



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

HELDER LEVI SILVA LIMA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO LÍQUIDO DE SISAL E DO SUCO DE CAJU
PARA A PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA

FORTALEZA

2014

HELDER LEVI SILVA LIMA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO LÍQUIDO DE SISAL E DO SUCO DE CAJU
PARA A PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos.

Orientador: Dra. Morsyleide de Freitas Rosa

Co-orientador: Dra. Ana Iraidy Santa Brígida

FORTALEZA

2014

HELDER LEVI SILVA LIMA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO LÍQUIDO DE SISAL E DO SUCO DE CAJU
PARA A PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

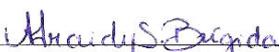
Área de concentração: Processos químicos e bioquímicos.

Aprovada em: 25 / 02 / 2014.

BANCA EXAMINADORA



Dra. Morsyleide de Freitas Rosa (Orientadora)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)



Dra. Ana Iraidy Santa Brígida (Co-orientadora)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)



Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dr. Rodrigo Silveira Vieira
Universidade Estadual do Ceará (UFC)



Dra. Leda Maria Fortes Gottschalk
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

A toda minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Tive a gloriosa oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas nesses dois anos de mestrado. Gostaria de destacar seis pessoas iluminadas aos quais tenho carinho especial e sou extremamente agradecido. Agradeço à minha orientadora, Dr. Morsyleide Rosa, pela disposição em me receber, pela compreensão, dedicação, ajuda e orientação em todos os momentos necessários. Agradeço a Dr. Ana Iraidy por todo suporte, disposição, ensino e direcionamento, sempre me incentivando a pensar. Agradeço a Dra. Maria de Fátima Borges pelos conselhos, apoio e dicas na escrita. Agradeço a Dr. Fábila pela ajuda diversa em muitas atividades no laboratório e pelo repasse de conhecimento. Agradeço à minha companheira de trabalho Elígenes pela paciência nos trabalhos diários. Agradeço à Lilian por toda prontidão e disposição em ajudar em todos os detalhes necessários. É claro que não encontro palavras adequadas para agradecer a todas vocês. Obrigado por toda prontidão, por cada conversa e cada momento. Pude aprender muitas coisas importantes e sem o apoio de vocês não teria conseguido concluir ou realizar adequadamente o trabalho.

Agradeço aos colegas e amigos do Laboratório de Valorização da Biomassa e do Laboratório de Microbiologia de Alimentos que não são menos importantes e foram contribuintes diretos para o desenvolvimento do trabalho. Destaco especialmente o João Paulo, Edna, Ana Cassales, Eden, Diego, Dr. Paulo Henrique, André, Dr. Men de Sá, Vitória, Régia, Bruna, Nágila Freitas, Mabel Ribeiro, e todos os demais que de alguma forma se dispuseram a me ajudar em diversos momentos. Agradeço também à Dra. Celli Muniz, Natália Moura, Adna, Afrânio, Renata Débora e George Harissom, Ídila e Caroline Gondim pelo auxílio diverso.

Agradeço à Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves e ao Dr. Rodrigo Silveira Vieira por aceitarem prontamente o convite de fazerem parte da qualificação. Agradeço à Dra. Luciana Rocha Barros, Dr. Rodrigo Silveira Vieira e à Dra. Leda Maria Fortes Gottschalk por aceitarem prontamente o convite para fazer parte da banca de defesa.

Agradeço a Embrapa Agroindústria Tropical que em parceria com o Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, possibilitou a realização dos experimentos.

Agradeço ao ex-coordenador do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, Fabiano e à coordenadora Diana, pela orientação nos assuntos burocráticos.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

Por fim agradeço a toda minha família em especial a minha Mãe Ana Cláudia por me deixar caminhar sozinho, assumindo as responsabilidades das minhas escolhas e estando sempre presente da forma como achou mais conveniente.

“A vida pode nos tornar rudes. O medo de sermos ridículos pode nos fazer ridiculamente secos, rijos como as árvores, que não vivem propriamente, apenas permanecem. Eu não quero permanecer, comemorando ser inerte ao tempo e à intempérie, quero viver, quero me ferir – que seja; assim saberei que não sou árvore”

(Maik Wanderson)

RESUMO

A celulose bacteriana (CB) desperta grande interesse por parte dos pesquisadores por apresentar estrutura nanométrica, alto índice de cristalinidade, alta porosidade, biocompatibilidade e elevado potencial tecnológico. Diversas fontes de carbono alternativas têm sido estudadas para a produção de CB obtendo-se resultados satisfatórios quando compara-se com métodos tradicionais que utilizam meio sintéticos. O objetivo do presente trabalho consistiu em avaliar a produção de CB utilizando fontes agroindustriais (líquido de sisal e suco de caju) como substrato, no cultivo de *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 sob condições estáticas. Para tal, avaliou-se o efeito da concentração de açúcares, pH e suplementação do meio com fontes de nitrogênio na produção de CB. Avaliou-se também a eficiência da purificação e o grau de cristalinidade da CB obtida. A maior produção de CB foi obtida após cultivo da bactéria por 10 dias utilizando meio obtido através da diluição do líquido de sisal para 15 g/L de açúcares, com ajuste de pH em 5 e suplementação do meio com 7,5 g/L de extrato de levedura. Para o suco de caju a maior produção obtida foi de 0,34 g/L, após 5 dias de cultivo e com meio ajustado para 50 g/L de açúcares. Quanto às caracterizações térmicas (TGA e DSC), Raio X e FTIR, a CB obtida a partir do líquido do sisal apresenta perfis semelhantes à CB obtida em meio padrão. Conclui-se que o líquido do sisal é o substrato mais promissor para a produção de CB.

Palavras-chave: Celulose bacteriana, Líquido de sisal, Suco de caju, *Gluconacetobacter hansenii*, Nanotecnologia, Agronegócio.

ABSTRACT

Bacterial cellulose (BC) is an interesting biomaterial for researchers because it presents structure in nanoscale dimensions, high crystallinity degree, high porosity, biocompatibility, and high technological potential. Alternative carbon sources have been studied to replace traditional synthetic medium as a substrate for BC production, achieving satisfactory results. The aim of this work was to evaluate BC production using agro-industrial sources (sisal juice and cashew apple juice) as substrates in *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 cultivation under static conditions. The effects of sugars concentration, pH, and nitrogen sources supplementation were evaluated on the BC yield production. The efficiency of the BC purification process and the crystallinity degree of BC were also evaluated. The higher yield of BC was obtained after 10 days of cultivation in the medium based on sisal juice with the following parameters: 15 g/L of sugars, pH 5, and nitrogen supplementation with 7.5 g/L of yeast extract. When use cashew apple juice, the higher yield of BC was obtained after 5 days of cultivation in the medium with 50 g/L of sugars. The BC from the sisal juice medium presented similar TG, DSC, XRD, and FTIR characteristics to the BC from the standard medium. Thus, the sisal juice is a suitable substrate for BC production.

Keywords: Bacterial cellulose, Sisal juice, Cashew apple juice, *Gluconacetobacter hansenii*, Nanotechnology, Agribusiness.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estruturas químicas de: (a) β -Glicose (b) Celobiose (c) Esquema das pontes de hidrogênio entre as cadeias	18
Figura 2 – Diferentes formas de apresentações de celulose bacteriana: (a) Mãe do vinagre (b) Nata de coco	20
Figura 3 – Modelo hipotético das vias metabólicas envolvidas na biossíntese de CB	25
Figura 4 – Proporção dos produtos da cadeia produtiva do sisal	31
Figura 5 – Etapas da obtenção do líquido de sisal: (a, b) prensa hidráulica móvel (c,d) coleta do líquido de sisal (e,f) resíduo sólido	32
Figura 6 – Proporção dos produtos da cadeia produtiva do caju	33
Figura 7 – Recipientes utilizados para o cultivo estático de <i>G. hansenii</i> ATCC 23769: (a) flaca de Petri de 14,5 cm de diâmetro (área superficial de 165 cm ²) (b) frasco tipo Schott de 250 mL (área superficial de 28 cm ²)	36
Figura 8 – Determinação da espessura da película de CB em micrômetro	40
Figura 9 – Efeito da concentração de açúcar na produção de CB por <i>G. hansenii</i> ATCC 23769 utilizando líquido de sisal como fonte alternativa de carbono	44
Figura 10 – Efeito da concentração de açúcar na produção de CB por <i>G. hansenii</i> ATCC 23769 utilizando suco de caju como fonte alternativa de carbono	44
Figura 11 – Películas de CB obtidas no presente trabalho: (a)(b)(c) suco de caju (d)(e)(f) líquido de sisal (g)(h)(i) meio HS (a)(d)(g) película na superfície do meio após 5 dias de cultivo (b)(e)(h) película sendo removida (c)(f)(i) película purificada em estado úmido	45
Figura 12 – Efeito do pH inicial de fermentação na produção de CB por <i>G. hansenii</i> ATCC 23769 utilizando líquido de sisal como fonte alternativa de carbono ..	49
Figura 13 – Produção de CB e consumo de açúcares nos meios M SISAL, HS e HS MOD por <i>G. hansenii</i> ATCC 23769 acompanhada durante 22 dias de cultivo	48
Figura 14 – Variação de pH nos meios M SISAL, HS e HS MOD por <i>G. hansenii</i> ATCC 23769 acompanhada durante 22 dias de cultivo	53
Figura 15 – Rendimento nos meios M SISAL, HS e HS MOD por <i>G. hansenii</i> ATCC 23769 acompanhada durante 22 dias de cultivo	55

Figura 16 –	Influência da relação volume/área na produção de CB em g/L, g/m ² e na espessura da película em meio M SISAL por <i>G. hansenii</i> ATCC 23769	56
Figura 17 –	Variação da espessura da película de CB em meio M SISAL por <i>G. hansenii</i> ATCC 23769: (a) 0,6 mL/cm ² (b) 1,2 mL/cm ² (c) 1,8 mL/cm ² (d) 2,4 mL/cm ² (e) 3,0 mL/cm ² (f) 3,6 mL/cm ²	57
Figura 18 –	Análise termogravimétrica (ATG) da CB obtida nos meios HS e M SISAL por <i>G. hansenii</i> ATCC 23769	59
Figura 19 –	DTG da CB obtida nos meios HS e M SISAL por <i>G. hansenii</i> ATCC 23769	59
Figura 20 –	Curvas de DSC da CB obtida nos meios HS e M SISAL por <i>G. hansenii</i> ATCC 23769	61
Figura 21 –	Raio X da CB obtida nos meios HS e M SISAL por <i>G. hansenii</i> ATCC 23769	62
Figura 22 –	Espectros de FTIR da CB obtida em meio HS e M SISAL por <i>G. hansenii</i> ATCC 23769	64
Figura 23 –	Micrografias da CB em diferentes aumentos : (a,b,c) CB M SISAL (d,e,f) CB HS (a,b) 2000x (c,d) 5000x (e,f) 10000x	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Propriedades da celulose bacteriana e vegetal	21
Tabela 2 –	Índice de cristalinidade da celulose bacteriana e vegetal	22
Tabela 3 –	Produção de CB em diferentes condições e micro-organismos	29
Tabela 4 –	Níveis codificados das variáveis do planejamento fatorial 2^2 para avaliação do efeito da suplementação de fonte de nitrogênio orgânica e inorgânica	38
Tabela 5 –	Composição dos meios de cultura utilizados no estudo do tempo de cultivo..	39
Tabela 6 –	Caracterização físico-química de líquido do sisal e suco de caju integral	42
Tabela 7 –	Dados comparativos da produção de CB por <i>G. hansenii</i> ATCC 23769 nos diferentes substratos	45
Tabela 8 –	Influência da suplementação do meio com fontes de nitrogênio na produção e no rendimento de CB por <i>G. hansenii</i> ATCC 23769 utilizando líquido de sisal como fonte alternativa de carbono. Planejamento experimental 2^2	50
Tabela 9 –	Efeitos estimados, desvio padrão e teste-t de Student calculados para o planejamento fatorial 2^2 tendo como resposta a produção de CB	51
Tabela 10 –	Efeitos estimados, desvio padrão e teste-t de Student calculados para o planejamento fatorial 2^2 tendo como resposta o rendimento	51
Tabela 11 –	Temperaturas e perdas de massas características da CB	60
Tabela 12 –	Bandas características para celulose bacteriana na análise de FTIR	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	Celulose: Características e fontes de obtenção	18
3.2	Celulose bacteriana (CB)	20
3.2.1	<i>Síntese</i>	24
3.2.2	<i>Variáveis de processo</i>	26
3.3	Fontes alternativas para produção de CB	28
3.3.1	<i>Líquido de Sisal</i>	30
3.3.1	<i>Suco de Caju</i>	33
4	METODOLOGIA	35
4.1	Obtenção e caracterização dos substratos	35
4.2	Produção de CB utilizando substratos alternativos	35
4.2.1	<i>Preparo dos meios e inóculo</i>	36
4.2.2	<i>Determinações analíticas</i>	37
4.2.3	<i>Purificação das películas de CB</i>	37
4.2.4	<i>Seleção do substrato alternativo</i>	37
4.2.5	<i>Efeito do pH inicial do meio na produção de CB</i>	38
4.2.6	<i>Efeito da suplementação do meio com fontes de nitrogênio na produção de CB</i>	38
4.2.7	<i>Efeito do tempo de cultivo na produção de CB</i>	38
4.2.8	<i>Efeito da relação volume/área na produção de CB</i>	39
4.3	Caracterização da película de CB	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Caracterização dos substratos	42
5.2	Seleção do substrato alternativo	43
5.3	Efeito do pH inicial do meio na produção de CB	48

5.4	Efeito da suplementação do meio com fontes de nitrogênio na produção de CB	49
5.5	Efeito do tempo de cultivo na produção de CB.....	52
5.6	Efeito da relação volume/área na produção de CB nas condições otimizadas	56
5.7	Caracterização da película de CB	58
5.7.1	<i>Umidade</i>	58
5.7.2	<i>Análise termo gravimétrica (ATG) e Calorimetria diferencial exploratória (DSC)</i>	58
5.7.3	<i>Difração de raios-X (DRX)</i>	62
5.7.4	<i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i>	63
5.7.5	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	65
6	CONCLUSÕES	67
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	68
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICE A	84
	APÊNDICE B	85
	APÊNDICE C	86
	APÊNDICE D	87

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o desenvolvimento de processos inseridos no âmbito do conceito de química verde para a produção e aplicação de materiais biodegradáveis tem sido visto como uma forma de aumentar a eficiência de processos convencionais e garantir a segurança para o meio ambiente. A celulose bacteriana (CB) é um dos materiais mais estudados devido a sua viabilidade e versatilidade.

Desde a sua descoberta e identificação em 1886, a CB tem despertado grande interesse por parte dos pesquisadores. A principal motivação advém do fato de se tratar de um material polimérico que apresenta propriedades e características especiais possibilitando aplicações diversas, dentre as quais o desenvolvimento de dispositivos médicos, compósitos resistentes e materiais biodegradáveis (YOSHINO *et al.*, 2013; YOUSEFI *et al.*, 2013).

A CB apresenta alta resistência mecânica, alto índice de cristalinidade, alta absorção de água e biocompatibilidade. Tais características possibilitam aplicações específicas desse material principalmente na área biomédica. A CB é obtida por processo fermentativo e quando em cultivo estático, apresenta-se sob a forma de uma película. A CB é obtida principalmente pelo cultivo de bactérias do gênero *Gluconacetobacter* em meio contendo açúcares e nitrogênio orgânico (CHAWLA *et al.*, 2009). O processo para a obtenção de CB é simples, apresentando diversas vantagens quando comparado ao processo de obtenção da celulose vegetal. A obtenção de CB ocorre em tempo reduzido frente ao tempo de síntese requerido para a celulose vegetal, ocorre sem uso de grandes extensões de terra, sem interferência climática e sem a geração de efluentes tóxicos decorrentes do processo de purificação. A purificação da CB é mais simples pois a mesma apresenta apenas açúcares, células microbianas ou outros metabolitos secundários como impurezas. A obtenção de celulose a partir da madeira se dá através da obtenção da polpa celulósica utilizando principalmente o método Kraft, onde a madeira é submetida a tratamento químico com uso de soda cáustica e sulfeto de sódio sob pressão. Tal processo visa a purificação da celulose pela remoção da lignina e hemicelulose, sendo um processo caro que gera muitos resíduos nocivos ao meio ambiente. Já a CB é obtida de forma pura, estando livre de lignina e hemicelulose, já que os micro-organismos não produzem estes compostos.

Atualmente, pesquisas envolvendo CB se concentram principalmente na avaliação de meios de cultura alternativos para a obtenção de CB e no desenvolvimento e aplicação de biomateriais a partir dos mesmos (FU *et al.*, 2013; KOWALSKA *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2014). Dentre as aplicações, destaca-se o desenvolvimento de pele e vasos sanguíneos artificiais, tratamento de queimaduras e feridas, componentes de implantes dentários, matriz para transferência de fármacos e vários tipos de implantes. Na área de alimentos a CB têm aplicação como agente emulsificante, dispersante, geleificante e substituto da gordura. Aplicações em outras áreas incluem desenvolvimento de compósitos pela inserção de diversos tipos de substâncias (hidroxiapatita, colágeno e quitosana) para a obtenção de materiais com propriedades específicas, fabricação de papéis especiais, esponjas, membranas de alto-falantes, meio de cultura para células animais, aerogéis e matriz para imobilização de proteínas e leveduras (DONINI *et al.*, 2010).

Diversos substratos alternativos têm sido estudados para a produção de CB como suco de frutas, melação de cana, caldo de cana, amido hidrolisado, água e leite de coco, xarope de açúcar, suco da casca de abacaxi, glicerol bruto, soro de queijo, palha de trigo, casca de arroz e melação de beterraba (ALMEIDA *et al.*, 2008; BAE; SHODA, 2004; CARREIRA *et al.* 2011; CASTRO *et al.*, 2011; CHAWLA *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2013; GOELZER *et al.*, 2009; HUNGUND *et al.*, 2013; KUROSUMI *et al.*, 2009; ZENG *et al.*, 2011). Em muitos casos, é possível alcançar uma produção semelhante ou superior quando se compara com processos que utilizam meios sintéticos.

No Nordeste, duas importantes culturas (sisal e caju) se destacam tanto pela importância econômica quanto pela quantidade de resíduos gerados em seu beneficiamento. Na obtenção da fibra de sisal, conhecida como uma das fibras duras mais importantes no mundo, gera-se uma grande quantidade de resíduo líquido que corresponde a aproximadamente 80% do peso total das folhas. O Brasil é, atualmente, o principal produtor de fibras de sisal no mundo e todo o resíduo gerado tem sido descartado no campo de produção (ANDRADE *et al.*, 2013). Na produção do caju, cujo principal produto de interesse é a castanha, há um desperdício de 90% de todo o pedúnculo gerado, que por sua vez representa 90% do peso total do caju (FONTES *et al.*, 2013). A produção de castanha no mundo em 2011 foi de 4 milhões de toneladas (AGÊNCIA, 2013; FAO, 2014).

A agregação de valor ao líquido de sisal e ao suco de caju pode ser feita através da obtenção de produtos biotecnológicos por via fermentativa já que tais resíduos são ricos em nutrientes. O uso de fontes alternativas de carbono em processos fermentativos é importante, pois possibilita a redução do impacto ambiental proveniente da disposição final dessas fontes, reduzem o custo final do produto/processo e agregam valor às cadeias produtivas envolvidas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar e otimizar a produção de celulose bacteriana por *G. hansenii* ATCC 23769 por fermentação submersa em cultivo estático utilizando resíduos agroindustriais como substrato.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de celulose bacteriana no líquido de sisal e suco de caju e selecionar o substrato mais promissor.
- Otimizar a produção de celulose bacteriana no substrato selecionado.
- Avaliar a estabilidade térmica, pureza, capacidade de absorção de água e dimensão das nanofibras da celulose bacteriana obtida nas condições otimizadas.

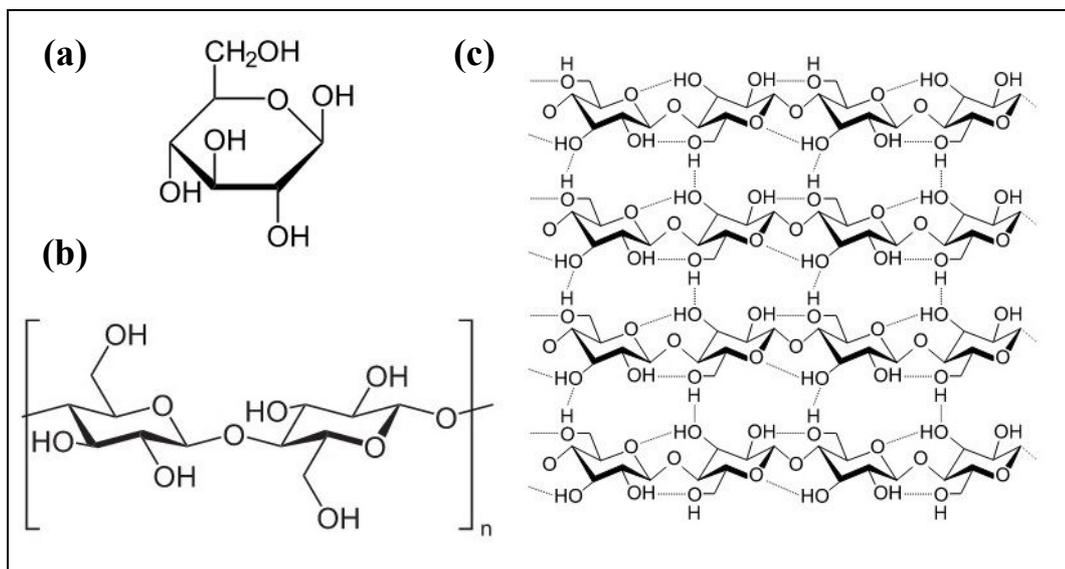
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Celulose: Características e fontes de obtenção

A celulose é o polímero orgânico existente em maior abundância na natureza, sendo encontrada predominantemente em vegetais. Estima-se que por ano sejam produzidas 10^{10} toneladas das quais 6×10^9 são processadas pela indústria de papel, têxtil e química (LAVOINE *et al.*, 2012). Segundo a associação Brasileira de celulose e papel, em 2011 foram produzidas 13,92 milhões de toneladas de celulose no Brasil colocando o mesmo na posição de 4º maior produtor no mundo (BRACELPA, 2013).

A celulose é um homopolissacarídeo formado por subunidades de β -D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4). Independente da fonte, as cadeias de celulose são formadas por unidades repetidas de celobiose com grau de polimerização que pode variar de 10.000 a 15.000 (DONINI *et al.*, 2010; LAVOINE *et al.*, 2012). As cadeias de celulose aparecem ligadas entre si através de pontes de hidrogênio inter e intra-moleculares formando estruturas cristalinas insolúveis em água. A estrutura química da glicose e celobiose e um esquema representativo das pontes de hidrogênio entre as cadeias de celulose são apresentados na Figura 1.

Figura 1 – Estruturas químicas de: (a) β -Glicose (b) Celobiose (c) Esquema das pontes de hidrogênio entre as cadeias



Fonte: Glicose (2013), Celobiose (2013), Ligações (2013)

Na natureza, a celulose pode ser encontrada em uma variedade de fontes, sendo a principal delas de origem vegetal. A celulose pode ser encontrada no algodão (*Gossypium hirsutum* L.), nas raízes, na madeira de diversas espécies de plantas, em folhas como é o caso do sisal (*Agave sisalana*), em frutos e sementes. Outras fontes de celulose menos expressivas incluem algumas espécies de invertebrados, animais marinhos (*Urochordata*) e fazendo parte da composição da parede celular de alguns gêneros de algas, fungos e bactérias (DAELE *et al.*, 1992; LAVOINE *et al.*, 2012; PIOTTO, 2003; SILVA *et al.*, 2009).

A celulose vegetal representa a principal fonte de celulose com finalidade industrial, sendo extraída principalmente da madeira do eucalipto (*Eucalyptus*) que pode apresentar até 45% de celulose em sua composição (PEREIRA *et al.*, 2000). A celulose é sintetizada na planta após polimerização da glicose obtida por processo fotossintético e faz parte da composição da parede celular vegetal estando naturalmente sob a forma de fibras lignocelulósicas (SILVA *et al.*, 2009).

