



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

ELÍGENES SAMPAIO DO NASCIMENTO

**EXTRATO DE ALGAROBA COMO FONTE ALTERNATIVA PARA
PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA**

FORTALEZA

2014

ELÍGENES SAMPAIO DO NASCIMENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Dra. Morsyleide de Freitas Rosa.

Co-Orientadora: Dra. Maria de Fatima Borges.

FORTALEZA

2014

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pois grandes são as maravilhas do teu poder e amor dedicado a mim, por isso consagro a ti meu mais puro reconhecimento e alegria pela concretização deste trabalho;

Ao meu querido esposo Edney, por sonhar meus sonhos junto comigo e compreender cada segundo dedicado aos meus estudos;

À minha mãe Raquel que sempre me incentivou em minhas escolhas e que me ensinou a dar o verdadeiro valor à vida;

À minha orientadora Dra. Morsyleide pela paciência, sabedoria e compreensão, a mim dedicados. Sua orientação foi fundamental para meu crescimento acadêmico.

À Dr^a Fátima Borges pela co-orientação, paciência e dedicação no desenvolvimento deste trabalho

Às pesquisadoras Dra. Ana Iraidy e Dra. Fábila, pelo direcionamento e apoio no desenvolvimento deste trabalho;

Ao Dr. Mén de Sá pelos sábios conselhos e que desde o princípio dedicou-se de forma incessante, trazendo sempre boas ideias para o crescimento do trabalho;

Ao amigo Helder pelo compartilhamento dos momentos de estudo, alegrias, angústias e principalmente pela amizade construída;

À Lilian, pela amizade e grande dedicação no dia-a-dia do laboratório, em cada análise, em cada equipamento, colaborando e cuidando, sempre, para que tudo acontecesse com responsabilidade.

À todos os colegas do Laboratório de Tecnologia da Biomassa: Mabel, Nágila, Rafael, Paulo, Socorro, Éden, André, Celso, Gleyciara, João Paulo, Ana Cassales, Menta, Diego, Clauber, Vitória, Gabi, Alex, Niédja, Gleycielle, Michael, Quézia, Edla, Fábio, Aurélio, Amanda, Carlos, Hálisson, Rayanne, Jéssica, Manu, Marcos, pelos momentos de discussões, descontração e risadas que fizeram parte dos nossos dias e que fazem da gente uma equipe forte e determinada.

Às meninas do laboratório de microbiologia de alimentos da Embrapa.

À Embrapa Agroindústria Tropical pelo apoio técnico e infra-estrutura

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

E, enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para tornar possível a realização deste trabalho. Muito Obrigada!

*Eu aprendi...
...que realmente posso suportar...que realmente sou forte, e que posso ir mais
longe, depois de pensar que não posso mais.*

(William Shakespeare)

A Deus

Ao meu esposo Edney

A minha mãe Raquel

RESUMO

A celulose bacteriana (CB) é um biomaterial naturalmente nanométrico, com elevado grau de pureza e excelentes propriedades químicas e mecânicas. Existem na natureza fontes renováveis e resíduos ricos em açúcares que despertam um crescente interesse como meios alternativos em substituição aos tradicionalmente empregados na produção de celulose. O objetivo deste estudo foi avaliar o extrato de vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*) como fonte alternativa para produção de CB através de fermentação por *Gluconacetobacter hansenii*. O extrato foi caracterizado quanto à quantidade de açúcares, pH e sólidos solúveis. Através da fermentação do extrato foram realizados testes de influência da concentração inicial de açúcares, influência do pH e efeito da variação da suplementação com fonte de nitrogênio sobre a produção de CB. A melhor produção foi proveniente da fermentação do extrato de algaroba diluído a uma concentração de açúcares de 30 g/L com pH 4,0 suplementado com 10 g/L de extrato de levedura. As películas obtidas do extrato com condições melhoradas foram secas em estufa e caracterizadas por difração de raios x (DRX), espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), e apresentaram resultados típicos de celulose bacteriana quando comparados à CB produzida no meio de referência HS. Assim, foi possível mostrar a viabilidade de produção de CB com extrato aquoso de vagens de algaroba.

Palavras-chave: celulose bacteriana, algaroba, fermentação

ABSTRACT

Bacterial cellulose (BC) is a naturally nanoscale biomaterial with high purity and excellent chemical and mechanical properties. There are several sugar-rich renewable sources and wastes that can be used as alternative media for bacterial cellulose production. The aim of this study was to evaluate the suitability of an extract of mesquite pods as an alternative carbohydrate source for the production of BC through fermentation by *Gluconacetobacter hansenii*. The amount of sugars, soluble solids, and pH of the extract was characterized. The influence of the initial sugar concentration, pH, and the source of supplementary nitrogen on the fermentation were evaluated. The best production of bacterial cellulose was achieved in the medium with a sugar concentration of 30 g /L, pH 4.0, and supplemented with 10 g /L of yeast extract. The films from the optimized medium were oven dried and characterized by x-ray diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR), thermal gravimetric analysis (TGA), differential scanning calorimetry (DSC) and electron microscopy (SEM). The results were similar to typical bacterial cellulose films produced in the reference medium HS. Thus, it was possible to demonstrate the suitability of mesquite pod aqueous extract to produce BC.

