celulose bacteriana em diferentes meios de cultivo.** 2019. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2018.

SILVA, Sarah Maria Frota. **Filmes compósitos de celulose bacteriana e goma de cajueiro para aplicação em alimentos.** 2018. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

SEGAL, L. et al. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. **Textile Research Journal**, [s.l.], v. 29, n. 10, p.786-794, out. 1959.

SHI, Zhijun et al. Utilization of bacterial cellulose in food. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 35, p.539-545, mar. 2014. Elsevier BV.

SOUZA, Samara S. de et al. Nanocellulose biosynthesis by *Komagataeibacter hansenii* in a defined minimal culture medium. **Cellulose**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.1641-1655, 8 dez. 2018.

STUMPF, Taisa Regina et al. In situ and ex situ modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 82, p.372-383, jan. 2018.

SUN, Dong-ping et al. Novel Nitrocellulose Made from Bacterial Cellulose. **Journal Of Energetic Materials**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.85-97, 6 abr. 2010.

TUKEY, John Wilder; CLEVELAND, William S. **The collected works of John W. Tukey.** Taylor & Francis, 1984.

TURECK, Biassander Camila. **Efeito do meio de cultivo e do tratamento de purificação nas propriedades térmicas e químicas da celulose.** 2017. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2017.

UI-ISLAM, Mazhar Ul et al. Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 102, p.1166-1173, set. 2017.

ULLAH, Muhammad Wajid et al. Innovative production of bio-cellulose using a cell-free system derived from a single cell line. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 132, p.286-294, nov. 2015.

VAN ZYL, Elizabeth M; COBURN, Jeannine M. Hierarchical structure of bacterial-derived cellulose and its impact on biomedical applications. **Current Opinion In Chemical Engineering**, [s.l.], v. 24, p.122-130, jun. 2019.

WANG, Baoxiu et al. Use of heparinized bacterial cellulose based scaffold for improving angiogenesis in tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 181, p.948-956, fev. 2018.

WANG, Jing; TAVAKOLI, Javad; TANG, Youhong. Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 219, p.63-76, set. 2019.

YAMADA, Yuzo et al. Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). **The Journal of general and applied microbiology**, v. 58, n. 5, p. 397-404, 2012.

YE, Shan et al. Flexible Amoxicillin-Grafted Bacterial Cellulose Sponges for Wound Dressing: In Vitro and in Vivo Evaluation. **Acs Applied Materials & Interfaces**, [s.l.], v. 10, n. 6, p.5862-5870, fev. 2018.

YU, Hann-chin et al. Silymarin Inhibits Cervical Cancer Cell Through an Increase of Phosphatase and Tensin Homolog. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 26, n. 5, p.709-715, 20 out. 2011.

ZMEJKOSKI, Danica et al. Bacterial cellulose-lignin composite hydrogel as a promising

agent in chronic wound healing. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 118, p.494-503, out. 2018.