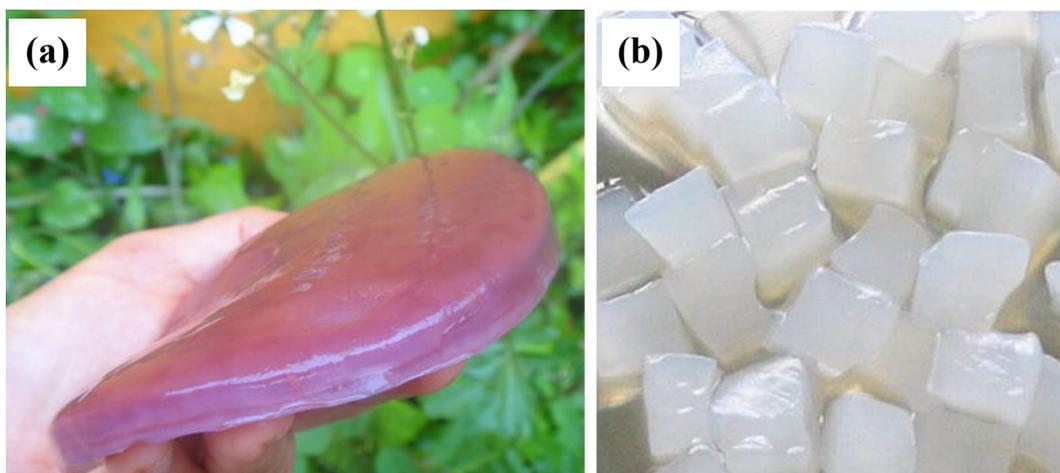
Atualmente para a obtenção da pasta celulósica, que consiste em um material constituído basicamente por celulose, é necessário que a madeira seja submetida a processos químicos que envolvem principalmente o uso de soda cáustica e sulfeto de sódio sob pressão (método Kraft). O processo visa a separação da celulose dos demais constituintes da fibra a saber lignina e hemicelulose que encontram-se ligadas através de interações químicas. Porém a remoção completa da lignina só acontece com o uso de uma etapa extra de branqueamento que envolve o uso de peróxido de hidrogênio e reagentes clorados (DAS, 2013; PIOTTO, 2003).

Em paralelo à forma convencional de obtenção da celulose, processos biotecnológicos de síntese enzimática e fermentativa possibilitam a produção de celulose como forma alternativa gerando estruturas celulósicas nanoestruturadas, o que difere da celulose vegetal (KOBAYASHI *et al.*, 2001; KOBAYASHI *et al.*, 1999; ROSS *et al.*, 1991). O processo fermentativo trás a vantagem de fornecer uma celulose livre de lignina e hemicelulose, além de possuir alta cristalinidade. Além disso, a celulose microbiana, em especial a bacteriana, destaca-se por apresentar características desejáveis para aplicações em diferentes áreas, impulsionando pesquisas principalmente na área biomédica (DONINI *et al.*, 2010; KLEMM *et al.* 2001; KOBAYASHI *et al.* 2001).

3.2 Celulose bacteriana (CB)

A CB foi inicialmente observada em 1886 em uma fermentação acética sob a forma de uma substância gelatinosa sobrenadante sendo identificada como celulose (BROWN, 1886). Porém a existência da CB foi observada em épocas mais antigas com denominações distintas. Um exemplo é a mãe do vinagre, que trata-se de uma espécie de pele espessa de ocorrência comum em fermentações acéticas. Outro exemplo é o produto denominado nata de coco que teve origem nas Filipinas sendo uma sobremesa muito consumida até hoje na região e em países próximos (Figura 2).

Figura 2 – Diferentes formas de apresentações de celulose bacteriana: (a) Mãe do vinagre (b) Nata de coco



Fonte: Mãe (2013); Nata (2013)

A CB é um produto microbiano extracelular produzido principalmente pela bactéria *G. hansenii*, classificado como um homopolissacarídeo quimicamente semelhante à celulose vegetal, sendo portanto insolúvel em água. Após sintetizada a CB se organiza sob a forma de uma estrutura composta por fibras de aproximadamente 70 nm de diâmetro (Tabela 1) (PECORARO *et al.*, 2008). Tal estrutura pode formar um filme ou uma estrutura granulada e gelatinosa dependendo das condições de cultivo do micro-organismo (Figura 3) (KLEMM *et al.*, 2001; SHODA; SUGANO, 2005; YOSHINAGA *et al.*, 1997). As aloformas de celulose denominadas tipo I e tipo II podem ser encontradas na CB sintetizada por *G. xylinus*. A celulose I, constituída por microfibrilas que se orientam de forma paralela e a celulose II, composta por microfibrilas que se orientam de forma antiparalela. Os cristais de celulose tipo

II são termicamente mais estáveis do que os da celulose tipo I (CORRÊA, 2010; DONINI *et al.*, 2010).

Além de biocompatível, não tóxica e não alergênica, a CB apresenta uma estrutura tridimensional e uma nano-morfologia não encontrada em celulose de plantas, que resulta em uma alta porosidade ($\cong 94\%$), baixa densidade, grande área superficial, permeabilidade seletiva e alta capacidade de absorção e retenção de água (até 200 vezes a sua massa seca) e alta resistência mecânica (BACKDAHL *et al.*, 2006; HELENIUS *et al.*, 2006; HONG; QIU, 2008; KESHK *et al.*, 2006; YAMANAKA *et al.*, 1989). Quando seca a CB apresenta alta hidrofiliabilidade superficial. Pecoraro e colaboradores (2008) comparam algumas propriedades da celulose vegetal e bacteriana (Tabela 1).

Tabela 1 – Propriedades da celulose bacteriana e vegetal

Propriedade	Celulose Vegetal	Celulose Bacteriana
Largura da fibra (nm)	40 - 140 x 10 ³	70 - 80
Índice de cristalinidade (%)	56 - 65	65 - 79
Grau de polimerização	13 - 14 x 10 ³	2 - 6 x 10 ³
Módulo de Young (Gpa)	5,5 - 12,6	15 - 30
Quantidade de água (%)*	60	98,5

Fonte: Pecoraro *et al.* (2008) * relacionada à absorção em estado úmido

As características estruturais e físicas da CB são bastante adequadas para o desenvolvimento de curativos e outros dispositivos médicos e são consideradas por muitos autores como superiores quando comparadas com a celulose vegetal, despertando portanto interesse para diversas aplicações biomédicas, impulsionando várias pesquisas na área. Dentre as características mais relevantes destaca-se o alto grau de cristalinidade da estrutura, que pode apresentar frações cristalinas na ordem de 90% (CHAWLA *et al.*, 2009). A alta cristalinidade relaciona-se com a característica de alta resistência mecânica comumente apresentada pelas películas de CB.

A composição do meio de cultura, a linhagem produtora, o tempo de cultivo e demais condições de cultivo podem influenciar no índice de cristalinidade (IC) da CB que varia de 50 a 95%, sendo mais freqüentes valores acima de 70% (Tabela 2). Já a celulose vegetal apresenta valores de IC de no máximo 72%.

Tabela 2 – Índice de cristalinidade da celulose bacteriana e vegetal

Tipo de celulose	IC (%)	Microrganismo	Meio	Autores
Bacteriana	56	<i>A. xylinum</i> ATCC 23769	HS	Goelzer <i>et al.</i> (2009)
	74	<i>G. medellensis</i>	HS	Castro <i>et al.</i> (2012)
	75,7 - 80,6	<i>G. xylinus</i>	HS	Sheykhnazari <i>et al.</i> (2011)
	82 - 86,7	<i>G. xylinus</i> ATCC 10245, IFO 13693, 13772, 13773,	HS	Keshk (2014)
	74 - 84	<i>G. sacchari</i>	HS**	Trovatii <i>et al.</i> (2011)
	80 - 90	<i>G. xylinus</i> ATCC 53524	HS**	Mikkelsen <i>et al.</i> (2009)
	78,3	<i>G. xylinus</i>	HS**	Sheykhnazari <i>et al.</i> (2011)
	62,8	<i>G. xylinus</i>	HS***	Sheykhnazari <i>et al.</i> (2011)
	50 - 95	<i>G. xylinus</i> ATCC 53524	Diversos	Ruka <i>et al.</i> (2012)
	55,6	<i>G. xylinus</i> ATCC 700178	Glicose (5%)	Wong <i>et al.</i> (2009)
Vegetal	65,7 - 72,2	*	*	Wong <i>et al.</i> (2009; 2012)
Micro cristalina	87,6 - 90,7			Wong <i>et al.</i> (2009; 2012)

*Não se aplica; **Substituição de glicose por outros açúcares; *** Teor de glicose ajustado para (15g/L)

O processo de obtenção de CB é relativamente simples quando comparado com a obtenção da celulose vegetal. Ocorre de forma rápida, sem uso de grandes extensões de terra, sem interferência climática e livre da produção de efluentes tóxicos durante o processo de purificação. A obtenção de celulose a partir da madeira é um processo caro e gera muitos resíduos nocivos ao meio ambiente. Além dos compostos tóxicos, a coloração e a carga orgânica dos efluentes gerados podem comprometer o desenvolvimento da biota aquática próxima à descarga. Processos alternativos para o branqueamento da celulose são inviáveis devido ao elevado custo e não reduzem suficientemente o impacto ambiental (BUNGAY, 1997; FONSECA *et al.*, 2003).

A estrutura composta pelas células microbianas, matéria orgânica e a celulose sintetizada é denominada zoogléa e após removida do meio fermentativo, pode ser submetida a tratamento alcalino e aquecimento para purificação. Tal processo de purificação é considerado simples e fácil de ser conduzido dando origem a uma forma de celulose com alto grau de pureza (GEA *et al.*, 2011; PECORARO *et al.*, 2008).

Várias pesquisas com foco em polissacarídeos microbianos como base para o desenvolvimento de biomateriais têm sido desenvolvidas. A CB é um dos principais materiais

estudados devido às suas características adequadas para aplicações biomédicas já mencionadas, além da capacidade de formar barreira contra infecções aliada a baixa atividade celulolítica por parte dos tecidos humanos (CZAJA *et al.*, 2006; HOENICH, 2006). Dentre as aplicações biomédicas destacam-se: desenvolvimento de pele artificial (FONTANA *et al.*, 1990), vasos sanguíneos artificiais (KLEMM *et al.*, 2001), tratamento de queimaduras, feridas e úlceras através de curativos ou filmes antibacterianos (BIOCEL, 2013; BIONEXT, 2013; FU *et al.*; GENGFLEX, 2013; MENBRACEL, 2013; LIN *et al.*, 2013; WEI, 2011; YANG *et al.*, 2012), matriz para liberação controlada de antibióticos e fármacos (JIPA *et al.*, 2012), tratamento de nervos periféricos danificados (KOWALSKA *et al.*, 2013), membrana auxiliar em tratamento ortodôntico (YOSHINO *et al.*, 2013), implante meniscal (BODIN *et al.*, 2007) e cartilagem artificial (LOPES *et al.*, 2011).

A utilização da CB no desenvolvimento de materiais e compósitos tem sido feita principalmente através da inserção de substâncias como prata, fosfato, pectina, amido e sílica; e inserção “in situ” de hidroxiapatita, colágeno e PHB (DONINI *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2010; NAKAGAITO *et al.*, 2005; RUKA *et al.*, 2012). Compósitos com a adição de quitosana, por exemplo, podem melhorar as propriedades do material desenvolvido para aplicação biomédica (CIECHAŃSKA, 2004; LIN *et al.*, 2013)

Na indústria de alimentos a CB pode ser usada como aditivo emulsificante, dispersante, geleificante, como fibra dietética e clarificante de suco de frutas (KRYSTYNOWICZ *et al.*, 2000; SHI *et al.*, 2013). A celulose desintegrada é considerada um estabilizante de baixa viscosidade podendo ser usado como substituto da gordura como é o caso do produto Cellulon[®] PX (CELULLON, 2013; CZAJA *et al.*, 2006; OKIYAMA *et al.*, 1993; VANDAMME *et al.*, 1998). O produto “nata de coco” é descrito como sendo um alimento apreciado nas Filipinas composto por CB produzida a partir de água de coco ou suco de abacaxi. O produto é adoçado e cozido antes de ser comercializado como uma sobremesa (GOSSELE; SWINGS, 1985).

Diversas outras aplicações para CB incluem: papéis especiais (JOHNSON *et al.*, 1990), caixas acústicas e fones de ouvido de alta fidelidade (IGUCHI *et al.*, 2000), substrato para OLED (Diodo emissor de luz orgânico) (UMMARTYOTIN *et al.*, 2012), membrana de sensor de glicose (AMMON *et al.*, 1995), membranas de ultra-filtração (TAKAI *et al.*, 1991),

suporte para imobilização de proteínas, leveduras e enzimas (WU *et al.*, 2008; WU e LIA, 2008; YAO *et al.*, 2011); membranas de células combustíveis (EVANS *et al.*, 2003), papel eletrônico (SHAH; BROWN, 2005), esponjas (ESPONJA, 2013), componente de meio de cultura para células animais (WATANABE *et al.*, 1993) e desenvolvimento de aerogéis (WU *et al.*, 2013). Em sua revisão, Donini e colaboradores (2010) mencionam outras aplicações como: roupas para esporte, material para tendas, uso em técnicas cromatográficas, estabilizador de emulsões em cosméticos, condicionadores, purificação de esgotos, espessantes para tintas, adesivos e torniquetes.

3.2.1 Síntese

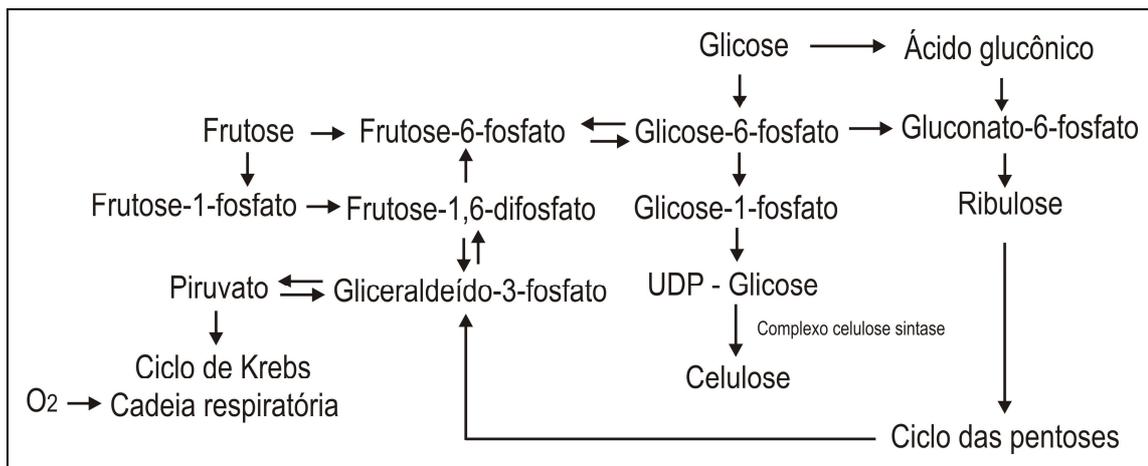
A CB pode ser produzida por vários gêneros de bactérias: *Gluconacetobacter* ou *Acetobacter* (DAYAL *et al.*, 2013; SON *et al.*, 2003; ZENG *et al.*, 2011), *Rhizobium* (WILLIAMS *et al.*, 2008), *Salmonella* (BHOWMICK *et al.*, 2011), *Enterobacter* (MA *et al.*, 2012), *Escherichia* (MONTEIRO *et al.*, 2009), *Vibrio* (VISICK *et al.*, 2009), *Sarcina* (CANALE; WOLFE, 1964) e *Rhodococcus* (TANSKUL *et al.*, 2013). Chawla e colaboradores (2009) mencionam que os gêneros *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* também podem ser produtores de CB.

As linhagens mais relevantes industrialmente pertencem ao gênero *Gluconacetobacter*. A espécie *G. hansenii* é a principal linhagem produtora de CB, sendo utilizada em diversos trabalhos e conhecida como micro-organismo padrão nos estudos. As espécies *A. xylinum* (= *A. xylinus*), *G. xylinum* (= *G. xylinus*) e *G. hansenii* (= *A. hansenii*), apresentam similaridades acima de 80% entre si (LISDIYANTI *et al.*, 2006). As bactérias desses gêneros são bastonetes estritamente aeróbicos, gram-negativos, toleram pH abaixo de 5 e podem ser encontrados naturalmente em frutas, vegetais, suco de frutas e bebidas alcoólicas. São catalogadas no nível 1 de biossegurança sendo portanto não-patogênicos (ATCC, 2013; KLEMM *et al.*, 2001; MADALOZZO *et al.*, 2008).

A síntese de CB é complexa e envolve a conversão de açúcares ou ácidos orgânicos em celulose estando intensamente relacionada com a expressão e atividade da enzima celulose sintetase. A formação de celulose requer a expressão de vários genes dos quais alguns já

foram identificados em plantas (SAXENA *et al.*, 2001). O mecanismo para a produção de celulose tanto em plantas como em bactérias apresenta muitas semelhanças bioquímicas dentre elas a produção endógena de alguns hormônios de crescimento (QURESHI *et al.*, 2013). Um esquema com as principais vias metabólicas envolvidas na produção de CB em bactérias é apresentado na Figura 3.

Figura 3 – Modelo hipotético das vias metabólicas envolvidas na biossíntese de CB



Fonte: Donini *et al.* (2010); Chawla *et al.* (2009)

De acordo com Donini e colaboradores (2010), as duas vias mais importantes na síntese de CB são: a via das pentoses, que possibilita a oxidação dos carboidratos, e o ciclo de Krebs, onde ocorre a oxidação dos ácidos orgânicos. Na bactéria *G. xylinus* a síntese de CB é sustentada diretamente pela fosforilação de hexoses exógenas e indiretamente pela via das pentoses e gliconeogênese devido a ausência da enzima fosfofrutoquinase-1 responsável pela catálise da reação de fosforilação da frutose-6-fosfato a frutose-1,6-difosfato.

As cadeias de celulose na bactéria são sintetizadas próximo à membrana plasmática através de um sistema protéico complexo que se associa com poros na membrana possibilitando a expulsão da CB ao meio externo (SAXENA *et al.*, 2001). Uma célula bacteriana têm em média 100 poros em sua membrana. Durante a síntese, as cadeias de celulose se agregam em fibrilas. As fibrilas cristalizam-se formando microfibras que por sua vez se agregam em feixes. Por fim, os feixes interagem formando fitas (SHEZADA *et al.*, 2010). As fitas de celulose se entrelaçam formando a estrutura matricial responsável pela formação do filme ou grânulo de CB.

3.2.2 Variáveis de processo

A CB é obtida por processo fermentativo submerso estático ou agitado. Em meio estático, observa-se a formação de uma película de espessura variável (em média de 1 a 2 cm) na superfície do meio, sendo esta permeável a líquidos e gases. A quantidade de CB produzida e as características estruturais da película dependem das condições específicas de processo que incluem: linhagem utilizada, composição do meio de cultura, relação volume/área e tempo de fermentação (CHAWLA *et al.*, 2009).

A formação da película de celulose na superfície do meio de cultura é resultado de um provável mecanismo de proteção contra a radiação UV e outras condições adversas durante a multiplicação do micro-organismo. A formação de celulose na superfície do meio funciona também como uma barreira protetora contra o ataque de outras cepas e contaminação por metais pesados além de auxiliar na difusão de nutrientes. A CB é estruturada em três camadas principais que variam em compactação. As células microbianas mantem-se distribuídas no interior da matriz estando a maior parte delas concentradas preferencialmente na camada superior da película (KLEMM *et al.*, 2001; PECORARO *et al.*, 2008).

Em meio agitado a CB pode formar grânulos ou tornar o meio viscoso devido à presença de celulose em forma de estruturas gelatinosas. Tal cultivo é geralmente utilizado quando se deseja aumentar a produção de celulose em massa e quando a formação da película não é de interesse. A escolha de cada um dos dois casos vai depender do tipo de aplicação que se deseja dar ao produto formado. Deve-se considerar também que as propriedades podem diferir como é o caso da resistência mecânica que é inferior na CB obtida em meio agitado. Vários estudos mostram a produção de CB em biorreatores e em frascos sob agitação (KOUHA *et al.*, 1997; KOUHA *et al.*, 1998; WATANABE *et al.* 1998; YANG *et al.* 1998; YAN *et al.*, 2008). Uma das desvantagens do processo agitado é a possibilidade da formação de células mutantes que perdem a capacidade de sintetizar celulose. Tal mutação é causada pelo estresse resultante do cisalhamento do meio nas células (KRYSTYNOWICZ *et al.*, 2000; HUNGUND; GUPTA, 2010).

O principal meio de cultivo usado nos estudos para seleção e produção de CB é o meio sintético HS mencionado em Hestrin e Schramm (1954) composto por glicose e ácido cítrico

como fontes de carbono e peptona e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Outros açúcares (frutose, sacarose, manitol, xilose e arabinose) têm sido estudados para produzir CB, podendo ser usados principalmente por substituição da glicose em meio HS. Meios alternativos incluem em sua composição outras fontes de carbono como glicerol e ácidos orgânicos (ISHIHARA *et al.*, 2002; KESHK; SAMESHIMA, 2006).

Castro e colaboradores (2012) avaliaram a produção de CB por *Gluconacetobacter swingsii* utilizando vários açúcares em substituição à glicose em meio HS (maltose, frutose, celobiose, manitol, xilose, sacarose e galactose) e observaram que a utilização de tais fontes não proporcionou maior produção. De acordo com os autores, o uso de meios com glicose é mais vantajoso pois a bactéria utiliza essa fonte de carbono não só como fonte energética mas também como percussor para a formação da própria celulose. Em contraponto, Hong e Qiu (2008) e Yodsuwan e colaboradores (2012), utilizando a cepa *G. xylinus*, consideram que manitol e frutose são as melhores fontes de carbono para a síntese de CB. Keshk e Sameshima (2006) avaliaram 16 fontes de carbono e obtiveram uma produção significativa de CB somente com o uso de glicose, frutose, inositol e glicerol.

Sheykhnazari e colaboradores (2011) avaliaram a produção de CB por *G. xylinus* em três diferentes formulações de meios contendo glicose ou manitol. Os autores constataram que a composição química do meio e o tempo de incubação exercem influência na produção de CB, formação do número de ramificações das nanofibras e no índice de cristalinidade. Não foi observado um aumento significativo na produção de CB após 14 dias de incubação com redução no índice de cristalinidade da CB após esse tempo.

Panesar e colaboradores (2012) estudaram a influência de 5 fatores na produção de CB por *Acetobacter aceti* MTCC 2623 através de planejamento experimental CCD usando meio HS modificado. De acordo com os autores, os fatores mais relevantes para a produção são pH, temperatura e tempo de incubação. A condição ótima definida pelo planejamento aplicado foi: glicose (22,5 g/L); nitrato de sódio (11,5 g/L); pH (6,9); temperatura (27,47°C) e tempo de incubação (6,62 dias).

Variações no pH durante o processo fermentativo resultam em aumento ou redução no consumo de açúcares devido a alterações na atividade e síntese enzimática, divisão celular e

solubilidade dos nutrientes disponíveis. Meios com diferentes condições iniciais de pH conduzem a respostas distintas quanto à produção de CB (DIMAGUILA, 1967; PANESAR *et al.*, 2012). O decréscimo no pH observado na maioria dos estudos durante a fermentação ocorre devido ao acúmulo de ácido glucônico, acético e/ou láctico (CHAWLA *et al.*, 2009). A formação de CB pode ser observada na faixa de pH de 3 a 7. Os melhores rendimentos variam de acordo com a espécie utilizada porém, a faixa que apresenta melhores resultados está entre 4 e 6. Entretanto algumas linhagens podem se desenvolver bem em pH abaixo de 4. Castro *et al.* (2012) observou que a maior produção de CB foi obtida pelo cultivo de *G. medellensis* em meio HS modificado com pH 3,5.