Keywords: bacterial cellulose, mesquite, fermentation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Algarobeira (www.ufpb.com.br).....	4
Figura 2 – Vagens de algaroba (www.redetec.org.br).....	5
Figura 3 – Representação da molécula de celulose (SANTOS et al. 2005).....	6
Figura 4 – Representação das projeções axiais de a) celulose tipo 1, b) celulose tipoll.....	7
Figura 5 – Formação de celulose bacteriana (SHI <i>et al.</i> , 2013).....	8
Figura 6 – Representação esquemática do processo Kraft (PIOTTO 2003).....	9
Figura 7 – Nata de coco (http://wongcoco.com/r1/products/nata-de-coco)	11
Figura 8 – Suco de frutas com nata de coco (http://sunlee.com/shownewsevent)	11
Figura 9 – Fluxograma de obtenção do extrato de algaroba	18
Figura 10 – Produção de CB e consumo de açúcar, em extrato de algaroba com condições melhoradas, HS modificado e em meio sintético HS em condição estática durante 15 dias de cultivo a 30°C.....	32
Figura 11 – Variação dos rendimentos durante a produção de CB no extrato de algaroba com condições melhoradas, HS modificado e HS durante 15 dias de cultivo em condição estática a 30°C.....	33
Figura 12 – Variação pH durante a produção de CB no extrato de algaroba com condições melhoradas, HS modificado e HS durante 15 dias de cultivo em condição estática a 30°C.....	34
Figura 13 – Termogramas de TGA das CB's obtidas a partir do extrato de algaroba com condições melhoradas e meio sintético de referência HS.....	35

Figura 14 – Termogramas de DSC das CBs obtidas a partir do extrato de algaroba e meio sintético de referência HS.....	37
Figura 15 – Difractogramas de raio-X das películas de CB de extrato de algaroba e meio sintético de referência HS.....	38
Figura 16 – Valores dos ângulos de contato versus tempo, medidos com água, nas CB's provenientes do extrato de algaroba com condições melhoradas e meio sintético HS.....	40
Figura 17 – Espectros de FTIR obtidos de CB's de extrato de algaroba e meio sintético de referência HS.....	42
Figura 18 – Micrografias de CB obtidas a partir do extrato de algaroba com condições melhoradas e meio HS sintético. A e B – CB algaroba 5000x e 10000x / C e D – CB HS 5000x e 10000x.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre as propriedades da celulose vegetal (CV) e celulose bacteriana (CB)	23
Tabela 2 – Característica físico-química dos extratos estéreis de algaroba de Trairi (TR) e Campina Grande (CG).....	37
Tabela 3 – Efeito da concentração inicial de açúcar na produção de CB (Δ CB) e rendimento ($Y_{CB/S}$) por <i>G. hansenii</i> , utilizando extrato de algaroba da região do Trairi como fonte alternativa.....	39
Tabela 4 – Efeito do pH inicial da fermentação na produção de CB (Δ CB) por <i>G. hansenii</i> CCT 1431 utilizando extrato de algaroba como fonte alternativa.....	41
Tabela 5 – Efeito da suplementação com extrato de levedura na produção de CB por <i>G. hansenii</i> utilizando extrato de algaroba como substrato.....	29
Tabela 6 – Resultados dos eventos da análise termogravimétrica de CB obtida a partir de extrato de algaroba com condições melhoradas e HS sintético.....	36
Tabela 7 – Frequências de absorção de infravermelhos típicas para a celulose bacteriana.....	41

SUMÁRIO

1.	Introdução	13
2.	Objetivo Geral.....	15
2.1	Objetivos Específicos.....	15
3.	Revisão Bibliográfica	16
3.1	Algaroba: uma breve abordagem.....	16
3.2	Celulose: Uma visão geral	18
3.2	Celulose Bacteriana: Características e Aplicações	19
3.3	Micro-organismos: Características e biossíntese de CB.....	23
3.4	Processos de Produção de Celulose Bacteriana: Cultivo Estático e Agitado.....	25
3.5	Variáveis do Processo em Cultivo Estático	26
3.6	Fontes Alternativas de Carbono para Produção de Celulose.....	27
3.7	Celulose Bacteriana: Propriedades.....	28
4.	Material e Métodos	29
3.2	Material: Substrato e Micro-organismo.....	29
4.2	Métodos	30
4.3	Caracterizações da película de CB	34
5.	Resultados e Discussão	36
5.1	Caracterização dos substratos.....	36
5.2	Influência da concentração inicial de açúcar na produção de CB a partir de extrato de algaroba	37
5.3	Influência do pH inicial do meio na produção de CB a partir do extrato de algaroba.....	39
5.4	Influência da suplementação do meio com fonte de nitrogênio na produção de CB.....	41
5.5	Influência do tempo de fermentação na produção de CB a partir do extrato de algaroba de Campina Grande em suas melhores condições.....	43
5.6	Caracterização das Películas.....	46
5.6.1	Análise Termogravimétrica (TGA)	46
5.6.2	Determinação da umidade da CB.....	48
5.6.3	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	49
5.6.4	Difração de Raios X (DRX).....	50
5.6.5	Ângulo de Contato	51