Naritomi *et al.* (1998) observaram que a produção de CB pode ser aumentada no cultivo de *A. xylinum sucrofermentans* BPR3001A utilizando meio com frutose suplementado com lactato. Son *et al.* (2003) formularam um meio suplementado com vários sais, etanol e nicotidamina obtendo uma produção 2,6 vezes maior (4,6g/L) do que quando utilizaram meio HS. Vários trabalhos mencionam que a produção de CB pode ser aumentada após suplementação do meio com: etanol (PARK *et al.*, 2003), chá verde (NGUYEN *et al.*, 2008), lignosulfonato (KESHK; SAMESHIMA *et al.*, 2006), alginato de sódio (ZHOU *et al.*, 2007) e vitamina C (KESHK, 2014).

3.3 Fontes alternativas para a produção de CB

É possível o desenvolvimento de processos para a produção de CB em meios alternativos com foco principal na utilização de produtos ou resíduos da agroindústria. Tais produtos contém algum tipo de açúcar ou carboidrato em sua composição e podem ser considerados fontes de carbono em potencial para processos fermentativos. A produção de CB em meios alternativos pode ser semelhante ou superior quando se compara com a produção convencional que utiliza meios sintéticos. Dados da produção de CB em diferentes condições que variam em utilização de meios alternativos e linhagens na literatura são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Produção de CB sob diferentes condições e micro-organismos

Fonte	Açúcar total (g/L)	CB (g/L)	Micro-organismo	Autor
Xarope de Ácer	30	1,51	<i>A. xylinum BPR 2001</i>	Zeng <i>et al.</i> (2011)
Melaço de cana**	50	2,21	<i>Acetobacter sp. V6.</i>	Jung <i>et al.</i> (2010)
	10	≅ 1	<i>Acetobacter sp. V6.</i>	Jung <i>et al.</i> (2010)
	20	≅ 1,4	<i>Acetobacter sp. V6.</i>	Jung <i>et al.</i> (2010)
	20	5,75	<i>G. persimmonis</i>	Hungund <i>et al.</i> (2013)
	23	5,14	<i>A. xylinum BPR 2001</i>	Bae e Shoda (2004)
Licor de milho	40	2,36	<i>Acetobacter sp. V6.</i>	Jung <i>et al.</i> (2010)
	20	≅ 1,7	<i>Acetobacter sp. V6.</i>	Jung <i>et al.</i> (2010)
Suco de melão	20	8,08	<i>G. persimmonis</i>	Hungund <i>et al.</i> (2013)
Suco de melancia	20	5,98	<i>G. persimmonis</i>	Hungund <i>et al.</i> (2013)
Suco de laranja	20	6,18	<i>G. persimmonis</i>	Hungund <i>et al.</i> (2013)
	73	5,9	<i>A. xylinum NBRC 19693</i>	Kurosumi <i>et al.</i> (2009)
Suco de abacaxi	89	4,1	<i>A. xylinum NBRC 19694</i>	Kurosumi <i>et al.</i> (2009)
Glicose*	10	1,12	<i>Acetobacter sp. V6.</i>	Jung <i>et al.</i> (2010)
	10	1,72	<i>G. hansenii PJK</i>	Jung <i>et al.</i> (2005)
	15	4,16	<i>Acetobacter sp. V6</i>	Son <i>et al.</i> (2003)
	20	1,58	<i>Acetobacter sp. V7</i>	Son <i>et al.</i> (2003)
	20	1,29	<i>Acetobacter sp. V8</i>	Jung <i>et al.</i> (2010)
	20	2,7	<i>G. sacchari</i>	Trovatti <i>et al.</i> (2011)
	22,5	1,73	<i>A. aceti MTCC 2623</i>	Panesar <i>et al.</i> (2012)

* Meio sintético; ** Hidrolisado

Em muitos casos, para uma produção significativa, se faz necessário que a fonte alternativa seja suplementada com nutrientes como extrato de levedura, peptona e minerais. Kurosumi *et al.* (2009) avaliaram a produção de CB por *A. xylinum* utilizando diferentes sucos de frutas (laranja, abacaxi, maçã, uva e pêra). O melhor resultado ($6,9 \pm 0,2$ g/L) foi obtido quando se utilizou meio composto por suco de laranja suplementado com peptona. Os autores consideraram a suplementação com uma fonte proteica indispensável para a obtenção de maiores rendimentos. Hungund *et al.* (2013) também avaliaram vários outros sucos (abacaxi, tomate, laranja, melancia, romã e melão) dentre outras fontes alternativas (melaço de cana, amido hidrolisado, caldo de cana, água de coco e leite de coco). Houve uma boa

produção de CB (2,75 a 8,08 g/L) em todas as fontes avaliadas porém os meios foram suplementados com fontes de nitrogênio na mesma proporção do meio HS.

Carreira *et al.* (2011) avaliaram o uso de vários resíduos dentre eles soro de queijo, casca de uva e glicerol bruto em meio estático. No estudo observou-se a necessidade da diluição e suplementação adequada dos resíduos para que a produção possa ser eficiente. Zeng *et al.* (2011) avaliaram o uso de xarope de açúcar para produção de CB por *A. xylinum* através de planejamento experimental obtendo o melhor resultado com o ajuste do meio para uma concentração de 30 g/L de açúcares e adição de ácidos orgânicos, extrato de levedura e sais ao meio. Castro *et al.* (2011) avaliaram o suco da casca de abacaxi e caldo de cana como substratos para a linhagem *G. swingsii sp.* Os autores consideraram ser possível a utilização de resíduos contendo açúcares uma vez que a estrutura química da CB obtida não difere quando comparada com a CB obtida pelo método padrão (cultivo em meio HS). A produção de CB utilizando suco da casca do abacaxi foi superior (2,8 g/L) quando comparada com o meio HS (2,1 g/L).

Trabalhos mostram a produção de CB através da utilização de vários outros produtos ou resíduos: pó de Konjac hidrolisado (HONG; QIU, 2008), palha de trigo (CHEN *et al.*, 2013), casca de arroz (GOELZER *et al.*, 2009), resíduo da indústria cervejeira (HA *et al.*, 2008), resíduo seco da produção de azeite (GOMES *et al.*, 2013), melação de cana (BAE; SHODA, 2004), água de coco (ALMEIDA *et al.*, 2008), amido e melação de beterraba (CHAWLA *et al.*, 2009; KUROSUMI *et al.*, 2009).

3.3.1 Líquido de sisal

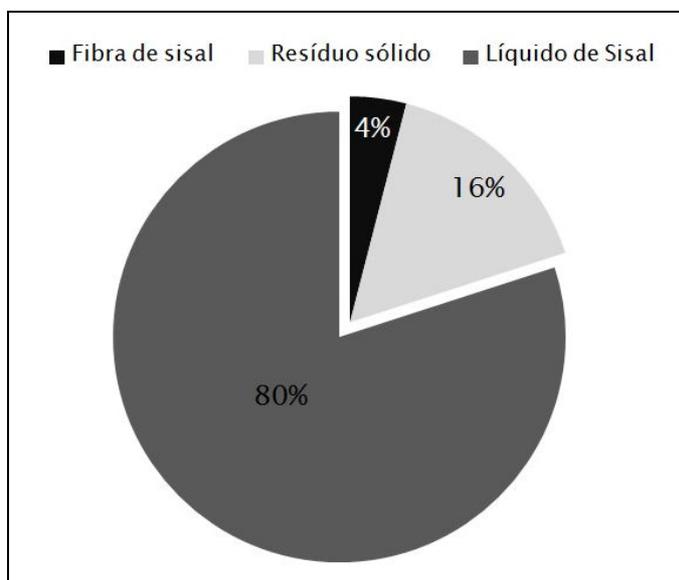
O sisal (*Agave sisalana*) é uma planta de origem mexicana introduzida no Brasil em 1910. Desde o final da década de 30, seu plantio é direcionado para a produção da fibra de sisal, classificada como fibra dura e corresponde a 70% de toda a produção de fibras desse tipo. Em 2012 a produção mundial de sisal foi de 220 mil toneladas tendo o Brasil como o principal produtor (40%). A boa adaptação da planta às condições climáticas de regiões como a Bahia transformou o cultivo para a produção de fibra em um dos principais meios de sustento de 150 mil famílias. A produção de fibras de sisal representa 90% do total de fibras desse tipo produzidas no Brasil, gerando 80 milhões de dólares em divisas e mais de meio

milhão de empregos diretos e indiretos (ANDRADE *et al.*, 2013; FAO, 2014; LI *et al.*, 2000; MARTIN *et al.*, 2009).

A fibra do sisal beneficiada é usada industrialmente na fabricação de fios, cordas, tapetes, capachos, mantas, cabos para navios, sacos, estofamentos, pasta celulósica, papéis finos e compósitos plásticos. No artesanato, é utilizada para confecção de diversos produtos como bolsas, tapetes manuais de macramê e tricô, descansadores para panelas, porta jóias e porta material didático (ANDRADE *et al.*, 2013).

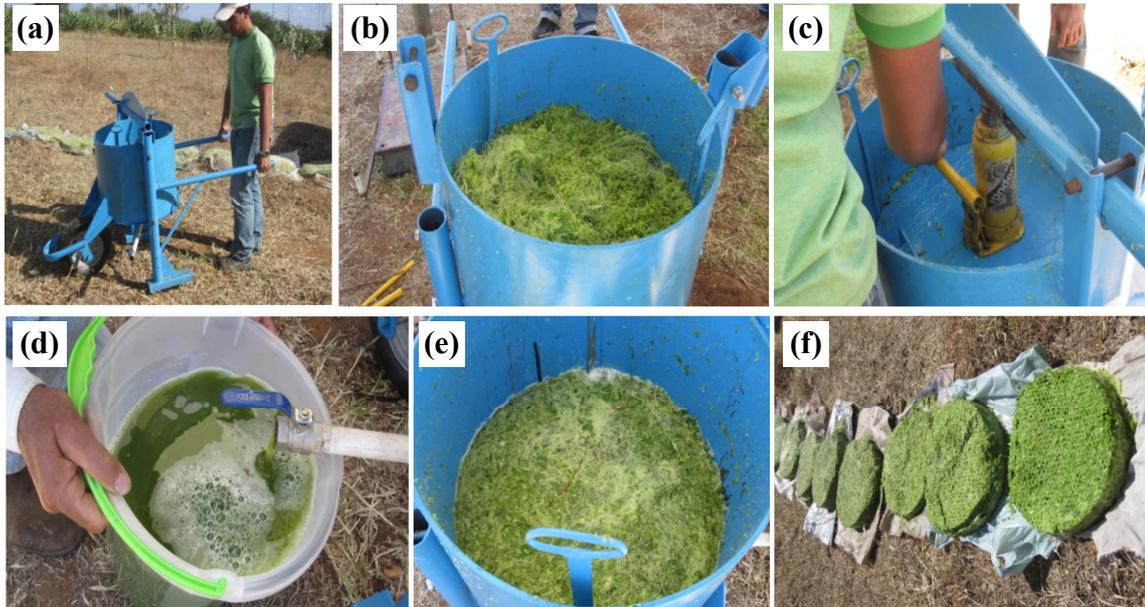
O líquido de sisal ou suco de sisal corresponde à fração líquida de toda a matéria descartada no processo de obtenção da fibra, sendo obtido através de prensagem das folhas de sisal (Figura 5). Do peso total das folhas processadas, uma pequena parte (4%) corresponde à fibra e o restante ao resíduo que é composto por fração sólida (16%) e fração líquida (80%) (Figura 4). A fração líquida é composta por água (em média 85%), tecido parenquimal, fibras curtas, metabólitos primários e secundários, compostos inorgânicos, proteínas e carboidratos fermentescíveis (ANDRADE *et al.*, 2013; BRANCO *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2013).

Figura 4 - Proporção dos produtos da cadeia produtiva do sisal



Fonte: Andrade *et al.* (2013)

Figura 5 - Etapas da obtenção do líquido de sisal : (a, b) prensa hidráulica móvel (c,d) coleta do líquido de sisal (e,f) resíduo sólido



Fonte: Silva *et al.* (2010)

De acordo com Branco (2010), o teor de açúcares no líquido de sisal pode variar de 35 a 65 g/L e espécies do gênero *Agave* são conhecidas por produzirem grandes quantidades de açúcares. Neto (2005) caracterizou o líquido de sisal “in natura” encontrando 26,1 g/L de açúcares e 6,6 g/L de proteínas. O líquido de sisal é fonte de diversas outras substâncias como saponinas, ceras, pigmentos, xantofila, pectina, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido láctico, amido, etanol e minerais (SILVA; BELTRÃO, 1999; SANTOS *et al.*, 2013).

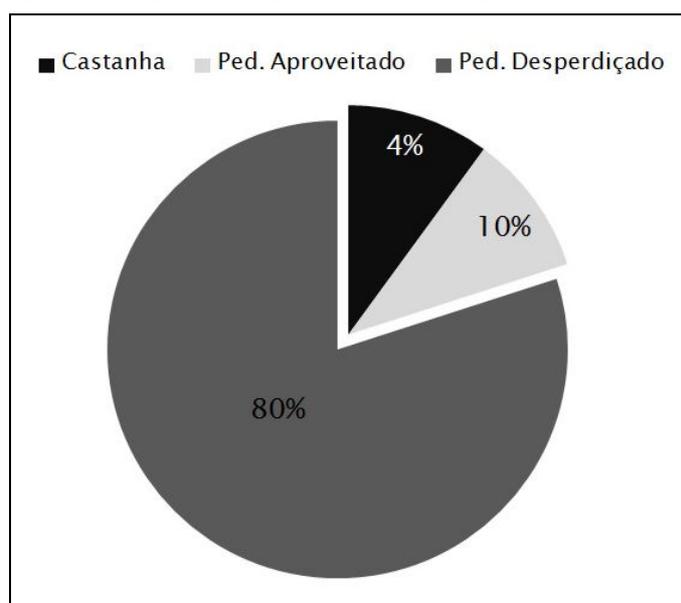
Não se tem conhecimento sobre o uso do líquido de sisal industrialmente e atualmente ele é desperdiçado sendo lançado diretamente no campo, o que gera contaminação do solo. Alguns pesquisadores estudaram a possibilidade de uso como agente bioinseticida e bioherbicida para *Culex quinquefasciatus*, uso na alimentação de ruminantes, biofertilizantes, aplicações na área farmacêutica e uso como substrato para a produção de etanol e goma xantana (BRANDÃO *et al.*, 2011; CAMPOS, 2010; PIZARRO *et al.*, 1999; SILVA; BELTRÃO, 1999; SILVA *et al.*, 2010). Considerando a grande quantidade de sisal produzida mundialmente, e suas potencialidades de uso, faz-se necessário pesquisas que avaliem a viabilidade do aproveitamento do líquido de sisal, como forma de agregar valor a essa importante cadeia agroindustrial.

3.3.2 Suco de caju

De acordo com a instrução normativa de nº 01, de 7 de Janeiro de 2000, suco de caju integral é a bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale, L.*), através de processo tecnológico adequado. Tal suco representa uma das principais formas de aproveitamento do pedúnculo de caju que é um subproduto do processamento da castanha. Em 2011 foram produzidas 4 milhões de toneladas de castanha no mundo sendo 11% delas produzidas no Brasil (FAO, 2014). A produção de castanha de caju no Brasil se concentra no Nordeste abrangendo 95% de toda produção nacional sendo considerada uma das principais atividades agroindustriais da região.

Atualmente, grande parte (90%) do pedúnculo resultante do processamento da castanha é desperdiçada mesmo com as várias formas de aproveitamento existentes na alimentação humana (suco, cajuína, geléia e doces) (Figura 6) (FONTES *et al.*, 2013). Tanto o pedúnculo como o suco de caju são fontes de vários nutrientes como vitamina C, cálcio, fósforo, antioxidantes, aminoácidos e principalmente açúcares que apresenta valores de até 150 g/L (BARRETO *et al.*, 2007; MAIA *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002; PAIVA *et al.*, 2000; SANCHO *et al.*, 2007).

Figura 6 - Proporção dos produtos da cadeia produtiva do caju



Fonte: Fontes *et al.* (2013)

O suco de caju tem despertando interesse na área de processos fermentativos por apresentar uma alternativa viável para a agregação de valor a resíduos e produtos da agroindústria, sendo estudado para a produção de diversos tipos de substâncias como biossurfactantes, proteínas unicelulares, oligossacarídeos e outras (BORGES *et al.*, 1999; CHAGAS *et al.*, 2007; FONTES *et al.*, 2013; HONORATO *et al.*; 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2013; RABELO *et al.*, 2009; SHENOY *et al.*, 2011).

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção e caracterização dos substratos

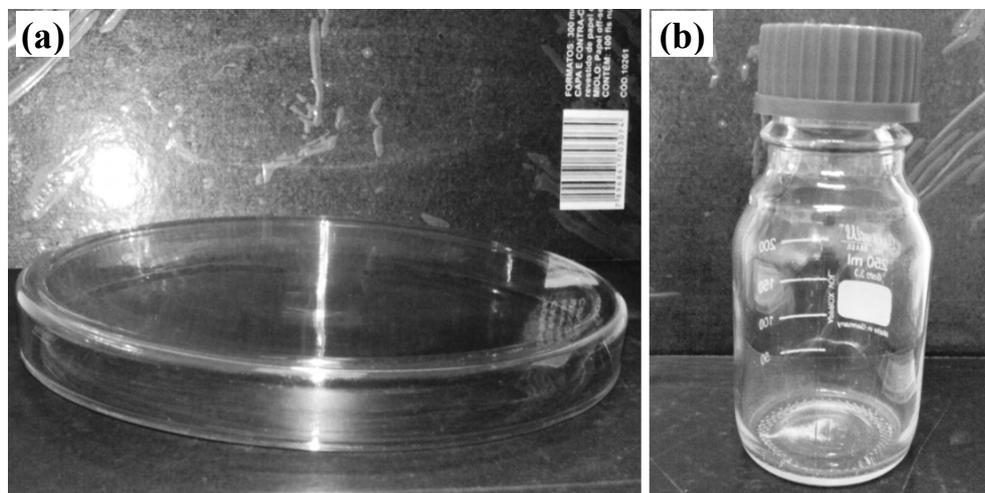
O líquido de sisal foi produzido pela Embrapa Algodão, em sistema produtivo localizado em Pocinhos - PB. O pedúnculo do caju foi coletado no campo experimental de Pacajus da Embrapa Agroindústria Tropical e processado através de prensagem para a obtenção do suco. As amostras foram armazenadas a -18°C em frascos de 1L e descongeladas no momento da realização dos ensaios.

As determinações analíticas descritas a seguir foram realizadas nas amostras de líquido de sisal e suco de caju esterilizadas a 121°C por 15 minutos. O teor de sólidos solúveis totais (SST) e pH foram determinados seguindo a recomendação do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). A determinação de açúcares (glicose, frutose e sacarose) foi feita por HPLC com coluna Varian PL Hi-Plex Ca 8um (300 x 7.7mm) mantida a 60 °C, detector de índice de refração Varian 355 RI Pro Star. Em paralelo, açúcares redutores e totais foram determinados pelo método de DNS descrito por Miller (1959) utilizando glicose como padrão. Para açúcares totais, as amostras foram submetidas à hidrólise ácida previamente. Os compostos fenólicos totais foram determinados por espectroscopia usando o método de Folin-Ciocalteu com ácido gálico como padrão (ROGINSKY; LISSI, 2005). O teor de nitrogênio total e proteína foi determinado pelo método de Kjeldahl (YASUHARA; NOKIHARA, 2001).

4.2 Produção de CB utilizando substratos alternativos

Para a avaliação da produção de CB a partir do líquido de sisal e suco de caju, a linhagem *G. hansenii* ATCC 23769, adquirida junto à fundação André Tosello (código: CCT 1431), foi cultivada sob condições estáticas a 30°C (B.O.D) nos meios devidamente formulados, conforme cada etapa do estudo (ver tópicos 4.2.4 a 4.2.8). O cultivo estático foi iniciado após inoculação e distribuição de 100 mL de meio em placa de Petri de 14,5 cm de diâmetro em todos os casos, exceto na etapa descrita no item 4.2.8 quando se utilizou frascos tipo Schott de 250 mL (Figura 7). As placas foram fechadas com suas respectivas tampas antes de serem conduzidas para a B.O.D.

Figura 7 - Recipientes utilizados para o cultivo estático de *G. hansenii* ATCC 23769 : (a) placa de Petri de 14,5 cm de diâmetro (área superficial de 165 cm²) (b) frasco tipo Schott de 250 mL (área superficial de 28 cm²)



4.2.1 Preparo dos meios e inóculo

Após filtração do suco de caju e líquido de sisal em membrana de 20 µm, diluição, ajuste de pH e suplementação (quando necessário), procedeu-se à esterilização dos meios, conduzida a 121°C por 15 minutos (calor úmido). Realizou-se uma segunda filtração assepticamente visando a remoção de precipitados antes da inoculação.

A linhagem *G. hansenii* ATCC 23769, previamente mantida a -18°C em glicerol (20%), foi ativada em meio caldo manitol (composição em g/L: extrato de levedura, 5; peptona, 3; D-manitol, 2,5) e incubada a 30°C por 2 dias sob condições estáticas. O inóculo foi preparado após transferência de 3% (v/v) da cultura em caldo manitol para o meio HS e após 24 horas de incubação a 30°C, foi realizada uma nova transferência de 3% (v/v) desta cultura para um novo meio HS sendo este finalmente incubado a 30°C por 3 dias. A composição do meio HS é mostrada da Tabela 5.

O tempo de incubação ideal no preparo do inóculo (3 dias) foi determinado através de um experimento prévio onde foi possível acompanhar a variação da quantidade de biomassa através de leitura espectrométrica a 600 nm, por até 9 dias de incubação (APÊNDICE A).

4.2.2 Determinações analíticas

Após as fermentações, as películas de celulose foram recolhidas e os meios fermentados submetidos às análises de açúcares totais pelo método de DNS (MILLER, 1959) e pH. Para a análise de açúcares os meios foram filtrados em membranas de 0,2 µm.

A massa seca de celulose foi determinada através de secagem e pesagem da película purificada em balança de infravermelho (170°C). O rendimento de celulose $Y_{P/S}$ (%) foi calculado conforme a equação (1) onde m_{CB} é a massa seca de celulose produzida, S_i a quantidade de açúcar inicial e S_f a quantidade de açúcar final no meio fermentado.

$$Y_{P/S} (\%) = (m_{CB} / (S_i - S_f)) * 100 \quad (1)$$

4.2.3 Purificação das películas de CB

As películas de CB foram purificadas através de tratamento alcalino antes da determinação de massa seca. Para tal, as películas foram lavadas com água e submetidas a tratamento térmico a 80°C imersas em solução de NaOH 1N + H₂O₂ 1% (v/v) por uma hora, na proporção de 100 mL de solução para cada película. Em seguida, as películas foram lavadas em água destilada até a neutralização. A metodologia utilizada foi baseada em diversos trabalhos que utilizam tratamento alcalino de forma diferenciada (GEA *et al.*, 2011; GEORGE *et al.*, 2005; GEORGE *et al.*, 2008).

4.2.4 Seleção do substrato alternativo

A primeira etapa do estudo envolveu a comparação da produção de CB a partir dos dois substratos a fim de seleccionar o mais promissor para a optimização nas etapas seguintes. A produção de CB foi avaliada na faixa de concentração de açúcar inicial de 2,5 a 15 g/L para o líquido de sisal e 2,5 g/L a 100 g/L para o suco de caju. Tais teores foram obtidos através de diluições do substrato bruto, com base no teor de açúcar determinado na etapa de

caracterização. As fermentações ocorreram em cultivo estático, a 30°C, por 5 dias. O pH do meio foi ajustado para 5.

4.2.5 Efeito do pH inicial do meio na produção de CB

Após seleção do substrato avaliou-se a influência do pH inicial do meio na produção de CB. O teor de açúcar foi ajustado para a concentração que promoveu maior produção de CB e maior rendimento durante a etapa de seleção do substrato. A faixa de pH estudada foi de 3 a 8, sendo ajustados com HCl ou NaOH. As fermentações ocorreram em cultivo estático, a 30°C por 5 dias.

4.2.6 Efeito da suplementação do meio com fontes de nitrogênio na produção de CB

Após a determinação da concentração de açúcar e pH ideais (itens 4.2.4 e 4.2.5) avaliou-se a influência da suplementação do meio com fontes de nitrogênio através de um planejamento experimental 2^2 completo com ponto central e axial (Tabela 4). Avaliou-se o efeito da adição de extrato de levedura e/ou sulfato de amônio na faixa que variou de 0 a 15 g/L para o extrato de levedura e de 0 a 10 g/L para o sulfato de amônio. A produção de CB (g/L) e o rendimento $Y_{P/S}$ (%) foram definidos como variáveis resposta. O tempo de cultivo manteve-se em 5 dias.