5.6.6	Espectroscopia do Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	53
5.6.7	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	54
6.	Conclusões.....	56

1. Introdução

O crescente interesse por materiais poliméricos biodegradáveis vem alavancando estudos que insiram fontes renováveis como matéria-prima para uma produção dentro do conceito de química verde, objetivando o desenvolvimento de produtos com um máximo de eficiência e evitando a formação de produtos nocivos ao ambiente. Dentre esses materiais com alto potencial está a celulose, polímero mais abundante na natureza e um dos principais constituintes das paredes celulares de plantas. Além de fonte vegetal, este polímero pode ser, também, sintetizado por micro-organismos.

A celulose bacteriana (CB) é um biopolímero obtido quimicamente puro a partir da fermentação de meios de cultura ricos em carboidratos. A CB possui uma estrutura naturalmente nanométrica composta por fibras reticuladas ultra-finas o que a distingue da celulose obtida a partir de plantas, que para ser obtida precisa passar por processos químicos intensos para retirar lignina, pectina e hemicelulose, dentre outros constituintes (FRICAIN *et al.* 2004; KLEM *et al.* 2005; CASTRO *et al.* 2010).

A CB possui propriedades únicas, sendo altamente pura, uniforme e biocompatível. Além destas características, a CB possui uma alta capacidade de absorção e retenção de água, é atóxica, possui elevado grau de polimerização e alta porosidade sendo possível, a partir do conhecimento dessas características, inserir a celulose bacteriana em diversos segmentos de aplicações como, indústria alimentícia e têxtil, em baterias recarregáveis, dispositivos eletrônicos, sensores químicos, térmicos e mecânicos, colas, tintas condutoras e mais recentemente está sendo muito estudada na biomedicina. (CZAJA *et al.*, 2006; WAN *et al.*, 2006, FU, ZHANG; YANG, 2013).

A CB pode ser sintetizada por vários micro-organismos e dentre eles estão as bactérias do gênero *Gluconacetobacter*. A fonte de carbono mais comumente utilizada para a produção de CB ainda é a glicose, entretanto alguns estudos também avaliaram a produção deste biopolímero a partir de outros sacarídeos como frutose, xilose e sacarose (ISHIARA *et al.*, 2002; MIKKELSEN *et al.*, 2008; KESHK, 2005)

A produção de CB a partir de fontes alternativas contendo um ou mais desses açúcares tem sido alvo de estudos com o objetivo de um aproveitamento integral de fontes agroindustriais e resíduos ricos em nutrientes, como uma alternativa aos meios sintéticos, como manitol e Hestrin e Schramm (HS) (HESTRIN; SCHRAMM, 1954; HONG; QIU 2008, VASQUEZ *et al.*, 2013). Nesse contexto, alguns resíduos agroindustriais como sucos de frutas, soro de leite, líquido da casca do café, já foram utilizados como fontes alternativas para a produção de CB (CARREIRA *et al.*, 2011; KUROSUMI *et al.*, 2009; RANI; APPAIAH, 2011). Uma alternativa possível e interessante é a algarobeira que pode ser vista como uma fonte em potencial para desenvolvimento de diversos produtos.

A algarobeira é uma planta xerófila que se adaptou bem a região Nordeste brasileira e que se caracteriza por conter vagens denominadas de algaroba que contém alto teor de carboidratos, fibras, cinzas e lipídios (SILVA *et al.*, 2007) É, normalmente, empregada na alimentação animal mas, recentemente, tem sido introduzida em diversos segmentos da indústria de alimentos, como produção de farinha, mel, bebida similar ao café, entre outros. Porém, ainda não há um aproveitamento integral do seu alto potencial biotecnológico (PEGADO *et al.*, 2006).

A identificação de novas formas de aproveitamento das vagens de algaroba é uma alternativa interessante para agregar valor a um importante recurso natural, alavancando a utilização das vagens em processos biotecnológicos de grande importância. Nesse contexto, o presente trabalho investigou a potencialidade do uso do extrato de algaroba na produção de celulose bacteriana utilizando a bactéria *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23765.

2. Objetivo Geral

Avaliar o potencial do extrato de algaroba como substrato alternativo alternativa de nutrientes para produção de celulose bacteriana.

2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de CB empregando o extrato de algaroba
- Produzir e caracterizar as CBs obtidas por meio de análises térmicas (TGA e DSC), morfológicas (MEV), raios X e FTIR

3. Revisão Bibliográfica

O presente capítulo apresenta aspectos relacionados a algaroba, as bases teóricas inerentes ao processo de produção de celulose bacteriana, suas propriedades e uso de meios alternativos.

3.1 Algaroba: uma breve abordagem

A algarobeira (Figura 1) é uma planta da família *Fabaceae* (leguminosae), subfamília Mimosodae cujo nome científico é *Prosopis juliflora*. Originária dos Andes no Peru, espalhou-se pelo México, sudoeste dos Estados Unidos, Índia, África do Sul e Austrália, Jamaica e Havaí. No Brasil chegou na década de quarenta sendo encontrada em todos os estados do Nordeste brasileiro (ALVES, 2008).

Figura 1 – Algarobeira



Fonte: www.ufpb.com.br

Em sua morfologia, destaca-se sua raiz principal que chega a atingir grandes profundidades devido a necessidade de buscar água no lençol freático. As folhas são bipinadas comumente com poucos pares de pinas opostas; folíolos pequenos e oblongos. Suas flores possuem inflorescência em espigas cilíndricas de 7cm de comprimento (RIBASKI *et al* 2009, OLIVEIRA, 2010).

A algaroba (Figura 2) é o nome dado ao fruto da algarobeira que possui a forma de vagens achatadas e um pouco curvas, com tamanho médio de 20 cm de comprimento e onde se concentra seu valor nutritivo, constituindo-se de uma rica fonte

de carboidratos com energia bruta comparável à do milho (STEIN *et al.*, 2005). A algaroba possui, ainda, excelente palatabilidade, apresentando cerca de 25 a 28% de glicose, 11 a 17% de amido, 7 a 11% de proteínas, 14 a 20% de ácidos orgânicos, pectinas e demais substâncias (SILVA; TOLEDO; ALBINO, 2001).

Figura 2 – Vagens de algaroba.



Fonte: www.redetec.org.br

As populações rurais do Nordeste brasileiro utilizam a algaroba para diferentes fins. Após serem trituradas, de forma artesanal, a algaroba dá origem a uma farinha utilizada em diversos pratos culinários ou podem ser torradas e utilizadas no preparo de uma bebida que substitui o café (RIBASKI *et al.* 2009). O extrato aquoso quando concentrado dá origem a um produto escuro e viscoso, semelhante ao mel de abelha (ALVES, 2008).

A algarobeira também é utilizada na produção de madeira (mourões, estacas para cercas, tábuas, dormentes) e carvão vegetal. Além destes, outras formas de uso da algarobeira são: a proteção do solo contra erosão, arborização, suporte a apicultura, produção de tanino e goma (RIBASKI *et al.*, 2009).

A falta de manejo adequado, a adaptação regional da espécie, a facilidade de dispersão promovida pelos rebanhos dentre outros fatores transformam a algarobeira em um problema que gera muitas discussões polêmicas (PEGADO *et al.*, 2006). Uma possível solução para esse impasse seria o estudo de como agregar valor à vagem

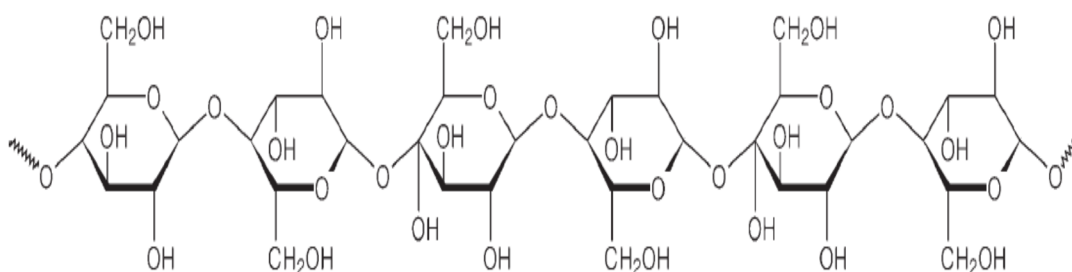
de algaroba, explorando seu potencial fermentescível para desenvolvimento de produtos com alto potencial biotecnológico.

4.1 Celulose: Uma visão geral

A celulose é o biopolímero mais abundante na natureza. Sendo bastante produzida, é responsável por incluir o Brasil entre um dos principais produtores deste polímero em escala mundial. Segundo relatórios da BRACELPA (2014), a produção de celulose referente ao ano de 2013 foi cerca de 10,5 ton, com crescimento em torno de 1,8% em relação ao ano anterior.

A celulose, cuja molécula está representada na Figura 3, é um polissacarídeo formado por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4) e cadeia linear não ramificada sendo um dos principais constituintes da parede celular das plantas juntamente com a lignina, pectina, hemicelulose, podendo ser encontrada de em até quatro formas formas celulose I, II, III e IV, caracterizando este material como polimorfo. (O' SULLIVAN, 1997; HONG; QIU, 2008; VAZQUEZ *et al.*, 2013).