Tabela 4 - Níveis codificados das variáveis do planejamento fatorial 2^2 para avaliação do efeito da suplementação de fonte de nitrogênio orgânica e inorgânica

Variáveis (g/L)	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Extrato de levedura (X_1)	0	2,2	7,5	12,8	15
Sulfato de amônio (X_2)	0	1,5	5	8,5	10

4.2.7 Efeito do tempo de cultivo na produção de CB

A produção de CB foi avaliada por até 22 dias de fermentação utilizando-se o meio de cultura otimizado na etapa anterior do estudo ao qual denominou-se M SISAL. Em paralelo, conduziu-se o mesmo processo com o meio sintético HS e HS modificado (HS MOD). No

meio HS MOD, a composição química foi ajustada com peptona de caseína para uma mesma relação carbono/nitrogênio (C/N) do meio M SISAL. A composição dos meios estudados é mostrada na Tabela 5.

Tabela 5 - Composição dos meios de cultura utilizados no estudo do tempo de cultivo

Componente (g/L)	M SISAL	HS MOD	HS
Glicose	12,50	12,50	20,0
Sacarose	1,49	1,49	0,00
Frutose	1,17	1,17	0,00
Proteína*	3,84	7,43	5,00
Ácido cítrico	0,00	0,00	1,15
Fosfato de sódio	0,00	0,00	2,75
Extrato de Levedura	7,50	7,50	5,00

* para o meio M SISAL o termo proteína é referente ao valor estimado pelo método de Kjeldahl na fonte alternativa original. Para o meio HS MOD e HS o termo proteína representa apenas peptona.

4.2.8 Efeito da relação volume/área na produção de CB

A produção de CB em g/L, g/m² e a espessura da película foram avaliadas em função da quantidade de meio utilizado na incubação. Para tal, a bactéria *G. hansenii* ATCC 23769 foi incubada no meio M SISAL em frasco tipo Schott de 250 mL. A quantidade de meio utilizada variou de 17 a 102 mL correspondendo as relações volume/área de 0,6 a 3,6 mL/cm². O cálculo da área superficial AS seguiu a fórmula (2) onde R representa o raio da sessão circular do recipiente de cultivo. A espessura da película purificada foi medida com uso de micrômetro digital (Figura 8).

$$AS = \pi * R^2 \quad (2)$$

Figura 8 - Determinação da espessura da película de CB em micrômetro digital.



4.3 Caracterização da película de CB

As caracterizações descritas a seguir foram feitas nas películas de CB obtidas nas condições otimizadas estabelecidas no item anterior para o meio M SISAL. As mesmas caracterizações foram feitas em películas de CB obtidas com o meio HS nas mesmas condições (relação volume/área, pH e tempo de fermentação). Para as análises de ATG, DSC, DRX e FTIR as películas foram desidratadas em estufa a 60°C por 24 horas a fim de serem utilizadas nas análises. Para as análises de MEV, as amostras foram liofilizadas. Para a determinação de umidade, as películas de CB em estado úmido foram submetidas à secagem em balança de infravermelho (170°C) após breve drenagem do excesso de água com papel de filtro.

A análise termogravimétrica (ATG) foi realizada em um analisador termogravimétrico Shimadzu, modelo TGA-50, conduzida no intervalo de 0 a 600°C, na taxa de 10°C/min sob atmosfera de nitrogênio a 40 mL/min. Procurou-se uniformizar as massas das amostras trabalhadas para valores compreendidos entre 12 e 15 mg. Na análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) utilizou-se o equipamento DSC Q20 dpUnion com análise conduzida em atmosfera de nitrogênio, com taxa de aquecimento de 20°C/min e temperatura final de 400°C. Procurou-se uniformizar as massas das amostras trabalhadas para valores compreendidos entre 5,0 e 5,5 mg.

A Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi analisada no espectrômetro Nicolet 800 associado a uma célula MTech PAS. O preparo das amostras foi feito com KBr pulverizado, sob as seguintes condições: porcentagem de transmitância (%T) com resolução de 4 cm^{-1} , na faixa de absorção de $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$.

As análises de raios-X (DRX) foram conduzidas em difratômetro da marca Rigaku modelo DMAXB, com tubo de Cobre. O intervalo angular (em 2θ) utilizado foi de 10 a 30° com uma velocidade de varredura de $0,5^\circ/\text{min}$. O índice de cristalinidade (IC) foi estimado por deconvolução utilizando-se função Gaussiana feita pelo software PeakFit® da Systat Software Inc (SigmaPlot®). O índice de cristalinidade foi calculado seguindo a equação 3 onde dividiu-se a área de picos cristalinos pela área total do difratograma, onde IC (%) representa a fração cristalina em porcentagem, A_{IC} a área total dos picos cristalinos e A_{IA} a área total dos picos amorfos.

$$IC (\%) = A_{IC}/(A_{IC}+A_{IA}) \quad (3)$$

Para a visualização por microscopia eletrônica de varredura (MEV), seções das amostras de CB liofilizadas foram montadas em “stubs” e cobertas com uma fina camada de platina em aparelho de cobertura metálica, da marca Emitech, modelo K 550, encaminhadas ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM940A e visualizadas sob uma aceleração de voltagem de 15 kv , em diferentes aumentos ($2000\times$, $5000\times$, $10000\times$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos substratos

A caracterização dos substratos utilizados nos experimentos desse trabalho é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 – Caracterização físico-química de líquido de sisal e suco de caju integral

Parâmetro	Líquido de sisal	Suco de caju
Açúcares redutores (g/L)	13,31 ± 0,35 ^b	109,11 ± 1,96 ^a
Açúcares totais (g/L)	15,05 ± 0,26 ^c	107,40 ± 1,90 ^a
Glicose (g/L)	12,39 ± 0,01	72,07 ± 0,01
Sacarose (g/L)	1,49 ± 0,01	0,00 ± 0,00
Frutose (g/L)	1,17 ± 0,01	31,80 ± 0,01
Nitrogênio Total (g/L)	0,62 ± 0,17	0,32 ± 0,02
Proteína bruta (g/L)	3,84 ± 1,04	2,01 ± 0,11
pH	4,48 ± 0,01	4,33 ± 0,03
Polifenóis (g/L)	1,73 ± 0,04	1,19 ± 0,01
Sólidos solúveis totais (°Brix)	6,83 ± 0,21	11,37 ± 0,06

Na análise de açúcares redutores e totais, letras iguais na linha e coluna não apresentam diferenças significativas ($\alpha=0,05$).

O teor de açúcares totais do líquido de sisal foi de 15,05 g/L, sendo 82% deles constituídos por glicose, 10% de sacarose e 8% de frutose. Houve diferença significativa entre o teor de açúcares totais e redutores quando estimados pelo método de DNS, sendo confirmado pela presença de sacarose na análise de HPLC. Teores distintos são relatados na literatura para o teor de açúcares naturalmente presentes do líquido de sisal: 11,2 g/L (SHARMA; VARSHNEY, 2012); 35 a 65 g/L (BRANCO *et al.*, 2010); 26,1 g/L (NETO *et al.*, 2005). De acordo com Neto *et al.* (2005) o teor de nitrogênio do líquido de sisal in natura é de 1,4 g/L, proteínas 6,6 g/L e pH 3,8. Fatores climáticos ou diferenças entre variedades da planta (*Agave sisalana*) estão relacionadas com diferenças nos teores de nutrientes.

O teor de açúcares totais no suco de caju foi de 107,40 g/L, sendo 70% deles constituídos por glicose e 30% de frutose. Não houve diferença significativa entre o teor de açúcares totais e redutores quando estimados pelo método de DNS, sendo confirmado pela

ausência de sacarose na análise de HPLC. Na literatura observa-se que o teor de açúcares varia de 52 a 95,5 g/L dentre as fontes pesquisadas. Menores variações foram verificadas para o pH (3,17 a 4,23) e SST (9,8 a 12,5°Brix) (CIANCI *et al.*, 2005; CASTRO *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 1986; COSTA *et al.*, 1999; MAIA *et al.*, 2001; PINHEIRO *et al.*, 2006; SANCHO *et al.*, 2007). A presença de compostos fenólicos no pedúnculo, polpa ou suco de caju é amplamente relatada na literatura (CIANCI *et al.*, 2005; FREIRE *et al.*, 2013; VIEIRA *et al.*, 2011).

Baseado nos resultados, tanto o líquido de sisal como o suco de caju podem ser considerados substratos em potencial para a produção de CB uma vez que os diversos gêneros de bactérias produtoras exigem que uma fonte de açúcares e nitrogênio esteja presente no meio (CHAWLA *et al.*, 2009). Meios que apresentam teores de açúcares a partir de 10 g/L podem proporcionar uma condição ótima para a produção de CB como mostrado em alguns trabalhos (JUNG *et al.*, 2005; JUNG *et al.*, 2009; KESHK; SAMESHIMA, *et al.*, 2006).

5.2 Seleção do substrato alternativo

Essa etapa inicial do estudo foi realizada visando selecionar o substrato de maior potencial através da comparação entre a produção de CB no líquido de sisal e no suco de caju. O efeito da concentração de açúcares na produção e rendimento de CB no líquido de sisal e suco de caju é apresentado nas Figuras 9 e 10. Informações complementares podem ser vistas em APÊNDICE B. Na Tabela 7 e na Figura 11 são apresentados dados comparativos para as maiores concentrações obtidas em cada meio estudado.

Figura 9: Efeito da concentração de açúcar na produção de CB por *G. hansenii* ATCC 23769 utilizando líquido de sisal como fonte alternativa de carbono

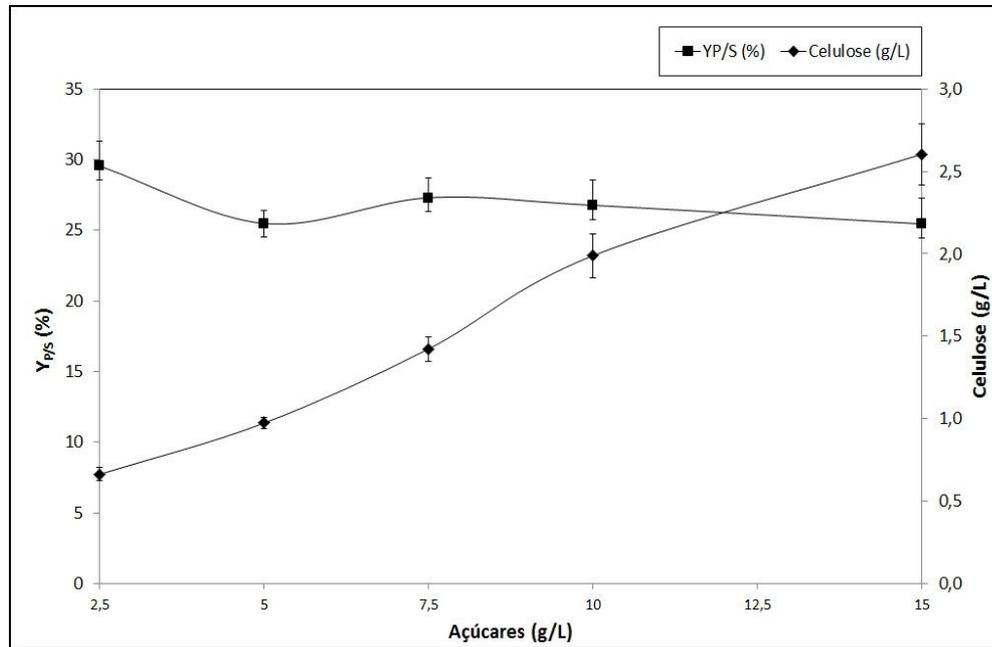


Figura 10: Efeito da concentração de açúcar na produção de CB por *G. hansenii* ATCC 23769 utilizando suco de caju como fonte alternativa de carbono

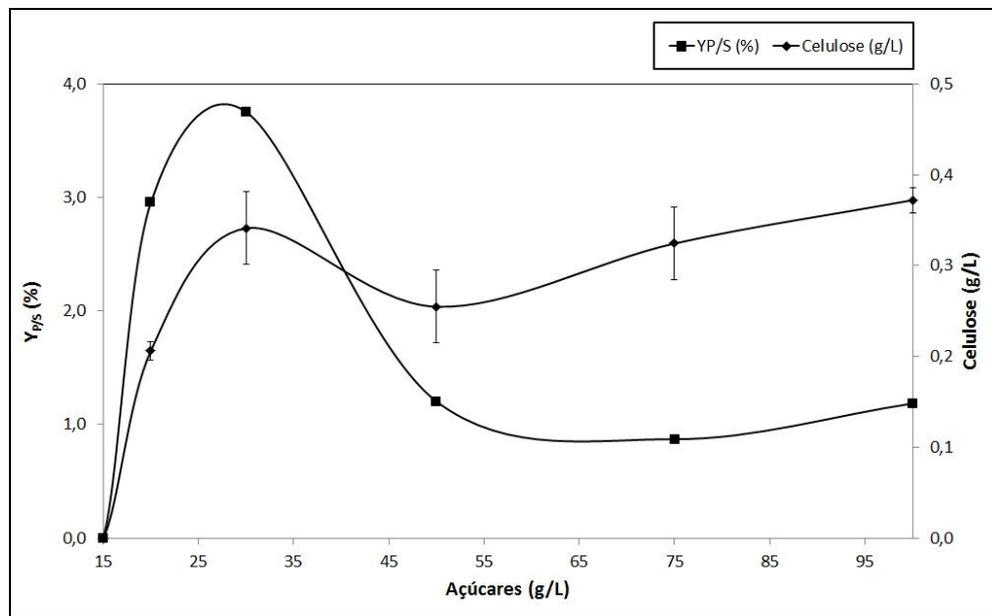
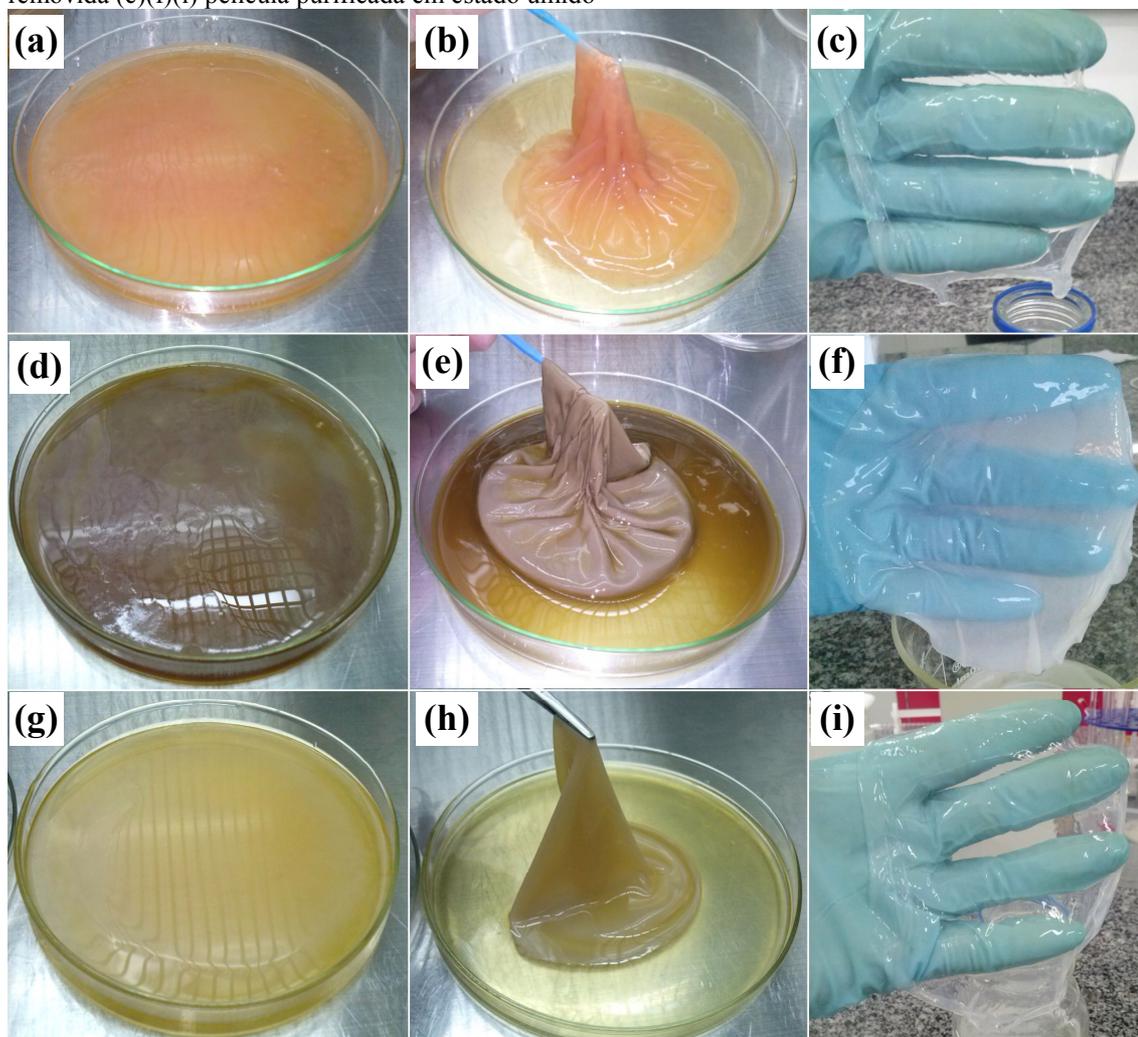


Tabela 7: Dados comparativos da produção de CB por *G. hansenii* ATCC 23769 nos diferentes substratos

Meio de Cultivo	Açúcares (g/L)	Nitrogênio (g/L)	Celulose (g/L)	$Y_{P/S}$ (%)	Açúcar consumido (g/L)	pH final
Suco de caju	50	0,15	0,34 ± 0,04 ^a	1,61 ± 1,81 ^a	21,16 ± 1,27 ^a	4,93 ± 0,00 ^a
Líquido de sisal	15	0,62	2,60 ± 0,19 ^b	25,45 ± 0,19 ^b	10,24 ± 0,65 ^b	8,35 ± 0,22 ^b
HS	20	1,25	0,54 ± 0,13 ^c	4,38 ± 1,04 ^c	12,39 ± 0,30 ^b	3,48 ± 0,11 ^c

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

Figura 11: Películas de CB obtidas no presente trabalho: (a)(b)(c) suco de caju (d)(e)(f) líquido de sisal (g)(h)(i) meio HS (a)(d)(g) película na superfície do meio após 5 dias de cultivo (b)(e)(h) película sendo removida (c)(f)(i) película purificada em estado úmido



Para o líquido de sisal, observa-se que a linhagem *G. hansenii* ATCC 23769 apresentou capacidade de sintetizar CB em todo os pontos do intervalo estudado (2,5 a 15 g/L) com destaque para a concentração de 15 g/L onde se obteve a maior produção (2,6 g/L).

Mesmo com o aumento gradativo na produção de CB, o rendimento permaneceu estatisticamente constante (em torno de 25%). Não houve variação significativa no pH final do extrato fermentativo entre os experimentos, ficando em torno de 8,6. O aumento expressivo do pH (para até 8,8) no meio líquido de sisal pode ser explicado pela possível formação de amônia decorrente do consumo de proteínas pela bactéria.

Para o suco de caju, observa-se que a linhagem *G. hansenii* ATCC 23769 apresentou capacidade de sintetizar CB apenas no intervalo de 20 a 100 g/L de açúcares com destaque para a concentração de 50 g/L onde a produção estabilizou-se (0,34 g/L). O rendimento foi reduzido de 2,95% a 1,19% nesse intervalo com consumo de açúcares em torno de 37%. No intervalo de concentração de 2,5 a 15 g/L houve consumo crescente de açúcares, os quais foram direcionados para vias metabólicas não referentes a produção de CB. Não houve consumo de açúcares ou produção de CB na concentração de 2,5 g/L, sendo esta uma condição adversa ao desenvolvimento microbiano devido a limitação de nutrientes. O pH final permaneceu próximo ao inicial (5,00) em todas as concentrações, o que é um indicativo de baixa produção de ácidos orgânicos. A produção de ácidos orgânicos principalmente o ácido glucônico são comuns no processo produtivo de CB.

Comparando os melhores resultados na Tabela 8 observa-se que a produção de CB no meio líquido de sisal apresentou maior rendimento mesmo na presença de uma concentração menor de açúcar. O rendimento da fermentação foi 5 vezes maior quando comparado com o meio HS e 12 vezes maior quando comparado com o suco de caju. A produção máxima de CB no meio líquido de sisal foi superior (2,6 g/L) aos outros meios. Compostos naturalmente presentes no líquido de sisal como pectinas, ácidos, etanol e amido podem ter auxiliado a produção de CB. Bactérias do gênero *Gluconacetobacter* podem degradar pectina e outros polissacarídeos e a produção de CB pode ser favorecida em meios com a adição de ácidos orgânicos e etanol (CHAWLA *et al.*, 2009; GU; CATCHMARK, 2012; RANI; APPAIAH, 2012).

A baixa produção de CB no suco de caju na faixa de concentração de 2,5 a 15 g/L pode ser explicada pela baixa concentração de nitrogênio nos meios que variou de 0,007 a 0,04 g/L. Em comparação com o meio HS que apresenta 1,25 g/L de nitrogênio, observa-se que a quantidade de nitrogênio encontra-se bastante limitada. Por outro lado houve uma boa

produção de CB no mesmo intervalo quando utilizou-se o líquido de sisal, mesmo considerando que a concentração de nitrogênio nesse meio também seja inferior quando compara-se com o meio HS (0,1 a 0,61 g/L).

No suco de caju, para as concentrações entre 20 e 100 g/L, além da baixa concentração de nitrogênio, a presença de compostos fenólicos e taninos naturalmente presentes no suco podem ter contribuído para a baixa produção de CB. Alguns trabalhos mencionam que os taninos presentes no suco de caju são inibidores de crescimento microbiano. Recomenda-se portanto que para muitos processos fermentativos o suco seja clarificado para a remoção dos taninos (CHAGAS *et al.*, 2007; FONTES *et al.*, 2013; HONORATO *et al.*, 2007; RABELO *et al.*, 2009). Pastorkova *et al.* (2013) observaram que alguns compostos fenólicos presentes na uva têm efeito inibitório sobre bactérias acéticas. Entretanto Rani e Appaiah (2013) mencionam que bactérias do gênero *Gluconoacetobacter* podem metabolizar taninos, o que explica sua capacidade de resistência e desenvolvimento em meios agroindustriais.

A maior produção de CB obtida por parte do líquido de sisal pode também está relacionada com a inibição de vias metabólicas responsáveis pela produção de ácidos orgânicos. Na literatura é frequentemente reportado que a produção de CB a partir de meios ricos em glicose conduz a uma produção e acúmulo de ácidos orgânicos no meio, sendo tal fato responsável pela redução do pH e paralisação da produção após um certo tempo de cultivo. A formação de ácido glucônico é decorrente da oxidação da glicose pela ação da enzima glicose desidrogenase (KIRIMURA *et al.*, 2011; SHARMA *et al.*, 2008). Tal fato é reforçado em estudo realizado por Keshk e Sameshima (2006) onde se avaliou o efeito de compostos antioxidantes presentes no meio, concluindo-se que esses podem inibir a formação de ácido glucônico aumentando a produção de CB no cultivo de *G. xylinus*.