Figura 3 - Molécula de Celulose



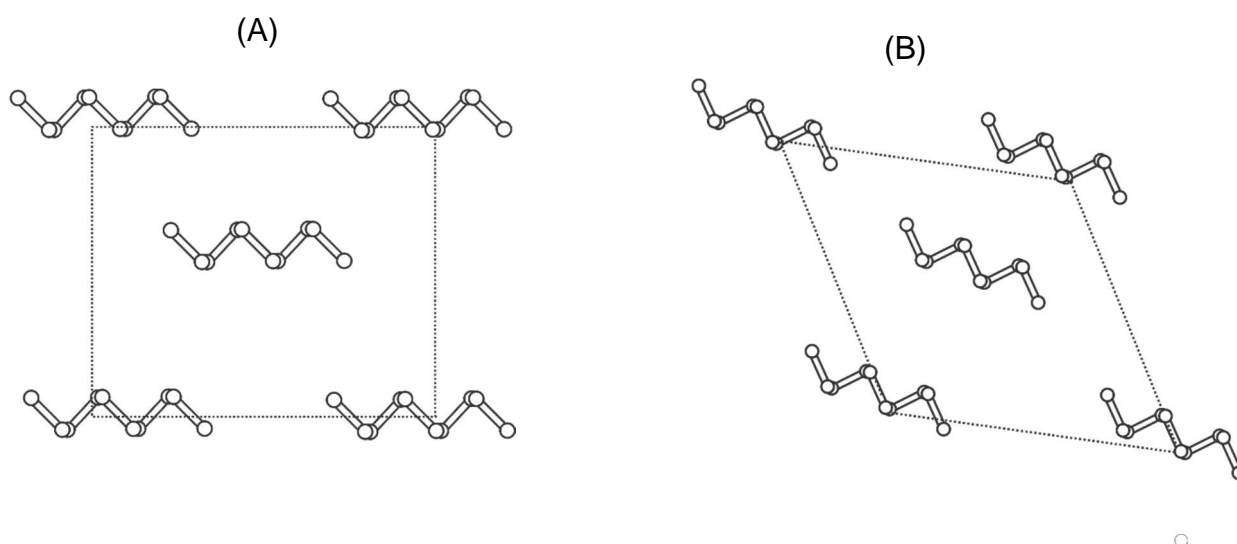
Fonte: (SANTOS *et al.* 2005)

A celulose tipo I ou celulose nativa é encontrada de forma mais abundante na natureza com cadeias de glucanas dispostas de forma paralela (Figura 4a). É composta por uma mistura fases cristalinas de celulose I α e I β . A celulose I α é abundante em celulose sintetizada por bactérias, possui uma estrutura triclínica, é metaestável, podendo ser convertida em celulose I β , através de tratamentos hidrotermais em soluções alcalinas. A celulose I β possui uma estrutura monoclínica e

é mais encontrada na parede celular de plantas superiores (SUN *et al.*, 2007; POLETTTO *et al.* 2013; HUANG *et al.* 2014)

A celulose tipo II possui suas cadeias de glucana dispostas de forma anti-paralelas (Figura 4b), sendo mais estável que a celulose I e mais difícil de ser encontrada em sua forma nativa, pois é produzida apenas por alguns tipos de algas e através do uso de processos químicos a partir da celulose I (O' SULLIVAN, 1997; BROWN, 2004).

Figura 4 – Representação das projeções axiais de a) celulose tipo 1, b) celulose tipo II



Embora a maior parte da celulose disponível na terra seja produzida por plantas, alguns micro-organismos, tais como fungos e bactérias, também são capazes de produzir uma forma extra-celular de celulose, a qual denomina-se celulose microbiana (KLEMM *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2005) e quando é produzida exclusivamente por bactérias, recebe o nome de celulose bacteriana.

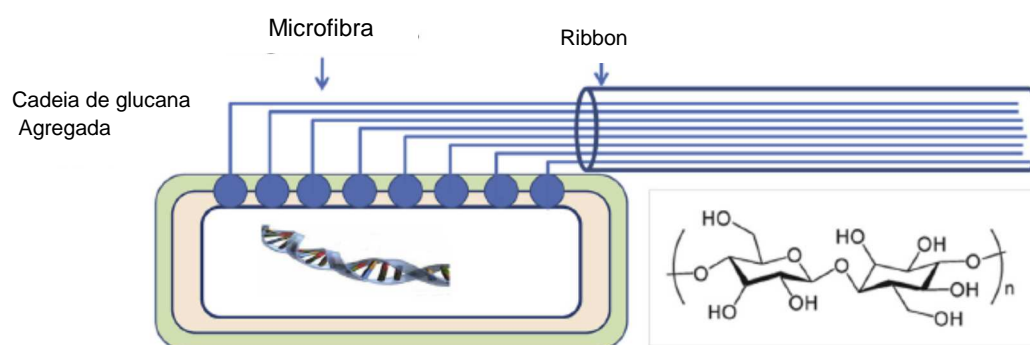
3.3 Celulose Bacteriana: Características e Aplicações

Celulose bacteriana (CB) é um homopolissacarídeo extracelular produzido por várias espécies de bactérias, pertencentes aos gêneros *Gluconacetobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Rizobium*, *Sarcina* e *Salmonella* (SHODA; SUGANO, 2005; HUANG *et al.*, 2014). Esse polissacarídeo é composto por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas

do tipo β (1 \rightarrow 4).Essas cadeias lineares formam pontes de hidrogênio intra e inter moleculares altamente regulares (TABUCHI, 2007).

A CB começa a ser sintetizada quando, cada bactéria, inicialmente, origina cadeias que se agregam originando sub-fibrilas com largura de, aproximadamente, 1,5 nm. Essas sub-fibrilas agrupam-se com outras 36 iguais a elas, formando uma fibrila elementar com um diâmetro de 3,5 nm. Aproximadamente 46 fibrilas adjacentes juntam-se através de pontes de hidrogênio formando um ribbon (Figura 2), nome dado às fibras de CB. Esses *ribbons* ultra finos atingem comprimentos que variam entre 1 e 9 μ m, e formam uma estrutura reticulada densa, que é estabilizada por pontes de hidrogênio (CANNON; ANDERSON, 1991; PECORARO *et al.*, 2008).

Figura 5 – Representação da formação de Celulose Bacteriana

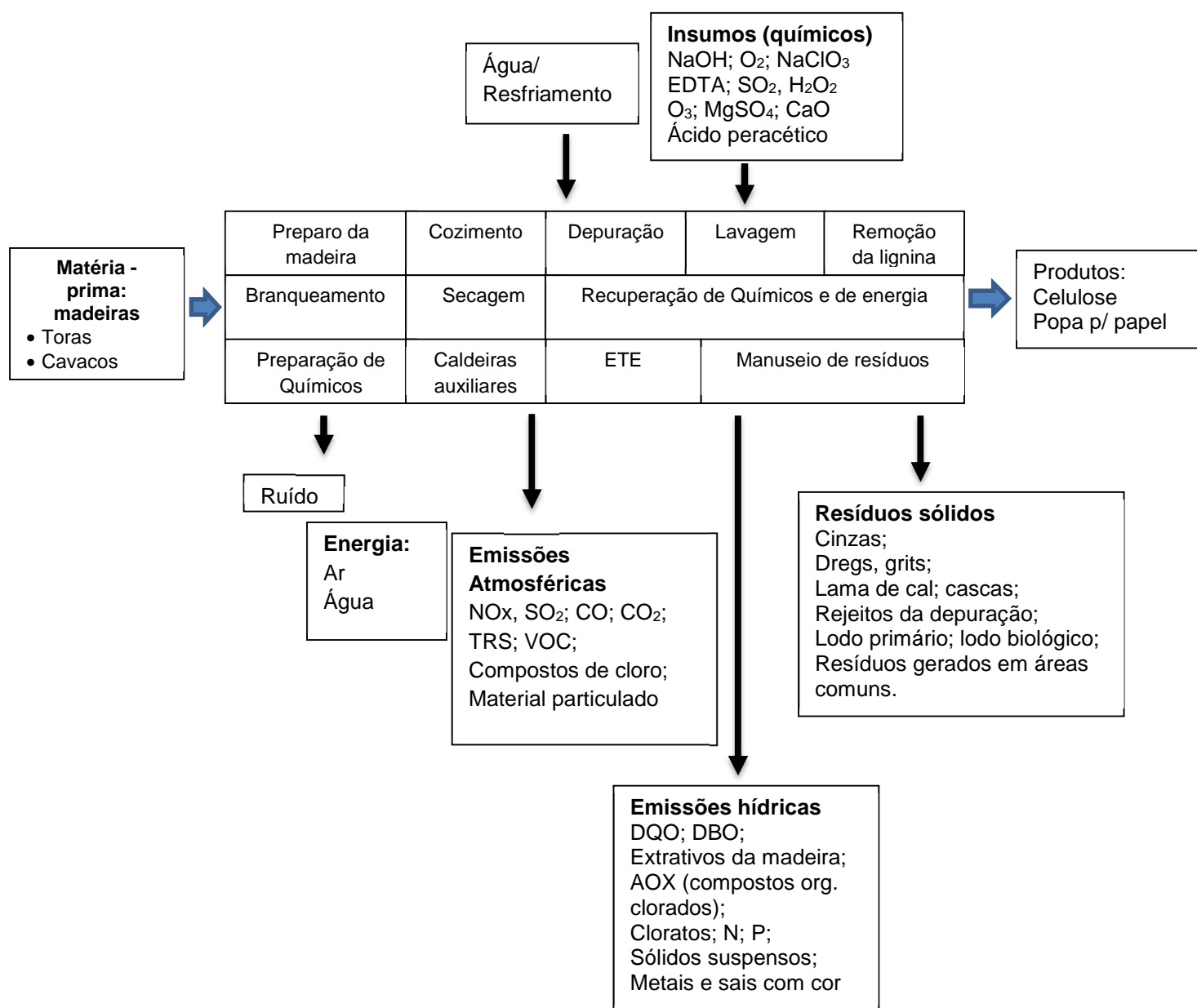


Fonte: SHI *et al.*, 2013

A CB possui a mesma fórmula química da celulose vegetal (CV), porém, suas fibras, apresentadas naturalmente em escala nanométrica, lhe conferem propriedades distintas tornando-a um material altamente poroso (DONINI *et al.*, 2010). Além disso, devido a especificidade do micro-organismo, a CB apresenta maior uniformidade em suas propriedades físico-químicas (CZAJA *et al.*, 2006). Possui uma elevada pureza que está relacionada ao fato de que é secretada livre de lignina, pectina, hemiceluloses e outros compostos biogênicos que estão associados à celulose de plantas. A CB apresenta ainda elevados grau de polimerização e de índice de cristalinidade, maior resistência à tração e excelente capacidade de retenção de água (YOSHINAGA; TONOUCI; WATANABE, 1997). Além das características já citadas, a obtenção de CB não envolve os processos comumente empregados na extração da

celulose vegetal, reconhecidamente poluentes. Na Figura 3 está representado esquematicamente um dos métodos utilizados (Processo Kraft), incluído insumos e resíduos gerados, para obtenção de pasta de celulose com objetivo de produzir papel de alta resistência (PIOTTO, 2003).