Son e colaboradores (2003) verificaram, no cultivo de *Acetobacter* sp. V6 em meio HS, que o aumento da concentração de açúcares no intervalo de 5 a 15 g/L proporciona um aumento gradativo na produção de CB, porém, concentrações acima de 20 g/L reduzem a produção. De acordo com Keshk e Sameshima (2006), a maior produção de CB (cultivo de *G. xylinus* ATCC 10245 em meio HS) foi obtida na concentração de 10 g/L, com redução da mesma em concentrações de açúcar superiores (20 e 30 g/L). De acordo com Jung e colaboradores (2010) a produção de CB em meios com ajuste de glicose de 10 a 40 g/L variou

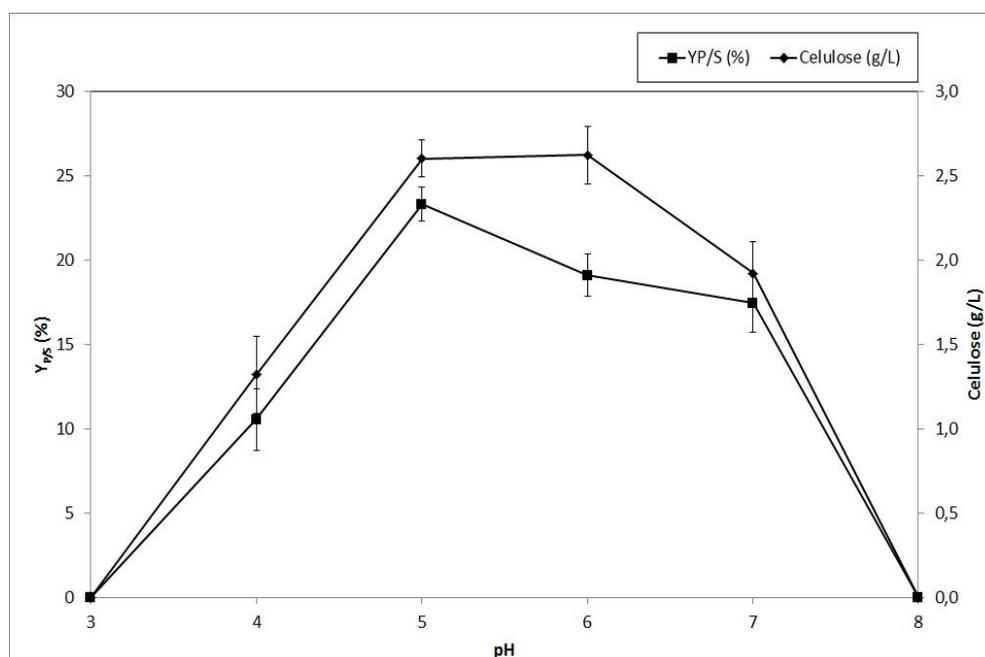
de 1,21 a 1,51 g/L, o que pode ser considerado um aumento não expressivo. Bae e Shoda (2004) obtiveram o maior rendimento (22%) no cultivo de *A. xylinum* BPR 2001 em melaço de cana ajustado para 23 g/L de açúcares. Em concentrações maiores (37, 48 e 72 g/L) houve redução do rendimento para até 4%. Todos esses dados sugerem que a concentração limite de açúcares para a obtenção de melhores produções e rendimentos situa-se entre 10 e 20 g/L.

Diante destes resultados, optou-se por trabalhar a otimização da produção de CB utilizando o líquido de sisal na concentração de açúcares de 15g/L.

5.3 Efeito do pH inicial do meio na produção de CB

O efeito do pH inicial do meio na produção e rendimento de CB utilizando o líquido de sisal como substrato na concentração de 15 g/L foi avaliado com valores de pH entre 3 e 8 (Figura 12). Dados complementares podem ser vistos em APÊNDICE C.

Figura 12: Efeito do pH inicial de fermentação na produção de CB por *G. hansenii* ATCC 23769 utilizando líquido de sisal como fonte alternativa de carbono



A maior produção de CB foi observada nas condições de pH 5 e 6 (2,60 g/L) e o melhor rendimento em pH 5 (23,29%). Mesmo com uma produção semelhante, o consumo de açúcares em pH 6 foi 24% maior do que em pH 5 (APÊNDICE C). Vários trabalhos

confirmam que a melhor produção de CB ocorre na faixa de pH situada entre 5 e 6, com redução em pH abaixo de 4 (CHAWLA *et al.*, 2009; JUNG *et al.*, 2010; KONGRUANG, 2008; MASAOKA *et al.*, 1993). Não houve produção de CB nas condições de pH inicial 3 e 8. A fermentação em pH inicial 3 provavelmente inibiu o desenvolvimento da bactéria haja visto que não houve consumo do substrato pelo micro-organismo acarretando uma produção nula de CB. As condições de pH 8 direcionaram para uma rota metabólica alternativa já que, embora não tenha produzido CB, houve consumo de mais de 92% do açúcar fornecido.

Com base nestes resultados, selecionou-se pH 5 como valor ótimo para produção de CB por *G. hansenii* ATCC 23769 utilizando líquido de sisal na concentração de açúcares de 15g/L.

5.4 Efeito da suplementação do meio com fontes de nitrogênio na produção de CB

Para a avaliação do efeito da suplementação do meio com fontes de nitrogênio na produção de CB, delineou-se um planejamento experimental onde foi possível investigar, além da concentração de suplemento, a interação de fonte orgânica e inorgânica de nitrogênio. Fixou-se o tempo de fermentação em 5 dias, concentração inicial de açúcares totais de 15 g/L e pH 5 na condução dos experimentos com o líquido de sisal. As respostas são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Influência da suplementação do meio com fontes de nitrogênio na produção e no rendimento de CB por *G. hansenii* ATCC 23769 utilizando líquido de sisal como fonte alternativa de carbono. Planejamento experimental 2²

Ensaio	Ext. de Levedura (g/L)	NH₄SO₂ (g/L)	Celulose (g/L)	Y_{P/S} (%)
1	2,20 (- 1,44)	1,50 (- 1,44)	2,92	20,44
2	2,20 (- 1,44)	8,50 (+ 1,44)	2,31	23,30
3	12,80 (+ 1,44)	1,50 (- 1,44)	3,01	22,20
4	12,80 (+ 1,44)	8,50 (+ 1,44)	2,48	18,17
5	0,00 (-1)	5,00 (0)	1,76	12,60
6	15,00 (+1)	5,00 (0)	2,83	22,62
7	7,50 (0)	0,00 (-1)	3,38	25,16
8	7,50 (0)	10,00 (+1)	2,14	15,56
9 (c)	7,50 (0)	5,00 (0)	2,69	20,20
10 (c)	7,50 (0)	5,00 (0)	2,50	18,73
11 (c)	7,50 (0)	5,00 (0)	2,96	22,22

Os valores das variáveis resposta produção de CB (R₁) e rendimento (R₂) variaram de 1,76 g/L a 3,38 g/L, e de 15,56% a 25,16%, respectivamente, nas condições estudadas para os 11 experimentos. Ressalta-se ainda que a diferença entre os pontos de máximo e mínimo é bem maior do que as variações dos valores para as condições do ponto central, onde se estuda a reprodutibilidade do experimento ($\Delta = 0,46$ e $3,49$, para R₁ e R₂, respectivamente), indicando que as variações observadas para os diferentes ensaios do planejamento são decorrentes das diferentes condições de cultivo.

Utilizando o programa Statistica versão 7.0, empregou-se a técnica da análise de variância (ANOVA) nos resultados a fim de se determinar quais os modelos seriam adequados de forma a obter o melhor ajuste aos dados experimentais frente às variáveis respostas. As Tabelas 9 e 10 mostram os efeitos das variáveis estudadas, calculados considerando diferentes tipos de interação entre as variáveis para a produção de CB e rendimento.

Tabela 9 – Efeitos estimados, desvio padrão e teste-t de Student calculados para o planejamento fatorial 2² tendo como resposta a produção de CB

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	T(2)	p-valor
Média	2,717759	0,162263	16,74909	0,000014
Ext. Lev. (X₁) L	0,443262	0,198677	2,23107	0,076063
Ext. Lev. (X₁) Q	-0,345284	0,236675	-1,45889	0,204406
(NH₄)₂SO₂ (X₂) L	-0,720505	0,197732	-3,64384	0,014844
(NH₄)₂SO₂ (X₂) Q	0,115483	0,232984	0,49567	0,641145
X₁/X₂	0,040000	0,281059	0,14232	0,892385

Tabela 10 – Efeitos estimados, desvio padrão e teste-t de Student calculados para o planejamento fatorial 2² tendo como resposta o rendimento

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	T(2)	p-valor
Média	20,39794	2,190940	9,31013	0,000241
Ext. Lev. (X₁) L	2,70063	2,682609	1,00672	0,360276
Ext. Lev. (X₁) Q	-1,75599	3,195684	-0,54949	0,606311
(NH₄)₂SO₂ (X₂) L	-3,68348	2,669857	-1,37966	0,226201
(NH₄)₂SO₂ (X₂) Q	0,95303	3,145847	0,30295	0,774127
X₁/X₂	-3,44500	3,794964	-0,90778	0,100000

Analisando os efeitos para a produção de CB (Tabela 9), observou-se que para as duas variáveis X₁ e X₂, apenas os efeitos lineares foram significativos ($\alpha=0,1$), sendo o efeito da variável X₂ negativo e X₁ positivo. Quanto ao rendimento (Tabela 10), observou-se que para as duas variáveis X₁ e X₂ nenhum efeito foi significativo.

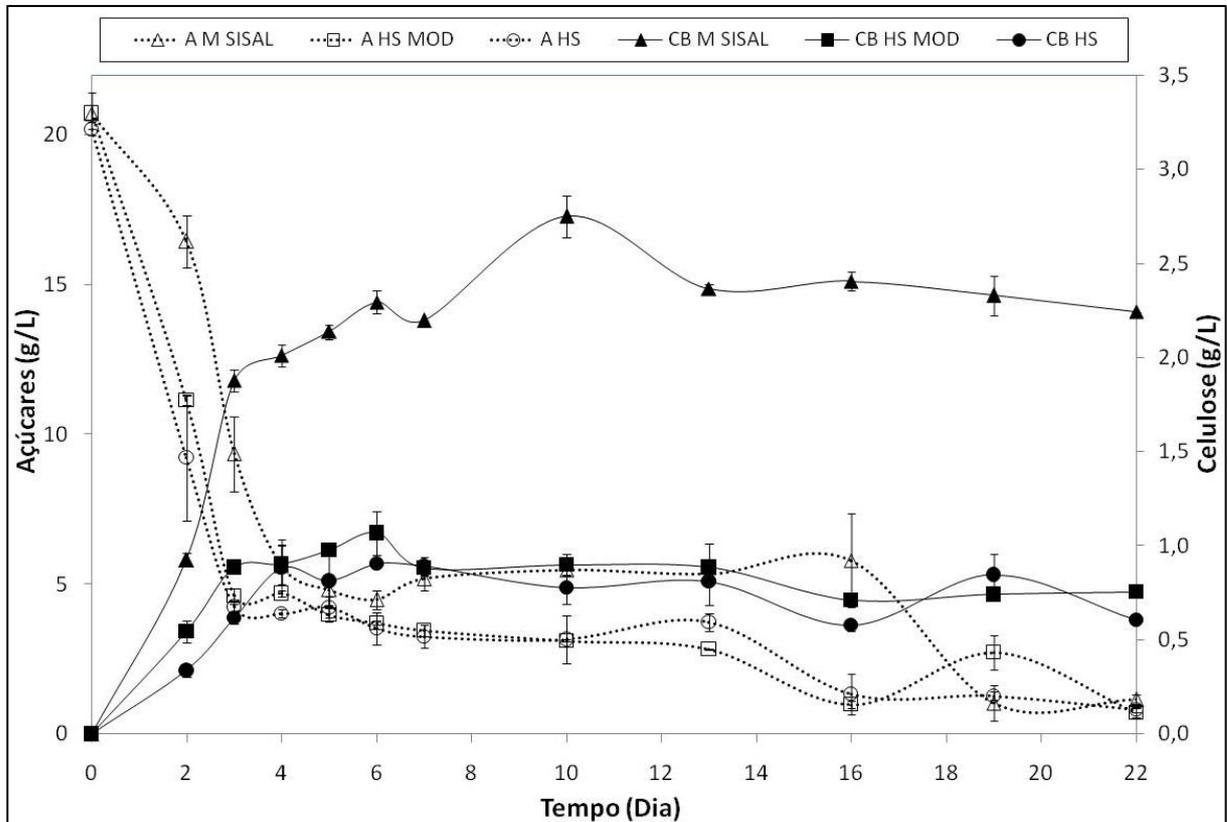
De acordo com Çoban e Biyik (2011) as maiores produções de CB em meio com glicose foram obtidas quando o meio foi suplementado com extrato de levedura quando comparado com sulfato de amônio. Jung *et al.* (2010) observou que extrato de levedura e peptona são as fontes de nitrogênio mais adequadas para a produção de CB e de acordo com Kurosumi *et al.* (2009) a adição de tais fontes orgânicas são indispensáveis para uma produção significativa. O efeito negativo da adição de sulfato de amônio indica que fontes inorgânicas podem exercer efeito inibitório no desenvolvimento de bactérias produtoras de CB. Além disso, a adição de fontes de nitrogênio acima do limite, favorece o aumento da biomassa e reduz a produção de CB (CHAWLA *et al.*, 2009; PANESAR *et al.*, 2012).

Analisando cada experimento separadamente observa-se que a maior produção e rendimento foram obtidos no experimento 7 onde suplementou-se o meio unicamente com 7,5 g/L de extrato de levedura. A produção de CB após a suplementação do meio com 7,5 g/L de extrato de levedura (3,38 g/L) foi superior a produção no meio não suplementado (2,6 g/L) observada na etapa anterior do estudo. De acordo com Gottschalk *et al.* (2013) e Borges *et al.* (2013) que estudaram a produção de CB pela mesma linhagem do presente estudo em meio HS, a utilização de extrato de levedura como fonte de nitrogênio apresentou efeito positivo na produção enquanto que o uso de sulfato de amônio efeito negativo. No estudo citado, o melhor resultado foi obtido na concentração de 12,5 g/L de extrato de levedura estando assim em acordo com o resultado obtido no meio acima citado quanto ao teor de nitrogênio (\cong 1,2 g/L de nitrogênio).

5.5 Efeito do tempo de cultivo na produção de CB

Com base nos estudos acima, selecionou-se uma condição ótima para a produção de CB: cultivo de por *G. hansenii* ATCC 23769 sob condições estáticas, utilizando meio obtido através da diluição do líquido de sisal para 15 g/L de açúcares, com ajuste de pH para 5 e suplementação do meio com 7,5 g/L de extrato de levedura. Tal meio foi denominado M SISAL. A concentração de açúcar total, pH e o teor de nitrogênio selecionado em M SISAL foi simulado (meio HS MOD) para avaliar o efeito de outras substâncias ou micronutrientes presentes no líquido de sisal. A produção de CB com o tempo para os três meios estudados nesta etapa é mostrada na Figura 13.

Figura 13 – Produção de CB e consumo de açúcares nos meios M SISAL, HS e HS MOD por *G. hansenii* ATCC 23769 acompanhada durante 22 dias de cultivo



Legenda: A M SISAL, A HS MOD, A HS; - Açúcares totais nos respectivos meios; CB M SISAL, CB HS MOD, CB HS - Celulose bacteriana produzida nos respectivos meios.

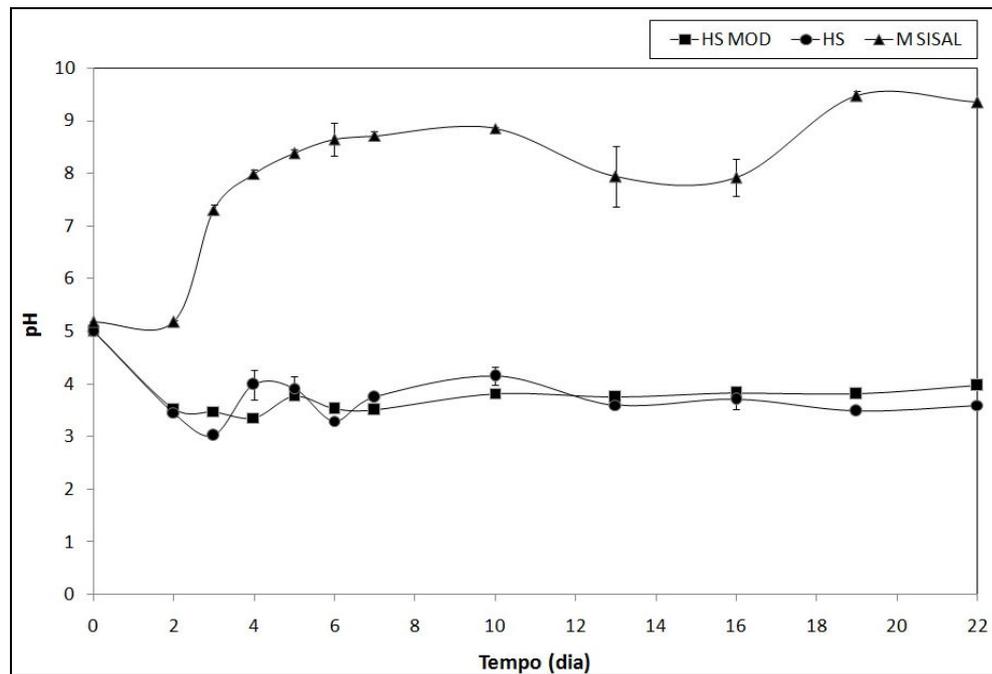
Em todos os meios estudados, foi observado um aumento da produção de CB com o passar do tempo, acompanhada da redução do teor de açúcar inicial do meio, confirmando o indicativo da relação consumo de substrato e formação de produto previamente observada no processo. As duas informações relacionam-se com o fato de que a celulose é sintetizada a partir do consumo e redirecionamento de glicose na formação da estrutura polimérica acarretando a redução de grupos redutores disponíveis no meio.

A produção de CB estabilizou-se após o 10º dia para o meio M SISAL e o após 4º dia para os meios HS e HS MOD. A produção máxima de CB no meio M SISAL foi maior do que nos meios HS e HS MOD que apresentaram aproximadamente a mesma produção (1 g/L). De acordo com Jung *et al.* (2009) e Son *et al.* (2013) não há acréscimo na produção de CB após 8 dias de cultivo. De acordo com Mikkelsen *et al.* (2009) a produção de CB por *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53524 em meio HS varia de 1,89 a 3,10 g/L de 2 a 4 dias

de cultivo. Wee *et al.* (2011) observaram que não há acréscimo na produção de CB por *Gluconacetobacter* sp. RKY5 em meio HS após 6 dias de cultivo.

O pH final seguiu o mesmo perfil apresentado anteriormente estabilizando-se após o 6º dia para o meio M SISAL e 4º dia e para os meios HS e HS MOD (Figura 14).

Figura 14 – Variação de pH nos meios M SISAL, HS e HS MOD por *G. hansenii* ATCC 23769 acompanhada durante 22 dias de cultivo

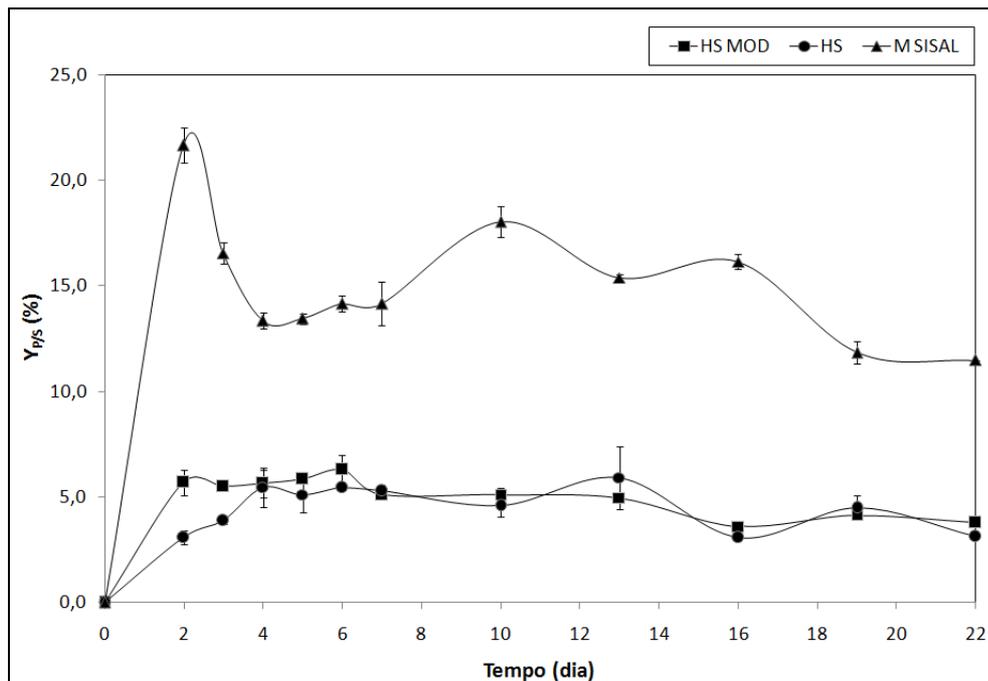


Confirma-se aqui o comportamento inverso já comentado desde o primeira etapa do estudo onde, para o meio M SISAL, o pH aumenta até valores acima de 8,3. O perfil de pH observado nos meios HS e HS MOD não é semelhante ao obtido nesse meio, sendo observada uma redução do pH, fato já observado anteriormente para o meio HS. Sugere-se que a formação de ácido freqüentemente observada em processos de síntese de CB, possa estar sendo inibida no meio M SISAL. Parte dos açúcares que normalmente são utilizados para a conversão em ácido podem estar sendo direcionados para a produção de CB em M SISAL que foi superior a produção nos outros dois meios. No cultivo de *A. xylinum* em meios com glicose a conversão em ácido glucônico pode chegar a 26% (KAMARUDIN *et al.*, 2013).

No cultivo em meio M SISAL observa-se que o rendimento chega a 21,65% no segundo dia com queda gradativa nos dias seguintes (Figura 15). Os cultivos em meio HS e

HS MOD apresentaram rendimentos próximos chegando a um valor médio de 5,5% até o quinto dia. Em todos os casos ocorre um maior consumo de açúcares e conversão em CB nas primeiras 72 horas de cultivo.

Figura 15 – Rendimento nos meios M SISAL, HS e HS MOD por *G. hansenii* ATCC 23769 acompanhado durante 22 dias de cultivo



Observa-se na literatura que os rendimentos da produção de CB podem variar dependendo da fonte de açúcares utilizada e das diversas condições de otimização envolvidas no processo. De acordo com Mikkelsen *et al.* (2009) o rendimento reduz de 66 a 30% no intervalo de 2 a 4 dias no cultivo de *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53524 em meio HS. Kurosuni *et al.* (2009) no cultivo de *A. xylinum* NBRC 19693 em diversos sucos de frutas (suplementados com extrato de levedura e peptona) obtiveram rendimentos que variaram de 1,4 a 6,9% porém a concentração inicial de açúcares foi de no mínimo 62 g/L. Bae e Shoda (2004) observaram um rendimento de 22% no cultivo de *A. xylinum* BPR 2001 a partir de melão de cana ajustado para 23 g/L de açúcares.

5.6 Efeito da relação volume/área na produção de CB nas condições otimizadas

A fim de se avaliar o efeito da relação volume/área na produção de CB em um mesmo recipiente (28 cm^2), aplicaram-se diferentes volumes de meio. Os resultados da produção de celulose e espessura da película obtida em meio M SISAL após 10 dias de cultivo nos diferentes volumes de meio utilizados são apresentados nas Figuras 16 e 17. Dados complementares são apresentados em APÊNDICE D.