Figura 6 - Processo Kraft – representação esquemática incluindo matéria-prima utilizada, insumos e resíduos gerados



Fonte: PIOTTO, 2003

Adicionalmente, a produção de CB, além de ser mais rápida, independe e não requer grandes espaços (FARIA, 2002). Uma comparação entre as propriedades da celulose vegetal e a celulose bacteriana pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 – Comparação entre as propriedades da celulose vegetal (CV) e celulose bacteriana (CB).

Propriedades	CB	CV
Largura da fibras	0,07 a 0,13 μm	30 a 75 μm
Cristalinidade	65 a 98 %	55 a 65%
Grau de polimerização	2000 a 6000	13000 a 14000
Água	98,5 %	60 %

Fonte: PECORARO, 2008

A aplicabilidade da CB vem sendo estudada nas mais diferentes áreas. Na indústria alimentícia, o primeiro uso de CB foi como nata de coco em 1949 (Figura 4). A nata de coco é uma iguaria muito apreciada nas Filipinas e em outros países, sendo produzida a partir da água ou leite de coco (CHAWLA *et al.*, 2009, BUDHIONO *et al.*, 2000). Além de ser consumida como sobremesa, existem empresas que desenvolvem sucos (Figura 5) contendo nata de coco (SUNLEE, 2013).

Por tratar-se de uma fibra dietética, a CB oferece diversos benefícios à saúde e pode ajudar a reduzir o risco de desenvolvimento de doenças crônicas como diabetes, obesidades, doenças cardiovasculares e diverticulites. Em 1992, foi regulamentada pela FDA (Food and Drug Administration) como segura (Generally Recognized as Safe - GRAS) (CHO; ALMEIDA 2012; SHI *et al.*, 2013).

A associação de nanofibras de CB à polímeros condutores aumenta sua aplicabilidade tanto na área científica como na indústria. Alguns exemplos são: baterias recarregáveis, dispositivos eletrônicos, sensores químicos, térmicos e mecânicos, colas e tintas condutoras. Na indústria de cosméticos, a CB é utilizada como hidratantes e adstringentes. Em empresas de aparelhos eletroacústicos ela é utilizada como película para aparelhos de áudio de alta qualidade. Uma das áreas de maior desenvolvimento nos últimos anos e que utiliza a celulose bacteriana é a área biomédica, com exemplos representativos na engenharia de tecidos, onde a CB é

utilizada como enxertos vasculares, cartilagem, barreira antimicrobiana, pele artificial, regeneração neural e curativos (PECORARO *et al.*, 2008, ANDRADE *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2011; MULLER, 2012; HUANG *et al.* 2014).

Por apresentar estrutura nanofibrilada (cerca de cem a mil vezes mais finas que a celulose extraída de planta) a CB possui propriedades físicas e mecânicas únicas que lhe conferem resistência a tração e valores de extensibilidade semelhantes a pele humana, além do que foi recentemente demonstrado a compatibilidade da CB com a pele para aplicações dérmicas, o que estende ainda mais o leque de aplicações desse biopolímero (ALMEIDA, 2014)

Figura 7 - Nata de coco.



Fonte: www.wongcoco.com

Figura 8 - Suco de fruta com nata de coco



Fonte: www.sunlee.com

3.4 Micro-organismos: Características e biossíntese de CB

A celulose pode ser sintetizada por um infinidade de organismos vivos, no entanto quando se fala da obtenção deste polissacarídeo, logo o nosso raciocínio associa à recursos como árvores e plantas de algodão, haja vista que essas são as mais conhecidas fontes de produção industrial e processamento de celulose. No entanto, a celulose pode ser sintetizada por bactérias (*Gluconacetobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Rizobium*, *Sarcina* e *Salmonella*) como já mencionado anteriormente (BROWN, 2004; SHODA; SUGANO, 2005; HUANG *et al.* 2014), porém as bactérias do gênero *Gluconacetobacter* foram

consideradas as mais eficientes produtoras de CB (STEINBUCHER; DOI, 2005) sendo até hoje as mais estudadas.