Figura 16 – Influência da relação volume/área na produção de CB em g/L, g/m² e na espessura da película em meio M SISAL por *G. hansenii* ATCC 23769

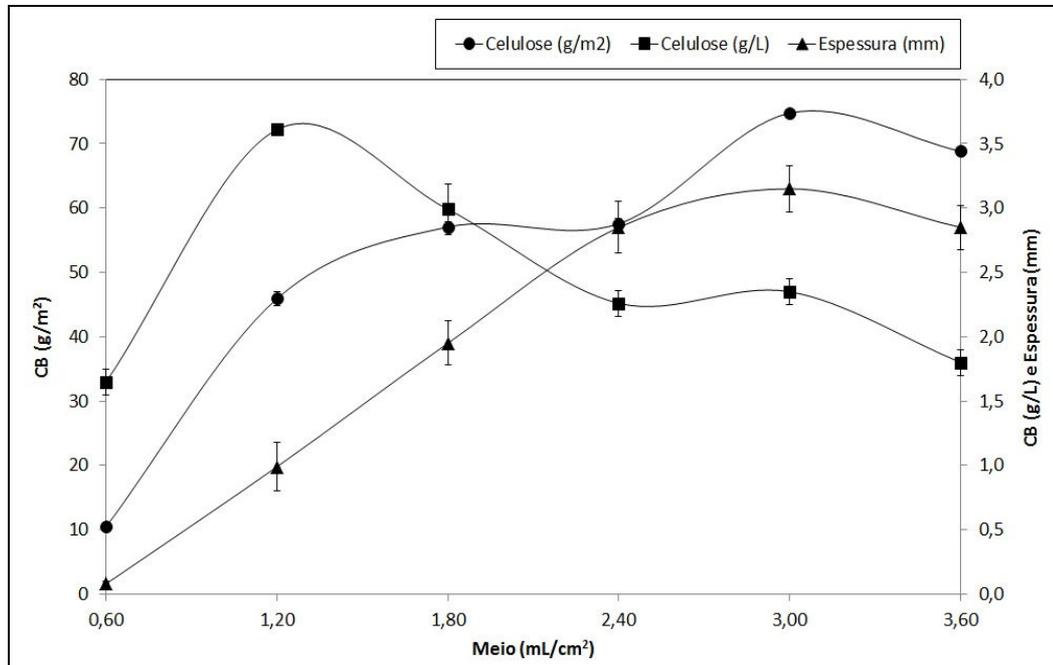
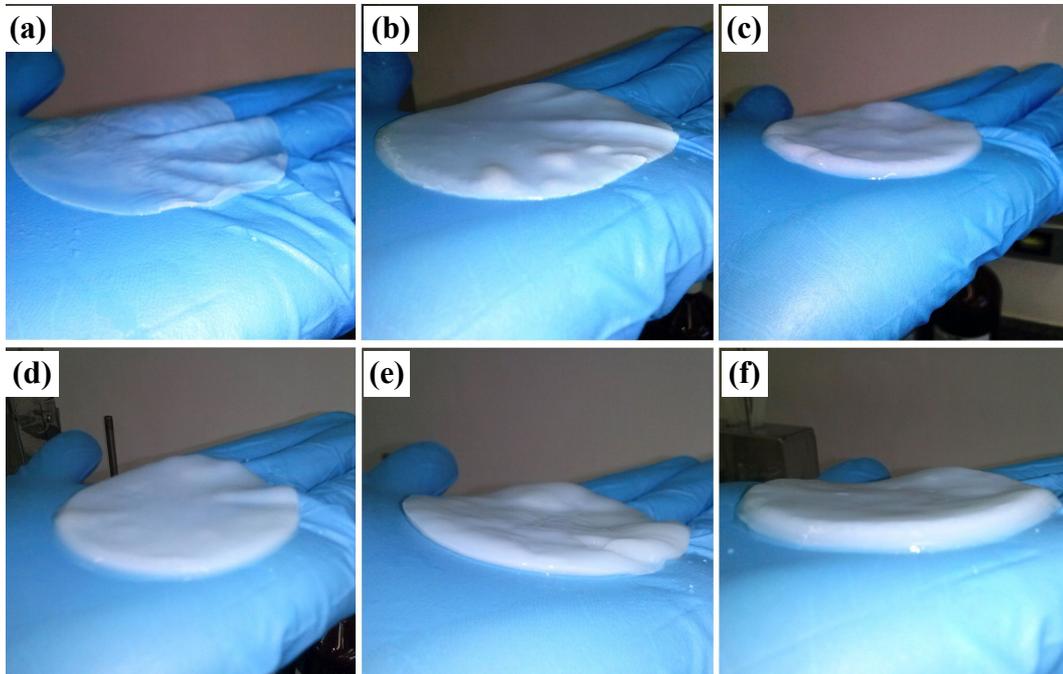


Figura 17 – Variação da espessura da película de CB em meio M SISAL por *G. hansenii* ATCC 23769: (a) 0,6 mL/cm² (b) 1,2 mL/cm² (c) 1,8 mL/cm² (d) 2,4 mL/cm² (e) 3,0 mL/cm² (f) 3,6 mL/cm²



A maior produção de CB em g/L foi obtida na condição de 1,2 mL/cm² (3,61 g/L). Convém ressaltar que não se obteve a mesma produção na condição de 0,6 mL/cm² quando compara-se o cultivo em placa (3,38 g/L) com o cultivo em frasco (1,65 g/L). Há um indicativo de que a produção de CB não seja função unicamente da relação volume/área mas possa sofrer influência das dimensões da área de cultivo.

A relação volume/área influenciou no aumento da produção por área (batelada) que apresentou a maior produção (74,76 g/m²) em 3,0 mL/cm². O aumento mais expressivo se deu entre 0,6 e 1,2 mL/cm². Observa-se também um aumento na espessura da película de 0,08 a 2,85 mm no intervalo de 0,6 a 2,4 mL/cm². Convém ressaltar que nas relações 1,8 e 2,4 mL/cm² a produção por área foi estatisticamente igual (aproximadamente 57 g/m²), porém com variação da espessura de 1,95 para 2,85 mm. Tal resultado pode estar relacionado com diferenças na porosidade da película obtida.

As informações dessa etapa do estudo são um indicativo de que modificações na relação volume/área podem influenciar na produção e organização estrutural da película de CB. De acordo com Phunsri *et al.* (2003) a produção de CB por *Acetobacter xylinum* TISTR

975 em 2,5 mL/cm² pode variar de 5,83 a 7,34 g/L quando mantem-se a altura de meio no recipiente de cultivo de áreas diferentes e a produção reduz para 2,32 g/L quando a relação volume/área sobe para 7,5 mL/cm² pelo acréscimo de volume numa mesma área. No presente trabalho uma produção de 3,61 g/L de CB pode ser obtida pelo cultivo de *G. hansenii* ATCC 23769 no meio M SISAL por até 10 dias em frasco tipo Schott de 250 mL com 34 mL de meio.

A produção de CB em meio estático requer uma investigação aprofundada, quando o objetivo for a estruturação de uma película de massa e dimensões fixas. Tais informações são úteis em um possível estudo de ampliação de escala.

5.7 Caracterização da película de CB

5.7.1 Umidade

A umidade da CB M SISAL apresentou valor ligeiramente inferior ($97,66 \pm 0,34$) à umidade da CB HS ($99,18 \pm 0,06$). Os dois valores estão de acordo com dados da literatura onde mencionam que a CB pode apresentar umidade variando de 95 a 99% (PECORARO *et al.*, 2008). Tal característica de grande capacidade de absorção de água torna a CB ideal para aplicações como curativos e substitutos temporários de pele no tratamento de queimaduras (CZAJA *et al.*, 2006). Outra possibilidade é sua aplicação melhorando a qualidade de alimentos através do aumentando a estabilidade térmica, redução da viscosidade de pastas, reforço de hidrogéis e substituição de gorduras (OKIYAMA *et al.*, 1993).

5.7.2 Análise termo gravimétrica (ATG) e calorimetria diferencial exploratória (DSC)

A análise termogravimétrica (ATG) é importante para a averiguação de estabilidade térmica devido a processos de decomposição térmica em amostras que sofram variação de massa com o aquecimento (GEA *et al.*, 2011). Assim, visando avaliar o efeito do meio de cultivo nestas mudanças, as películas de CB foram submetidas a esta análise. A CB obtida em meio M SISAL foi denominada CB M SISAL e a CB obtida em meio HS, CB HS. Os termogramas de ATG obtidos são mostrados na Figura 18 e as curvas de DTG na Figura 19.

As temperaturas e perdas de massa referentes a cada evento (ATG) são mostradas na Tabela 11.

Figura 18 – Análise termogravimétrica (ATG) da CB obtida nos meios HS e M SISAL por *G. hansenii* ATCC 23769.

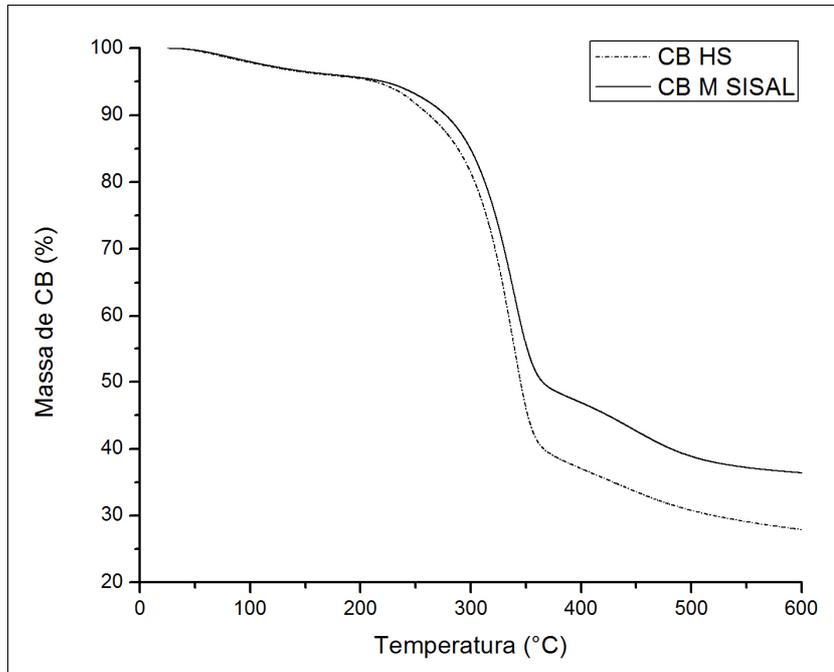


Figura 19 – DTG da CB obtida nos meios HS e M SISAL por *G. hansenii* ATCC 23769.

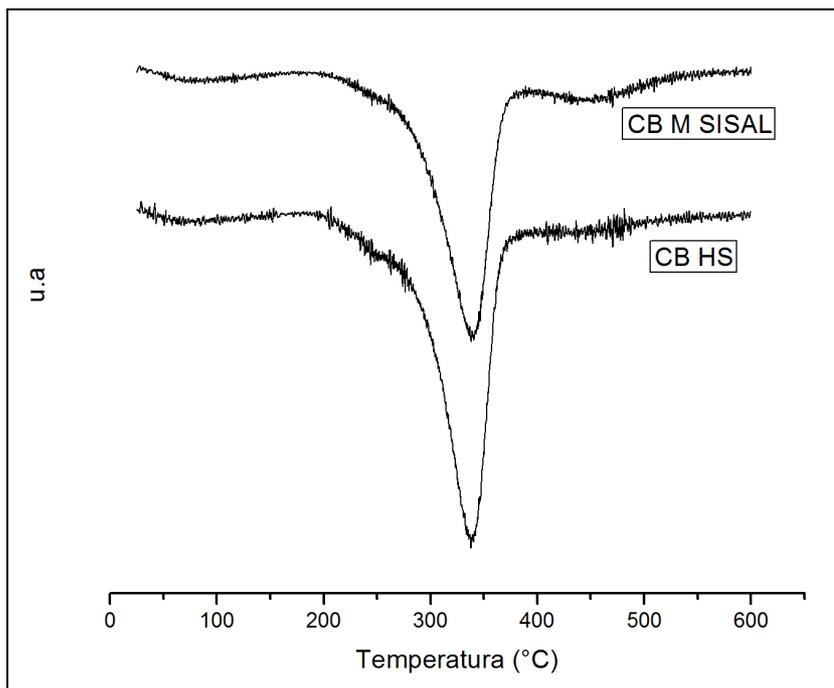


Tabela 11 – Temperaturas e perdas de massas características da CB

CB	ATG	Temperatura (°C)	Perda de Massa (%)	Autores
HS	1ª perda de massa	0 - 100	2	*
	2ª perda de massa	276 - 400	50	
	DTG (pico)	328	34	
M SISAL	1ª perda de massa	0 - 100	2	
	2ª perda de massa	284 - 400	42	
	DTG (pico)	330	30	
Pura	DTG (pico)	323 - 359	72 - 85	Gea at al. (2010)
	DTG (pico)	350 - 355	**	George at al. (2005)
	DTG (pico)	324	**	Wong at al. (2009)
	2ª perda de massa	169 - 408	57	Sanz <i>et al.</i> (2011)
Impura	DTG (pico)	289	66	Gea at al. (2010)
	DTG (pico)	312	**	George at al. (2005)

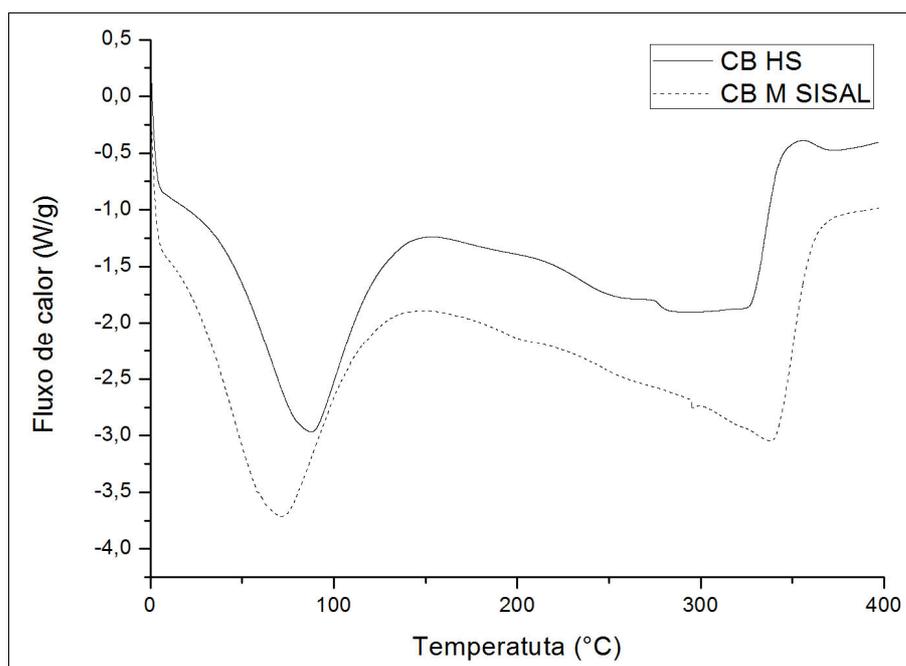
* Presente trabalho; ** Dados não fornecidos

As películas de CB HS e CB M SISAL apresentaram perfis de degradação com boa similaridade entre si. Verifica-se a existência de três etapas distintas de perda de massa nas duas amostras. O primeiro evento, que vai da temperatura ambiente ($\cong 30^\circ\text{C}$) até aproximadamente 100°C , é responsável pela perda de massa relacionada à evaporação de água residual do processo de secagem. Na segunda fase, as amostras sofrem uma acentuada perda de massa, relacionada à degradação da celulose. De acordo com a literatura, esse processo de degradação inclui despolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas, podendo ocorrer no intervalo de aproximadamente 250 a 400°C (ROMAN; WINTER, 2004; WONG *et al.*, 2009). Verifica-se que o início dessa segunda fase de perda de massa para a CB M SISAL inicia-se a uma temperatura um pouco mais elevada do que para a CB HS. Tal diferença pode estar associada a ligações de hidrogênio intra e intermoleculares mais fortes para o caso da CB M SISAL. A terceira e última fase pode se estender até 500°C e corresponde à degradação termo-oxidativa da celulose. Este comportamento térmico está em concordância com os resultados relatados na literatura (GEA *et al.*, 2011; GEORGE *et al.*, 2005; JEON *et al.*, 2010; SANZ *et al.*, 2011; STUMPF *et al.*, 2013).

Com base na curva DTG, é possível observar que a máxima degradação térmica obtida para as películas produzidas em ambos os meios ocorreu ao redor de 330°C (Tabela 12). Este comportamento térmico está em concordância com os resultados obtidos por Wong e colaboradores (2009), que observaram uma máxima degradação térmica (DTG) da CB no intervalo de 300 a 350°C. Esse resultado também é uma evidência de que o processo de purificação aplicado às películas foi adequado. George *et al.*, (2005), trabalhando com películas não purificadas, constataram a ocorrência de um pico de DTG em 158°C, valor atribuído à presença de estruturas proteicas remanescentes do processo de produção. Essas mesmas películas, quando submetidas a diferentes métodos de purificação, apresentaram picos de DTG ao redor de 350 °C.

As curvas de DSC são mostradas na Figura 20. Observa-se nas duas curvas um pico endotérmico em aproximadamente 100°C referente à perda de água. Um aumento do fluxo de calor é observado em torno de 350°C sendo referente à degradação da celulose. O caráter exotérmico do evento é uma característica esperada para a celulose. No entanto, na CB M SISAL, este pico apresenta-se mais largo, o que sugere que esta amostra é termicamente mais estável do que a CB HS, corroborando com os dados de ATG.

Figura 20 – Curvas de DSC da CB obtida nos meios HS e M SISAL por *G. hansenii* ATCC 23769

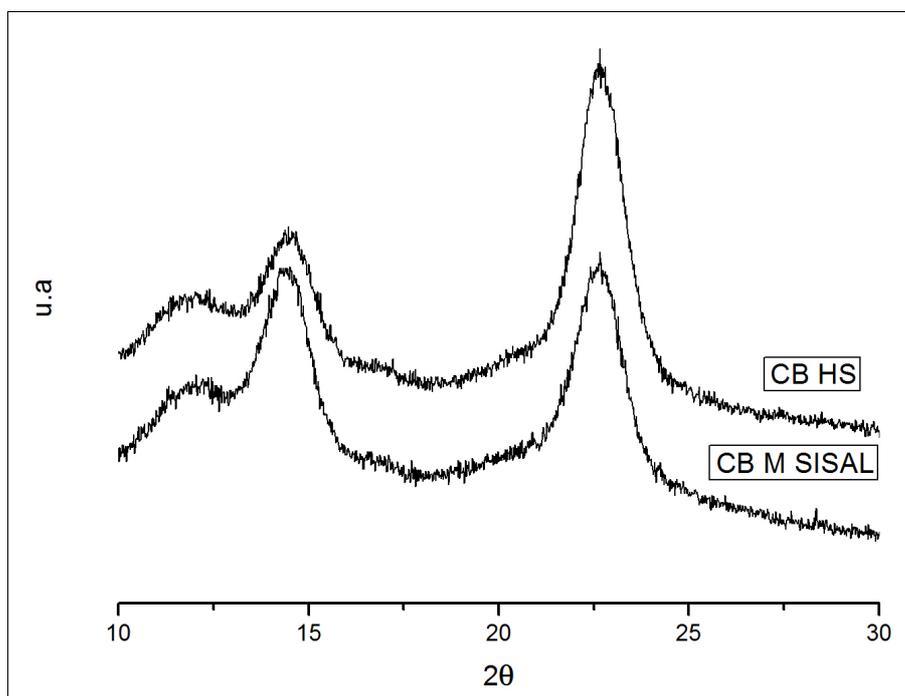


Comparando os perfis das curvas de ATG e DSC, pode-se concluir que a utilização do líquido de sisal como meio alternativo para produção de CB não comprometeu as propriedades térmicas do material resultante. A CB é um material que pode alcançar uma faixa maior de aplicações quando compara-se com a celulose vegetal uma vez que pode ser aquecida até 350°C antes de começar a se degradar. A celulose vegetal inicia sua degradação em uma temperatura inferior (aproximadamente 250°C). A estabilidade térmica da CB pode ser explicada pela ausência de aditivos químicos comuns utilizados na produção de papel (PECORARO *et al.*, 2008).

5.7.3 Difração de raios-X (DRX)

As análises de raios-X são apresentadas na Figura 21.

Figura 21 – Raio-X da CB obtida nos meios HS e M SISAL por *G. hansenii* ATCC 23769



No presente estudo os perfis de raio-X são semelhantes aos relatados na literatura (BARUD *et al.*, 2007; JEON *et al.*, 2010; GOELZER *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2013). Os dois picos predominantes encontrados nas duas análises permitem avaliar a presença de celulose tipo I e II. Em análises de raios-X, a celulose tipo I é caracterizada por picos de $18^\circ \leq$

$2\theta \leq 19^\circ$ na região amorfa e $22^\circ \leq 2\theta \leq 23^\circ$ na região cristalina. A celulose tipo II apresenta picos de $13^\circ \leq 2\theta \leq 15^\circ$ na região amorfa e $18^\circ \leq 2\theta \leq 22^\circ$ na região cristalina. A presença de celulose tipo I e II é característica da celulose bacteriana enquanto que a vegetal apresenta apenas celulose tipo I (CHAWLA *et al.*, 2009).

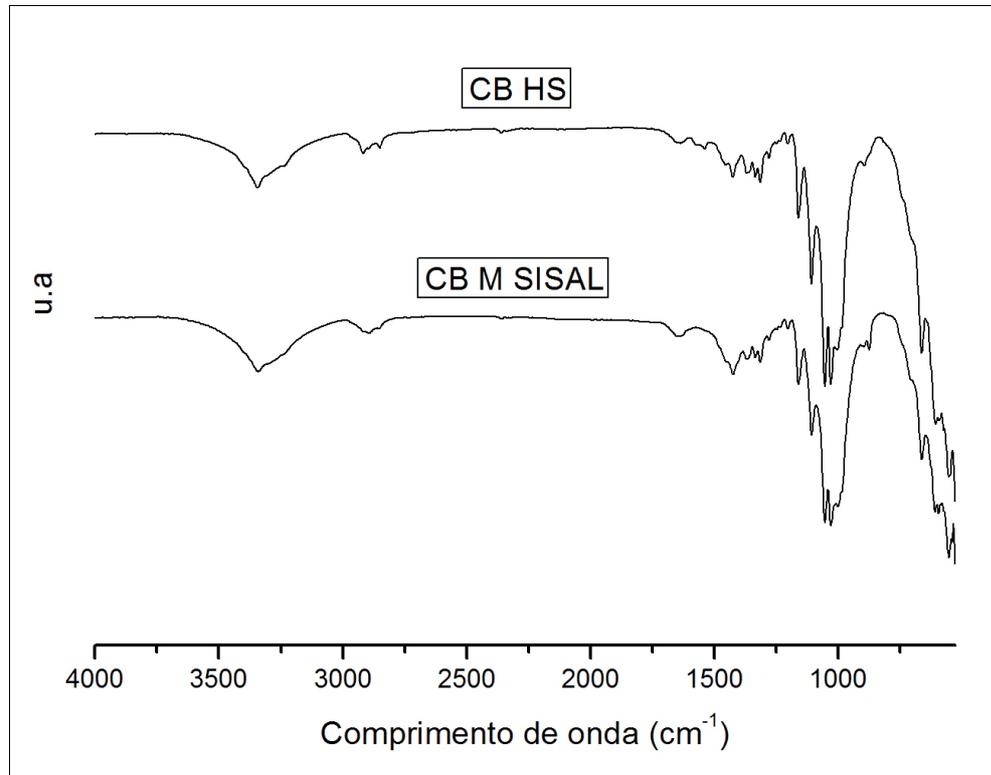
No presente estudo, o IC da CB M SISAL apresentou valor de 93,2% ($R^2=0,99$) sendo portanto superior ao IC da CB HS que apresentou valor de 91,0% ($R^2=0,98$). Tais valores estão em concordância com a literatura onde a CB é apresentada como um material com índice de cristalinidade variando de 70 a 90%, sendo assim um material de alta cristalinidade quando comparado com a celulose vegetal. A composição do meio de cultura, a linhagem produtora, o tempo de cultivo e demais condições de cultivo podem influenciar no IC.

No desenvolvimento de CB em forma de película a partir de meios alternativos é importante que a cristalinidade da CB se mantenha alta pois a mesma relaciona-se diretamente com a resistência mecânica. Películas de CB com baixo índice de cristalinidade tendem a apresentar menor resistência mecânica (PECORARO *et al.*, 2008).

5.7.4 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os grupos funcionais característicos da CB com as principais bandas e respectivas atribuições, assim como as bandas encontradas na CB HS e CB M SISAL são mostrados na Tabela 12. Os espectros de FTIR (Figura 22) das amostras analisadas seguem o perfil característico relatado na literatura (SANZ *et al.*, 2011).

Figura 22 – Espectros de FTIR da CB obtida em meio HS e M SISAL por *G. hansenii* ATCC 23769



Várias bandas relevantes características da CB foram encontrados nas duas amostras analisadas, muitas delas relacionadas com ligações OH e CH. Bandas referentes à nitrogênio, estruturas proteicas, ou possíveis contaminantes (1535, 1730-1735, 3150-3220) não foram encontradas, sendo indicativos de pureza nas amostras de CB (Tabela 12).

Tabela 12 - Bandas características para celulose bacteriana na análise de FTIR

Número de onda (cm ⁻¹)			Atribuição*
CB HS	CB M SISAL	CB Pura*	
3344	3341	3445	(O-H) - Celulose I
2917	2893	2860 - 2930	(CH ₂)
1637	1646	1635 - 1645	C(O-H) - Água absorvida
1425	1424	1425 - 1435	(HCH, OCH)
1369	1369	1358 - 1375	CH
1160	1160	1146 - 1160	(C-O-C, CH)
1108	1107	1111	(C-C) - Anel (Polissacarídeos, Celulose)
1030/1054	1030/1054	1046	(C-O), C-OH (Carboidratos)
895	895	870 - 900	(CH)
663	662	665 - 70	(C-OH)

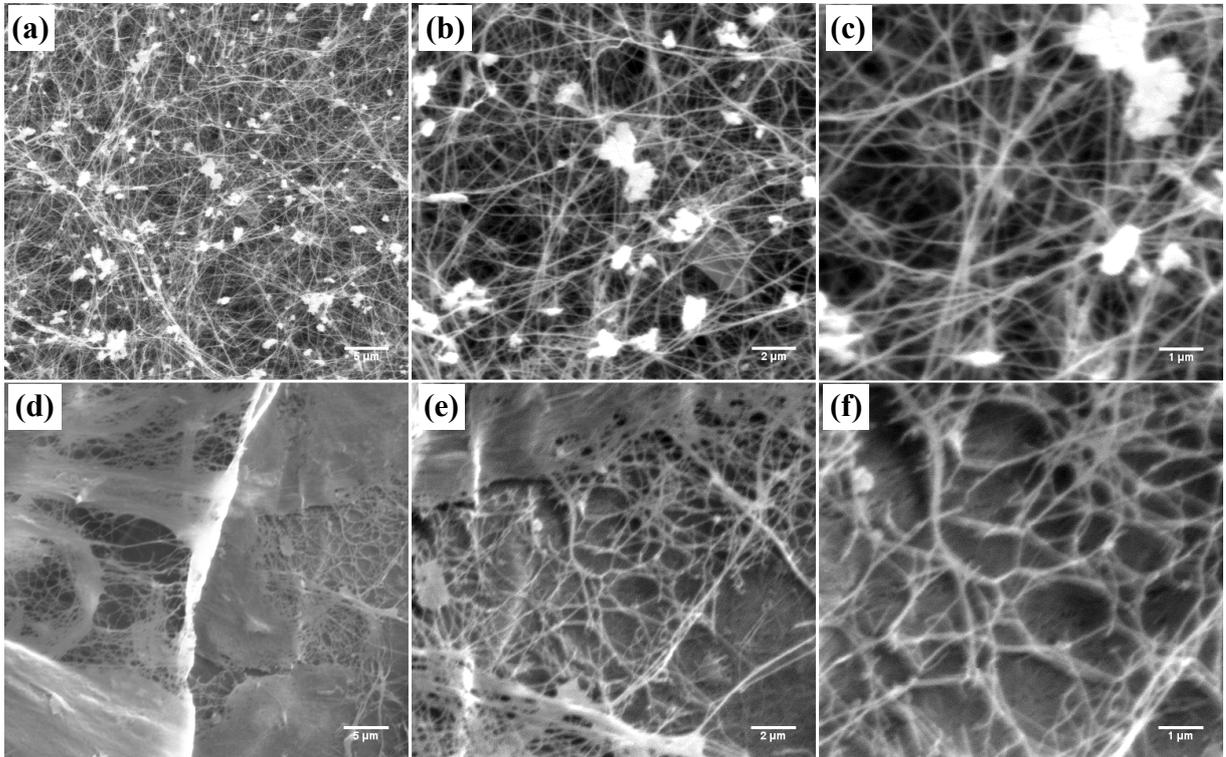
* Fonte: Gea *et al.* (2011)

5.7.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias da CB HS e CB M SISAL, sob diferentes aumentos, são mostradas na Figura 23. A estrutura tipicamente nanométrica, assim como a estruturação em rede característica da CB são evidenciadas nas micrografias tanto da CB HS como da CB M SISAL. A estruturação nanométrica em rede é semelhante as micrografias da literatura (CASTRO *et al.*, 2012; CZAJA *et al.*, 2006; GU *et al.*, 2010; SHEYKHNAZARI *et al.*, 2011; HORNUNG *et al.*, 2007; JEON *et al.*, 2010).

Quanto as dimensões, não houve diferença significativa entre a largura das fibras que apresentaram valores de $80,39 \pm 23,03$ nm para a CB HS e $73,86 \pm 16,20$ nm para a CB M SISAL. De acordo com Pecoraro e colaboradores (2008) a largura das nano fibras de CB variam de 70 a 80 nm. Confirma-se portanto o caráter nanométrico da estrutura da CB obtida nesse trabalho.

Figura 23 - Micrografias da CB em diferentes aumentos: (a,b,c) CB M SISAL (d,e,f) CB HS (a,b) 2000x (c,d) 5000x (e,f) 10000x



6 CONCLUSÕES

- Para as condições estudadas, o líquido de sisal apresenta maior potencial para a produção de CB por *G. hansenii* ATCC 23769, quando comparado com o suco de caju, uma vez que foi possível a obtenção de maiores produções e rendimentos em diferentes concentrações de açúcares.
- A condição que oferece a maior produção de CB (3,6 g/L) é obtida através do cultivo de *G. hansenii* ATCC 23769 por 10 dias sob condições estáticas em frasco tipo Schott de 250 mL com adição de 34 mL de meio obtido através da diluição do líquido de sisal para 15 g/L de açúcares, com ajuste de pH para 5 e suplementação com 7,5 g/L de extrato de levedura.
- A CB obtida através da utilização do líquido de sisal como substrato apresenta propriedades semelhantes à celulose obtida em meio padrão HS quanto à capacidade de absorção de água, estabilidade térmica, pureza e dimensão das nanofibras.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar a viabilidade econômica da utilização do líquido de sisal como fonte alternativa na produção de CB em ampliação de escala.
- Avaliar a produção de CB no meio M SISAL por outras linhagens produtoras.
- Investigar a aplicação da CB obtida no presente trabalho.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA. Disponível em:

http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/caju/arvore/CONT000fr3sbpu402wyiv80084arl_aeog5af.html> Acesso em: 01 nov. 2013.

ALMEIDA, D. M.; WOSIACKI, G.; JUNIOR, G. S.; MADALOZZO, E. S.; ZANLORENZI, M. M. Crescimento do *Acetobacter xylinum* (atcc 23769) e a produção de celulose bacteriana. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 02, n. 01, p. 95-103, 2008.

AMMON, H. P. T.; EGE, W.; OPPENMANN, M.; GÖPEL, W.; EISELE, S. Improvement in the long-term stability of an amperometric glucose sensor system by introducing a cellulose membrane of bacterial origin. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 3, p. 66-471, 1995.

ANDRADE, R.; JORNELAS, J.; BRANDÃO, W. Situação atual do sisal na Bahia e suas novas possibilidades de utilização e aproveitamento. **Comunicação**. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/pdf/3_comunicacao01v9n1.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2013.

ATCC. Disponível em: <<http://www.atcc.org/products/all/23769.aspx#generalinformation>> Acesso em: 01 nov. 2013.

BACKDAHL, H.; HELENIUS, G.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; JOHANSSON, B. R.; RISBERG, B. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, p. 2141-2149, 2006.

BAE, S.; SHODA, M. Bacterial Cellulose Production by Fed-Batch Fermentation in Molasses Medium. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 5, 2004.

BARRETO, G. P. M.; SOUZA, A. C. R.; AZEREDO, H. M. C.; MERCADANTE, A. Z. Compostos bioativos em sub-produtos da castanha de caju. **Alimentos e Nutrição**, v.18, n.2, p. 207-213, 2007.

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

BHOWMICK, P. P., DEVEGOWDA, D., RUWANDEEPIKA, H. A., FUCHS, T. M., SRIKUMAR, S., KARUNASAGAR I. gcpA (stm1987) is critical for cellulose production and biofilm formation on polystyrene surface by *Salmonella enterica serovar weltevreden* in both high and low nutrient medium. **Microbial Pathogenesis**, v. 50, n. 2 , p.114-122, 2011.

BIOCEL. Disponível em: <<http://www.dmcgroup.com.br/br/detalhe-produto/medica/cirurgia-de-coluna/materiais-consumiveis/biocel/458>> Acesso em: 01 nov. 2013.

BIONEXT. Disponível em: <<http://bionext.com.br/tecnologia/celuloseBacteriana.php>> Acesso em: 01 nov. 2013.

BODIN, A.; CONCARO, S.; BRITTBURG, M.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose as a potential meniscus implant. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 1, p. 406-408, 2007.

BORGES, M. F. ; FEITOSA, T. ; TAVARES, F. C. A. ; OLIVEIRA, M. E. B. ; ROSSETTI, A. G. ; SOUSA, J. R. ;BRÍGIDA, A. I. S. ; PINHEIRO, D. G. . Avaliação e seleção de leveduras para produção de proteína unicelular a partir do pedúnculo de caju. **III Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**. Campinas: FEA, v. 1. p. 93-93, 1999

BORGES, M. F.; BRÍGIDA, A. I. S.; GOTTSCHALK, L. M. F.; ANDRADE, F. K.; BATISTA, E.; LIMA, H. L. S.; NASCIMENTO, E. S.; SOUZA, É. F.; TERZI, S. C.; PENHA E. M.; SILVA, J. P. L.; FILHO, M. S. M. S.; OLIVEIRA, E. M. M.; ROSA, M. F. Production of bacterial cellulose using *gluconacetobacter hansenii* atcc 1431 strain in synthetic medium. **1st international conference on natural fibers**, 2013.

BRACELPA. Relatório Estatístico 2010/2011. Disponível em: < <http://www.bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/estatisticas/rel2010.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2013.

BRANCO, A.; SANTOS, J. D. G.; M. PIMENTEL, M. A. M; Juan T.A. OSUNA, LIMA, L. S.; DAVID, J. M. d-Mannitol from *Agave sisalana* biomass waste. **Industrial Crops and Products**, v.32, n. 3, p. 507-510, 2010.

BRANDÃO, L. G. N.; PEREIRA, L. G. R.; AZEVÊDO, J. A. G.; SANTOS, R. D.; ARAGÃO, A. S. L.; VOLTOLINI, T. V.; NEVES, A. L. A.; ARAÚJO, G. G. L.; BRANDÃO, W. N. Valor nutricional de componentes da planta e dos co-produtos da *Agave sisalana* para alimentação de ruminantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1493-1501, 2011.

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

BUNGAY, H. R.; SERAFICA, G.; MORMINO, R. Environmental implications of microbial cellulose, In: D.L. Wise, Editor(s), **Studies in Environmental Science**, v. 66, p. 691-700, 1997.

CAMPOS, M. I. Produção e caracterização de goma xantana obtida por bioconversão do resíduo líquido de sisal (*agave sisalana*) em dois sistemas fermentativos. **Dissertação**, 2010.

CANALE, P. E.; WOLFE, R.S. Synthesis of cellulose by *Sarcina ventriculi*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 82, n. 2, p. 403-405, 1964.

CARREIRA, P.; MENDES, J. A. S.; TROVATTI, E.; SERAFIM, L. S.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. **Bioresource Technology**, v. 102, n.15, p. 7354-7360, 2011.

CASTRO M. V.; OLIVEIRA J. P.; JUNIOR M. J. M.; ASSUNÇÃO E. A. O.; BRASIL A. P.; RABELO F. L. A.; VALE, C. H. B. Análise química, físico-química e microbiológica de suco de frutas industrializados. **Revista da Rede de Ensino FTC**. Ano V, n. 12, 2007.

CASTRO, C.; ZULUAGA, R.; ÁLVAREZ, C.; PUTAUX, J. L.; CARO, G.; ROJASC, O. J.; MONDRAGON, I.; GANÁN, P. Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter Genus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1033-1037, 2012.

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

CELOBIOSE. Disponível em:

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/07/Cellulose_Sessel.svg> Acesso em: 11 jan. 2014.

CELULLON. Disponível em: <http://www.cpkelco.com/pdf/Cellulon_PX_Brochure.pdf> Acesso em: 01 nov. 2013.

CHAGAS, C. M. A.; HONORATO, T. L.; PINTO. G. .A. S.; MAIA, G. A.; RODRIGUES, S. Dextranase production using cashew apple juice as substrate: effect of phosphate and yeast extract addition. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, n. 30, p. 207–215, 2007

CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107-124, 2009.

CHEN, L.; HONG, F.; YANG, X.; HAN, S. Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism. **Bioresource Technology**, Disponível em 17 de outubro de 2013.

CIANCI, F. C.; SILVA, L. F. M.; CABRAL, L. M. C.; MATTA, V. M. Clarificação e concentração de suco de caju por processos com membranas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 579-583, 2005.

CIECHAŃSKA, D. Multifunctional bacterial cellulose/chitosan composite materials for medical applications. **Fibres and Textiles in Eastern Europe**, v. 12, n. 4, p. 69-72, 2004.

ÇOBAN, E. P. L.; BIYIK, H. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter lovaniensis* HBB5. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 27, p. 5346-5354, 2011.

CORRÊA, A. C. Preparação de nanofibras de celulose a partir de fibras de carauá para desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos com EVA. São Carlos UFScar, **Tese** doutorado 130f, 2010.

COSTA, F. J. L.; OLIVEIRA, J. A. P.; VASCONCELOS, P. M. Estudo da estabilidade do suco de caju límpido (cajuína *anacardium occidentale, l*), produção caseira do município de pacajus - ce. **Boletim**. Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, 1986.

COSTA, M. C. O. Estudo da estabilidade do suco de caju (*Anacardium occidentale L.*) preservado pelos processos hot fill e asséptico. **Dissertação** de mestrado, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Ceará, 80p, 1999.

CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ, A.; BIELECKI, S. R.; BROWN, M. J. Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, p. 45-151, 2006.

DAELE, Y. V.; REVOL, J. F.; GAILL, F.; GOFFINET, G. Characterization and supramolecular architecture of the cellulose-protein fibrils in the tunic of the sea peach (*Halocynthia papillosa*, Ascidiacea, Urochordata). **Biology of the Cell**, v. 76, n.1, p. 87-96, 1992.

DAS, S.; LACHENAL, D.; MARLIN, N. Production of pure cellulose from Kraft pulp by a totally chlorine-free process using catalyzed hydrogen peroxide. **Industrial Crops and Products**, v.49, p. 844-850, 2013.

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

DIMAGUILA, L. S. The nata de coco I - Characterization and identify of the casual organism. **The Philippine agriculturist**, v. 51, n. 6, p. 462-473, 1967.

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

ESPONJA. Disponível em: <<http://pt.dreamstime.com/imagens-de-stock-royalty-free-esponja-de-celulose-bacteriana-absorvente-amp-anti-super-image22059339>>. Acesso em: 28 nov. 2013.

EVANS, B; O'NEILL, H. M.; MALYVANH, V. P.; LEE, I.; WOODWARD, J. Palladium bacterial cellulose membranes for fuel cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v.18, n. 17, p. 917-923, 2003.

FAO. Disponível em: <

<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>> Acesso em: 11 jan. 2014.

FONSECA, J. A. V. M.; BARBOSA, M.; PINTO, N. O.; SALAN, R. S.; SOBRINHO G. D.; BRITO, N. N.; CONEGLIAN, C. M. R.; TONSO, S.; PELEGRINI, R. Tratamento de efluentes líquidos de indústria de papel e celulose. **III Fórum de Estudos Contábeis**. Faculdades Integradas Claretianas – Rio Claro, SP, Brasil, 2003.

FONTANA, J. D., SOUZA, A. M., FONTANA, C. K., TORRIANI, I. L., MORES, J. C., GAUOTTI, B. J., SOUZA, S. J., NARCISCO, G. P., Bichara, J. A., FARAH, L. F. X.: *Acetobacter* cellulose pellicle as a temporary skin substitute. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24-25, p. 253-264, 1990.

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, n. 1, p. 69-75, 2013.

FREIRE, J. M.; ABREU, C. M. P.; ROCHA, D. A.; CORRÊA, A. D.; MARQUES, N. R. Quantificação de compostos fenólicos e ácido ascórbico em frutos e polpas congeladas de acerola, caju, goiaba e morango. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.43, n.12, p.2291-2296, 2013.

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

GEA, S.; REYNOLDS, C. T.; ROOHPUR, N.; WIRJOSENTONO, B.; SOYKEABKAEW, N.; BILOTTI, E.; PEIJS, T. Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behavior of bacterial cellulose after a two-step purification process. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9105-9110, 2011.

GENGIFLEX. Disponível em: <[http://www.forp.usp.br/bdj/bdj4\(2\)/trab0142.pdf](http://www.forp.usp.br/bdj/bdj4(2)/trab0142.pdf)> Acesso em: 29 nov. 2013.

GEORGE, J.; RAMANA, K. V.; SABAPATHY, S. N.; JAGANNATH, J. H.; BAWA, A. S. Characterization of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) biopolymer: Some thermo-mechanical properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, n. 4, p. 189-194, 2005.

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, n. 3, p. 1845-1851, 2008.

GLICOSE. Disponível em: <<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/82/Beta-D-Glucopyranose.svg>> Acesso em: 11 jan. 2014.

GOELZER F. D. E. ; FARIA, T. P. C. S. ; VITORINO J. C. ; SIERAKOWSKI M. R. ; TISCHER C. A. Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 2, p. 546-551, 2009.

GOMES, F. P.; SILVA, N. H. C. S.; TROVATTI, E.; SERAFIM, L. S.; DUARTE, M. F.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P.; FREIRE, C. S. R. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue, **Biomass and Bioenergy**, v. 55, p. 205-211, 2013.

GOSSELE, F.; SWINGS, J. Identification of a nata-producing bacterium as *Acetobacter hansenii*. **The Philippine Journal of Science**, v. 114, n. 3-4, p. 179-182, 1985.

- GOTTSCHALK, L. M. F.; BRÍGIDA, A. I. S.; PENHA, E. M.; SILVA, J. P. L.; SOUZA, E. F.; TERZI, S. C.; VIANA, L. A. N.; OLIVEIRA, E. M. M.. Avaliação da fonte de nitrogênio na produção de celulose bacteriana pela cepa *gluconacetobacter hansenii* atcc 1431 em meio sintético. **XIX Simpósio nacional de bioprocessos**, 2013.
- GU, J.; CATCHMARK, J. M. Impact of hemicelluloses and pectin on sphere-like bacterial cellulose assembly. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 547-557, 2012.
- HA, J. H.; SHEHZAD, O.; KHAN, S.; LEE, S. Y.; PARK, J. W.; KHAN, T.; PARK, J. K. Production of bacterial cellulose by a static cultivation using the waste from beer culture broth. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 25, n. 4, p. 812-815, 2008.
- HELENIUS, G.; BACKDAHL, H.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; GATENHOLM, P.; RISBERG, B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.76, n.2, p.431-8. 2006.
- 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, n. 2, p. 345-352, 1954.
- HOENICH, N. A. Cellulose for medical applications: past, present, and future. **Bioresources**, v. 1, n. 2 , 2006.
- HONG, F.; QIU, K. An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain *Acetobacter aceti subsp. xylinus* ATCC 23770. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 3, 2008
- HONORATO, T. L; RABELO, M. C.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Produção de ácido láctico e dextrana utilizando suco de caju como substrato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 254-258, 2007.
- HORNUNG, M.; LUDWIG, M.; SCHMAUDER, H. P. Optimizing the Production of Bacterial Cellulose in Surface Culture: A Novel Aerosol Bioreactor Working on a Fed Batch Principle (Part 3). **Engineering in Life Sciences**, v.7, n. 1, p. 35-41, 2007.
- HUANG, H. C.; CHEN, L.; LIN, S.; HSU, C.; CHEN, H. In situ modification of bacterial cellulose network structure by adding interfering substances during fermentation, **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6084-6091, 2010
- HUNGUND, B. S.; GUPTA, S. G. Improved Production of Bacterial Cellulose From *Gluconacetobacter Persimmonis* GH-2. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v.2, n. 5, p. 127-133, 2010.
- HUNGUND, B. S; PRABH, S.; SHETTY, C.; ACHARYA, S.; PRABHU, V.; SG, G. Production of Bacterial Cellulose from *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2 using Dual and Cheaper Carbon Sources. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 5, n. 2, p. 031-033, 2013.

IAL. Instituto Adolf Lutz. Normas Analíticas: métodos químicos e físicos para a análise de alimentos. São Paulo, 4 ed.: **Instituto Adolfo Lutz**, 2008.

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**, v. 35, n. 2, p. 261-270, 2000.

ISHIHARA, M.; MATSUNAGA, M.; HAYASHI, N.; TIŠLER, V. Utilization of d-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 986-991, 2002.

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, n. 1, p. 307-313, 2010.

JIPA, I. M.; GUZUN, A. S.; STROESCU, M. Controlled release of sorbic acid from bacterial cellulose based mono and multilayer antimicrobial films, **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 400-406, 2012.

JOHNSON, D. C.; WINSLOW, A. R. Bacterial cellulose has potential application as new paper coating. **Pulp & Paper**, p. 105-107, 1990.

JUNG, H. I.; LEE, O. M.; JEONG, J. H.; JEON, Y. D.; PARK, K. H.; KIM, H.S.; AN, W. G.; SON, H. J. Production and Characterization of Cellulose by *Acetobacter* sp. V6 Using a Cost-Effective Molasses–Corn Steep Liquor Medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 486–497, 2010.

JUNG, J. Y.; PARK, J. K.; CHANG, H. N. Bacterial cellulose production by *Glucoacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 3, p. 347-354, 2005.

KAMARUDIN, S.; SAHAID, M. K.; SOBRI, M. T.; MOHTAR, W. W. Y.; RADIAH, D. A. B.; NORHASLIZA, H. Different Media Formulation on Biocellulose Production by *Acetobacter xylinum* (0416). **Pertanika Journal of Science & Technology**, v. 21, n. 1, 2013.

KESHK, S. M. A. S. Vitamin C enhances bacterial cellulose production in *Glucoacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, n.2, p. 98-100, 2014.

KESHK, S.; SAMESHIMA, K. Influence of lignosulfonate on crystal structure and productivity of bacterial cellulose in a static culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 4-8, 2006.

KIRIMURA, K.; HONDA, Y.; HATTORI, T. 3.14 - Gluconic and Itaconic Acids. **Murray. Comprehensive Biotechnology (Second Edition)**, Academic Press, Burlington, p. 143-147, 2011.

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

- KOBAYASHI, S.; SAKAMOTO, J.; KIMURA, S. In vitro synthesis of cellulose and related polysaccharides. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1525-1560, 2001.
- KOBAYASHI, S.; SHODA, S. I.; DONNELLY, M. J.; CHURCH, S. P. Enzymatic Synthesis of Cellulose. **Carbohydrate Biotechnology Protocols. Methods in Biotechnology™**, v.10, p. 57-69, 1999.
- KONGRUANG, S. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 148, p. 245–256, 2008
- KOUDA, T.; NARITOMI, T.; YANO, H.; YOSHINAGA, F. Effects of oxygen and carbon dioxide pressures on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in aerated and agitated culture. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 2, p. 24-127,1997.
- KOUDA, T.; NARITOMI, T.; YANO, H.; YOSHINAGA, F. Inhibitory effect of carbon dioxide on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in agitated culture, **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 3, p. 318-321, 1998.
- KOWALSKA, L. K.; CALA, J.; GROBELSKI, B.; SYGUT, D.; KUPNICKA, J. D.; KOLODZIEJCZYK, M.; BIELECKI, S.; PASIEKA, Z. Modified bacterial cellulose tubes for regeneration of damaged peripheral nerves. **Archives of Medical Science**, v. 9, n. 3, p. 527-534, 2013.
- KRYSTYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; CZAJA, W.; RZYSKA, M. Application of bacterial cellulose for clarification of fruit juices. **Progress in Biotechnology**, Elsevier, v. 17, p. 323-327, 2000.
- 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, n 2, p. 333-335, 2009.
- LAVOINE, N.; DESLOGES, I.; DUFRESNE, A.; BRAS, J. Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 2, p. 735-764, 2012.
- LI, Y.; MAI, Y.; YE, L. Sisal fibre and its composites: a review of recent developments. - **Composites Science and Technology**, v. 60, p. 2037-2055, 2000.
- LIN, D., SANCHEZ, P. L.; LI, R.; LI, Z. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source, **Bioresource Technology**, v. 151, 2014, p. 113-119, 2014.
- LIN, W. C.; LIEN, C. C.; YEH, H. J., YU, C. M.; HSU, S. H. Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 603-611, 2013.

LIGAÇÕES. Disponível em:

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a4/Cellulose_strand.svg> Acesso em: 11 jan. 2014.

LISDIYANTI, P.; NAVARRO, R. R.; UCHIMURA, T.; KOMAGATA, K. Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp.nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp.nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2101-2111, 2006.

LOPES, J.L.; MACHADO, J.M.; CASTANHEIRA, L.; GRANJA, P.L.; GAMA, F.M., DOURADO, F., GOMES, J.R. Friction and wear behaviour of bacterial cellulose against articular cartilage. **Wear**, v. 271, n. 9–10, p. 2328-2333, 2011.

MA, T.; KAIHUA, J.; WEI, W.; JINGHONG, W.; ZHAOYU, L.; HAITAO, R.; BIN, L.; GUOQIANG, L. Cellulose synthesized by *Enterobacter* sp. FY-07 under aerobic and anaerobic conditions. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 18-23, 2012.

MADALOZZO, E. S.; ALMEIDA Denise Milléo; JUNIOR, G. S.; LEAL, E. S.; CARNEIRO, P. I. B. Obtenção de *acetobacter xylinum* bacteria's cepas isolated from the capim- limão's leaves in nature. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR. **Série em Ciência e Tecnologia de Alimentos: agroindústria, energia e meio ambiente** - Campus Ponta Grossa - Paraná - Brasil, v. 2, n. 12, 2008.

MÃE. Disponível em: <http://2.bp.blogspot.com/-dJqdihtzlGc/ULznEyWVx_I/AAAAAAAAA9K8/Hj6QG98W7As/s1600/m%C3%A3e+do+vinagre+2.jpg> Acesso em: 01 nov. 2013.

MAIA, G. A.; MONTEIRO, J. C. S.; GUIMARAES, A. C. L. Estudo da estabilidade físico-química e química do suco de caju com alto teor de polpa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 21, n. 1, p.43-46, ISSN 0101-2061, 2001.

MARTIN, A. R.; MARTINS M. A.; MATTOSO, L. H. C.; SILVA, O. R. R. F. Química e Estrutural de Fibra de Sisal da Variedade *Agave sisalana*. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n.1, p. 40-46, 2009.

MASAOKA, S.; OHE T.; SAKOTA, N. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 1, p. 18-22, 1993.

MENBRACEL. Disponível em: <<http://www.msahospitalar.com.br/web/membracel/>> Acesso em: 29 nov. 2013.

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

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

MONTEIRO, C.; SAXENA, I.; WANG, X.; KADER, A.; BOKRANZ, W.; SIMM, R.; NOBLES, D.; CHROMEK, M.; BRAUNER, A.; BROWN, R. M. J.; RÖMLING, U. Characterization of cellulose production in *Escherichia coli* Nissle 1917 and its biological consequences. **Environmental Microbiology**, v.11, n. 5, p. 1105-1116, 2009.

NAKAGAITO, A. N.; IWAMOTO, S.; YANO, H. Bacterial cellulose: the ultimate nano-scalar cellulose morphology for the production of high-strength composites. **Applied Physics A**, v. 80, n. 1, p. 93-97, 2005.

NARITOMI, T.; KOUDA, T.; YANO, H.; YOSHINAGA, F. Effect of Lactate on Bacterial Cellulose Production from Fructose in Continuous Culture. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 1, p. 89-95, 1998.

NATA. Disponível em: http://3.bp.blogspot.com/-40H0qpcQoDc/TudFt4_2WcI/AAAAAAAAAA8/J4UuYpq4t70/s1600/nata-de-coco.jpg> Acesso em: 01 nov. 2013.

NETO, P. O.; LEITE, O. D.; OGAVA, L. E.; LIMA, J. P. Desenvolvimento de pesquisa com a planta *agave sisalana* e seus derivados. **Universidade estadual paulista**, 2005.

NGUYEN, V. Y.; FLANAGAN B., GIDLEY M. J., DYKES G. A., Characterization of cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from kombucha. **Current Opinion in Microbiology**, v. 57, p. 449–453, 2008.

OKIYAMA, A.; MOTOKI, M.; YAMANAKA, S. Bacterial cellulose III. Development of a new form of cellulose. **Food Hydrocolloids**, v. 6, n. 6, p. 493-501, 1993.

OLIVEIRA, D. W. F.; FRANÇA, I. W. L.; FÉLIX, A. K. N.; MARTINS, J. J. L.; GIRO, M. E. A.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, n. 01, p. 34-43, 2013.

OLIVEIRA, M. E. B.; OLIVEIRA, G. S. F.; MAIA, G. A.; MOREIRA, R. A.; MONTEIRO, A. C. O. Aminoácidos livres majoritários no suco de caju: variação ao longo da safra. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v.24, n.1, p. 133-137, 2002.

PAIVA, F. F. A.; GARRUTI, D. S.; SILVA, N. R. M. Aproveitamento Industrial do caju. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT/SEBRAE/CE, 88p. il, **EMBRAPA-CNPAT. Documentos**, 38. 2000.

PANESAR, P. S.; CHAVAN, Y.; CHOPRA, H. K.; KENNEDY, J. F. Production of microbial cellulose: Response surface methodology approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, 2012.

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

- PASTORKOVA, E.; ZAKOVA, T.; LANDA, P.; NOVAKOVA, J.; VADLEJCH, J.; KOKOSKA, L. Growth inhibitory effect of grape phenolics against wine spoilage yeasts and acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, n. 3, p. 209-213, 2013.
- PECORARO, É.; MANZANI, D.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Bacterial Cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: Preparation, Properties and Applications. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**, p. 372, 2008.
- PEREIRA, J. C. D.; STURION, J. A.; HIGA, A. R.; HIGA, R. C. V.; SHIMIZU, J. Y. Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil. **Colombo: Embrapa Florestas. Documentos**, 38, 113p, 2000.
- PHUNSRI, A.; TAMMARATE, P.; KRUSONG, W.; TANTRATIAN, S. The Liquid/Air Interface Area and Depth of Liquid Medium Suitable for Cellulose Production from *Acetobacter* TISTR 975. **J. Sci. Res. Chula. Univ.**, v. 28, n. 1, 2003.
- 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, n. 1, p. 98-103, 2006
- PIOTTO, Z. C. Eco-eficiência na indústria de celulose e papel – estudo de caso. **Tese de doutorado** – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária. São Paulo, 379 p., 2003.
- PIZARRO, A. P. B., FILHO, A. M. O.; PARENTE, J. P.; MELO, M.T.V.; SANTOS, C. E.; LIMA, P. R. - O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n.1, p. 23-29, 1999.
- QURESHI, O.; SOHAIL, H.; LATOS, A.; STRAP, J. L. The effect of phytohormones on the growth, cellulose production and pellicle properties of *Glucanacetobacter xylinus* ATCC 53582. **Acetic Acid Bacteria**, v. 2, 2013.
- RABELO, M. C.; FONTES, C. P. M. L.; RODRIGUES, S. Enzyme synthesis of oligosaccharides using cashew apple juice as substrate, **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5574-5580, 2009.
- RANI, M. U.; APPAIAH K, A. A. *Glucanacetobacter hansenii* UAC09 - mediated transformation of polyphenols and pectin of coffee cherry husk extract. **Food Chemistry**, v. 130, n. 2, p. 243-247, 2012.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.
- ROMAN, M.; WINTER, W. T. Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose. **Biomacromolecules**, v.5, n. 5, p. 1671–1677, 2004.

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

RUKA, D. R.; SIMON, G. P.; DEAN, K. M. In situ modifications to bacterial cellulose with the water insoluble polymer poly-3-hydroxybutyrate. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1717-1723, 2012.

SANCHO, S. O.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W.; RODRIGUES, S.; SOUSA, P. H. M. Alterações químicas e físico-químicas no processamento de suco de caju (*Anacardium occidentale L.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 878-882, 2007

SANTOS, J. D. G.; ESPELETA, A. F.; BRANCO, A.; ASSIS, A. A. Aqueous extraction of pectin from sisal waste. **Carbohydrate Polymers**, v. 92 p. 1997-2001, 2013.

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

SAXENA, I. M.; BROWN, R. M. J. Biosynthesis of cellulose, In: Noriyuki Morohoshi and Atsushi Komamine, Editor(s). **Progress in Biotechnology**, Elsevier, v.18, p. 69-76, 2001.

SEGAL, L.; CONRAD, C. M. Characterization of cellulose derivatives by means of the x-ray diffractometer. **American Dyestuff Reporter**, v. 46, p. 637-642, 1957.

SHAH, J.; BROWN, R. M. J. Towards electronic paper displays made from microbial cellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 4, p. 352-5, 2005.

SHARMA, A.; VIVEKANAND, V.; SINGH, R. P. Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3444-3450, 2008

SHARMA, S.; VARSHNEY, K. Chemical analysis of *agave sisalana* juice for its Possible utilization. **Acta Chimica & Pharmaceutica Indica**, v. 2, n.1, 2012.

SHENOY, D.; PAI, A.; VIKAS, R. K.; NEERAJA, H. S.; DEEKSHA, J. S.; NAYAK, C.; RAO, C. V. A study on bioethanol production from cashew apple pulp and coffee pulp waste. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 10, p. 4107-4111, 2011.

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

SHEZADA, O.; KHANA, S.; KHANB, T.; PARKA, J. Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simple fed-batch cultivation strategy. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 173-180, 2010 .

SHI, Z.; ZHANG, Y.; PHILLIPS, G. O.; YANG, G. Utilization of bacterial cellulose in food, **Food Hydrocolloids**, 2013.

- SHODA, M.; SUGANO, Y. Recent advances in bacterial cellulose production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 10 n. 1, 2005.
- SILVA, O. R. R. F.; SILVA, C. D.; MEDEIROS, E. P.; SARAIVA, J. P.; ALBUQUERQUE F. A.; SOUSA, M. F.; MIRANDA, J. E. Primary evaluation of the sisal insecticide (*agave sisalana*) against bovine tick and plagues in cotton and soy. 2010.
- SILVA, O. R. R., BELTRÃO, N. E. M. O Agronegócio do sisal no Brasil. Brasília, Brasil: **Embrapa-CNPq**, p. 204-205, 1999.
- SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.
- SON, H.; KIM, H.; KIM, K.; KIM, H. So.; KIM, Y.; LEE, S. Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions. **Bioresource Technology**, v. 86, n. 3, p. 215-219, 2003.
- STUMPF, T. R.; PÉRTILE, R. A. N.; RAMBO, C. R.; PORTO, L. M. Enriched glucose and dextrin mannitol-based media modulates fibroblast behavior on bacterial cellulose membranes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 8, 2013, p. 4739-4745, 2013.
- TAKAI, M.; NONOMURA, F.; INUKAI, T.; FUJIWARA, M.; HAYASHI, J. Filtration and permeation characteristics of bacterial cellulose composite. **Sen'i Gakkaishi**, v. 47, n. 3, p. 119-129, 1991.
- TANSKUL, S.; AMORNTHATREE, K.; JATURONLAK, N. A new cellulose-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. MI 2: screening and optimization of culture conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 421-8, 2013.
- 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 Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1417-1420, 2011.
- UMMARTYOTIN, S.; JUNTARO, J.; SAIN, M.; MANUSPIYA, H. Development of transparent bacterial cellulose nanocomposite film as substrate for flexible organic light emitting diode (OLED) display. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 92-97, 2012.
- VANDAMME, E. J., BAETS, S., VANBAELEN, A., JORIS, K., WULF, P. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1-3, p. 93-99, 1998.
- VIEIRA, L. M.; SOUSA, M. S. B.; FILHO, J. M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 3, p. 888-897, 2011.
- VISICK, K. L. An intricate network of regulators controls biofilm formation and colonization by *Vibrio fischeri*: Micro Review. **Molecular Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 782-789, 2009.

WATANABE, K.; ETO, Y.; TAKANO, S.; NAKAMORI, S.; SHIBAI, H.; YOSHINAKA, S. A new bacterial cellulose substrate for mammalian cell culture. **Cytotechnology**, v. 13, n. 2, p. 107-114, 1993.

WATANABE, K.; TABUCHI, M.; MORINAGA, Y.; YOSHINAGA, F. Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. **Cellulose**, v. 5, n. 3, p. 187-200, 1998.

WEE, Y. J.; KIM, S. Y.; YOON, S. D.; RYU, H. W. Isolation and characterization of a bacterial cellulose-producing bacterium derived from the persimmon vinegar. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n.72, p. 16267-16276, 2011.

WEI, B.; YANG, G.; HONG, F. Preparation and evaluation of a kind of bacterial cellulose dry films with antibacterial properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p.533–538, 2011.

WILLIAMS, A.; WILKINSON, A.; KREHENBRINK, M.; RUSSO, D.M.; ZORREGUIETA, A.; DOWNIE, J.A. Glucomannan-mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 13, p. 4706-4715, 2008.

WONG, S. S.; KASAPIS, S.; HUANG, D. Molecular weight and crystallinity alteration of cellulose via prolonged ultrasound fragmentation. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 2, p. 365-369, 2012.

WONG, S. S.; KASAPIS, S.; TAN, Y. M. Bacterial and plant cellulose modification using ultrasound irradiation. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 280-287, 2009.

WU, S.; LIA, Y. Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, n. 3–4, p. 103-108, 2008.

WU, Z. Y.; LI, C.; LIANG, H. W.; CHEN, J. F.; YU, S. H. Ultralight, flexible, and fire-resistant carbon nanofiber aerogels from bacterial cellulose. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 10, p. 2925-2929, 2013.

YAMANAKA, S.; WATANABE, K.; KITAMURA, N.; IGUCHI, M.; MITSUHASBI, S.; NISHI, Y.; URYU, M. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. **Journal of Materials Science**, v. 24, n. 9, p. 3141-3145, 1989.

YAN, Z.; CHEN, S.; WANG, H.; WANG, B.; JIANG, J. Biosynthesis of bacterial cellulose/multi-walled carbon nanotubes in agitated culture. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 659–665, 2008.

YANG, G., XIE, J.; DENG, Y.; BIAN, Y.; HONG, F. Hydrothermal synthesis of bacterial cellulose/AgNPs composite: A “green” route for antibacterial application. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 4, p. 2482-2487, 2012.

YANG, Y. K.; PARK, S. H.; HWANG, J. W.; PYUN, Y. R.; KIM, Y. S. Cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 under agitated condition. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 3, p. 312-317, 1998.

YAO, W.; WU, X.; ZHU, J.; SUN, B.; ZHANG, Y. Y.; MILLER, C. Bacterial cellulose membrane – A new support carrier for yeast immobilization for ethanol fermentation. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 2054-2058, 2011.

YASUHARA, T.; NOKIHARA, K. High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n.10, p. 4581-4583, 2001.

YODSUWAN, N.; OWATWORAKIT, A.; NGAOKLA, A.; TAWICHAI, N.; SOYKEABKAEW, N. Effect of carbon and nitrogen sources on bacterial cellulose production for bionanocomposite materials. **1st Mae FahLuang University International Conference 2012**.

YOSHINAGA, F.; TONOUCI N.; WATANABE K. Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, p. 219–224, 1997.

YOSHINO, A.; TABUCHI, M.; UO, M.; TATSUMI, H.; HIDESHIMA, K.; KONDO, S.; SEKINE, J. Applicability of bacterial cellulose as an alternative to paper points in endodontic treatment. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 4, p. 6116-6122, 2013.

YOUSEFI, H.; FAEZIPOUR, M.; HEDJAZI, S.; MOUSAVI, M. M.; AZUSA, Y.; HEIDARI A. H. Comparative study of paper and nanopaper properties prepared from bacterial cellulose nanofibers and fibers/ground cellulose nanofibers of canola straw. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 732-737, 2013.

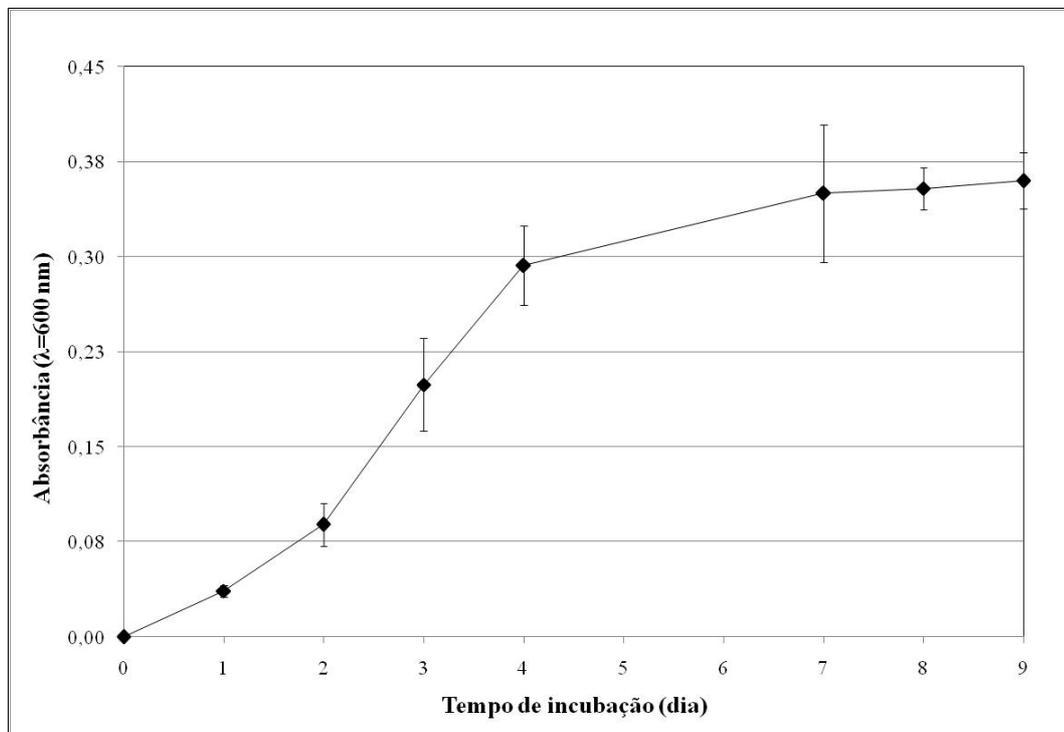
ZENG, X.; SMALL, D. P.; WAN, W. Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 506-513, 2011.

ZHOU, L. L.; SUN, D.P.; HU, L.Y.; LI, Y.W.; YANG, J. Z. Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, n. 34, p. 483–489, 2007.

APÊNDICE A

Em estudos preliminares, a cinética de crescimento da cepa *G. hansenii* ATCC 23769 em meio caldo HS, nas condições de produção do inóculo, foi avaliada através da variação da absorvância do meio (Figura A1). Admitiu-se o aumento da turbidez do meio a partir do meio estéril como indicativo de aumento da biomassa. O tempo de 3 dias foi considerado ideal por ser um indicativo da fase logarítmica de crescimento microbiano. De acordo com Borges *et al.* (2013) a absorvância está diretamente relacionada com a concentração de células ativas.

Figura A1 - Variação da absorvância do inóculo de *G. hansenii* ATCC 23769 com o tempo de incubação em caldo HS a 30°C, sob cultivo estático.



APÊNDICE B

Resultados da etapa de seleção do substrato alternativo.

Tabela B1: Efeito da concentração de açúcar na produção de CB por *G. hansenii* ATCC 23769 utilizando líquido de sisal como fonte alternativa de carbono

Açúcares (g/L)	Nitrogênio (g/L)	Celulose (g/L)	Y_{P/S} (%)	Açúcar consumido (g/L)	pH final
2,5	0,10	0,66 ± 0,04 ^a	29,54 ± 1,79 ^a	2,24 ± 0,11 ^a	8,58 ± 0,08 ^a
5	0,21	0,97 ± 0,03 ^a	25,48 ± 0,91 ^a	3,82 ± 0,20 ^{ac}	8,80 ± 0,03 ^a
7,5	0,31	1,42 ± 0,08 ^b	27,29 ± 1,44 ^a	5,22 ± 0,08 ^{bd}	8,61 ± 0,28 ^a
10	0,41	1,99 ± 0,13 ^c	26,76 ± 1,78 ^a	7,43 ± 0,14 ^b	8,68 ± 0,29 ^a
15	0,62	2,60 ± 0,19 ^d	25,45 ± 1,81 ^a	10,24 ± 0,65 ^{bc}	8,35 ± 0,22 ^a

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

Tabela B2: Efeito da concentração de açúcar na produção de CB por *G. hansenii* ATCC 23769 utilizando suco de caju como fonte alternativa de carbono

Açúcares (g/L)	Nitrogênio (g/L)	Celulose (g/L)	Y_{P/S} (%)	Açúcar consumido (g/L)	pH final
2,5	0,01	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	5,15 ± 0,01 ^b
5	0,01	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,43 ± 0,22 ^a	5,11 ± 0,03 ^b
7,5	0,02	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	1,00 ± 0,38 ^a	4,94 ± 0,01 ^b
10	0,03	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	4,76 ± 0,47 ^b	5,01 ± 0,02 ^{ab}
15	0,04	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	5,92 ± 0,85 ^b	4,92 ± 0,01 ^{ab}
20	0,06	0,21 ± 0,00 ^b	2,95 ± 0,00 ^b	6,98 ± 0,58 ^b	5,02 ± 0,01 ^{ab}
30	0,09	0,25 ± 0,01 ^b	2,80 ± 0,09 ^b	9,08 ± 1,08 ^b	5,06 ± 0,02 ^{ab}
50	0,15	0,34 ± 0,04 ^c	1,61 ± 0,20 ^c	21,16 ± 1,27 ^b	4,93 ± 0,00 ^{ab}
75	0,22	0,32 ± 0,02 ^c	0,87 ± 0,04 ^d	37,22 ± 1,25 ^b	4,86 ± 0,01 ^a
100	0,30	0,37 ± 0,00 ^c	1,19 ± 0,01 ^d	31,37 ± 1,06 ^b	4,89 ± 0,01 ^a

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

APÊNDICE C

Resultados da etapa de variação de pH.

Tabela C1 – Efeito do pH inicial de fermentação na produção de CB por *G. hansenii* ATCC 23769 utilizando líquido de sisal como fonte alternativa de carbono

pH inicial	Celulose (g/L)	Y_{P/S} (%)	Açúcar consumido (g/L)	pH final
3	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	2,78 ± 0,03 ^a
4	1,32 ± 0,23 ^b	10,54 ± 1,84 ^b	12,53 ± 0,91 ^b	4,95 ± 0,02 ^b
5	2,60 ± 0,11 ^c	23,29 ± 1,00 ^c	11,17 ± 0,90 ^{bc}	7,20 ± 0,07 ^c
6	2,62 ± 0,17 ^c	19,07 ± 1,25 ^d	13,75 ± 0,15 ^d	6,57 ± 0,05 ^d
7	1,92 ± 0,19 ^d	17,44 ± 1,74 ^d	10,99 ± 0,44 ^c	7,43 ± 0,12 ^e
8	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	13,39 ± 0,49 ^d	7,53 ± 0,13 ^e

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

APÊNDICE D

Resultados da etapa de variação da relação volume/área.

Tabela D1 – Influência da relação volume/área na produção de CB em g/L, g/m² e na espessura da película em meio M SISAL por *G. hansenii* ATCC 23769

Quantidade de meio (mL/cm ²)	Celulose (g/m ²)	Celulose (g/L)	Espessura (mm)
0,6	10,48 ± 0,10 ^a	1,65 ± 0,01 ^a	0,08 ± 0,02 ^a
1,2	45,93 ± 0,22 ^b	3,61 ± 0,00 ^b	0,99 ± 0,19 ^b
1,8	57,06 ± 0,15 ^b	2,99 ± 0,02 ^c	1,95 ± 0,17 ^c
2,4	57,57 ± 0,16 ^b	2,26 ± 0,01 ^d	2,85 ± 0,20 ^d
3,0	74,76 ± 0,08 ^c	2,35 ± 0,01 ^d	3,15 ± 0,18 ^d
3,6	68,83 ± 0,09 ^c	1,80 ± 0,01 ^d	2,85 ± 0,17 ^d

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