O primeiro relato de produção de celulose bacteriana foi feito por Adrian Brown em 1886 quando observou, na superfície de uma fermentação de vinagre, um material gelatinoso e constatou que tratava-se de celulose. A bactéria produtora do novo material foi identificada como *Acetobacter xylinum* (BROWN, 1886). Com base em estudos filogenéticos essa bactéria foi reclassificada, sendo incluída no gênero *Gluconacetobacter* como *G. hansenii* (YAMADA; HOSHINO; ISHIKAWA, 1997)

A espécie *G. hansenii* apresenta morfologia de bastonetes retos ou ligeiramente curvos, alongados variando de $0,6$ a $0,8 \times 10^{-4}$ μm , podendo ser ou não móveis. São tolerantes a condições ácidas, gram-negativos, estritamente aeróbios, não fotossintéticos, com uma temperatura ótima para crescimento entre 15 e 34°C , e temperatura para inativação entre 65 e 70°C (KLEMM *et al.* 2005). Essa bactéria pode ser encontrada na superfície de frutas e vegetais em decomposição, no vinagre e em bebidas alcoólicas e tem a capacidade de utilizar uma variedade de substratos carbônicos, tais como glicose, frutose, sacarose, entre outros, para a biossíntese de celulose. A via bioquímica mais compreendida envolve a conversão da glicose como substrato exógeno à celulose (TONOUCHI *et al.* 1996, RECOUVREUX, 2008).

Devido a sua capacidade de sintetizar CB, *G. hansenii* tem sido considerada um organismo modelo para o estudo da biossíntese de celulose (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; CHÁVEZ, *et al.*, 2004; ANDRADE *et al.*, 2010).

A síntese de CB por *G. hansenii* é constituída por um complexo processo que envolve três etapas principais. A primeira etapa refere-se a polimerização de resíduos de glicose em cadeias $1 \rightarrow 4$ glucanas. A segunda, corresponde à secreção extracelular das cadeias lineares e a terceira etapa corresponde à organização e cristalização das cadeias de glucana, através de ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, dispostas em tiras (CHÁVEZ *et al.*, 2004; HA *et al.*, 2008; CHAWLA *et al.*, 2009).

A produção de celulose bacteriana (CB) por *G. hansenii* pode ser obtida em laboratório utilizando cultivos tanto em meios sólidos como líquidos e sob condições estáticas e agitadas (WATANABE *et al.*, 1998; DONINI *et al.*, 2010)

3.5 Processos de Produção de Celulose Bacteriana: Cultivo Estático e Agitado

A escolha da condição de produção de CB dependerá da sua aplicação após seu desenvolvimento. As condições utilizadas podem ser estática e agitada.

No processo de produção estático, uma película gelatinosa de CB é acumulada na superfície do meio de cultura na interface ar/líquido (KRYSTYNOWICZ *et al.*, 2002). IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO (2000) constataram que CB é formada para que o micro-organismo se proteja de reações adversas do ambiente, como exposição a luz ultravioleta, além de manter o ambiente úmido evitando a desidratação e facilitar a difusão dos nutrientes para a bactéria. Outros autores relataram que, sendo a bactéria produtora de celulose estritamente aeróbica, a formação da película é simplesmente para manter sua posição perto da superfície da solução da cultura, onde o oxigênio é mais abundante (HESTRIN; SCHRAMM, 1954).

A produção de CB em cultivo estático possui a vantagem de ser um método simples, de baixo custo e, embora apresente algumas desvantagens que podem dificultar o processo, como o controle e padronização do inóculo, o monitoramento da temperatura e pH e determinação da quantidade de oxigênio dissolvido no meio, ainda é muito utilizado (HESTRIN; SCHRAMM 1954; KRYSTYNOWICZ *et al.*, 2002; CHAWLA, 2009).

Tradicionalmente a cultura é desenvolvida em bandejas rasas, permanecendo cobertas por um período de 5 a 20 dias, até que uma película cubra a superfície do meio de cultivo da bandeja. A película é então removida, lavada, geralmente com hidróxido de sódio, para eliminar as bactérias, e, após a lavagem, está pronta para ser utilizada na aplicação desejada (RECOUVREUX, 2008)

A celulose bacteriana produzida sob condições agitadas, apresenta-se em forma de pellet ou de emaranhado de fibras e tem como objetivo o aumento da produção. O material obtido apresenta desvantagens de possuir baixa resistência mecânica e menor índice de cristalinidade, quando comparada a CB obtida a partir de cultivo estático, porém CBs produzidas em cultivo agitado possuem vantagens de ter uma maior capacidade de absorção de água e uma maior viscosidade (WATANABE *et al.* 1998; DONINI *et al.*, 2010). Bactérias produtoras de celulose, quando são

transferidas para culturas agitadas, podem espontaneamente se transformar em linhagens não produtoras de celulose, implicando no aumento da densidade celular e resultando em um baixo rendimento de celulose (RECOUVREUX, 2008).

3.6 Variáveis do Processo em Cultivo Estático

Diversos fatores influenciam a produção e as propriedades da CB, desde a linhagem utilizada até questões como composição do meio, pH, temperatura e tempo de incubação. Determinar um meio ideal e um conjunto adequado de condições de crescimento que permitam altos níveis de produção de celulose agregaria características necessárias para ampliação desta tecnologia para uma situação industrial (RUKA; SIMON; DEAN, 2012).

O pH ótimo do meio de cultura para a produção de celulose bacteriana varia entre 4,0 a 6,0. Durante a produção fermentativa, o pH do substrato fermentado diminui devido ao acúmulo de ácido glucônico, acético ou lático e o rendimento da celulose tende a diminuir quando o valor do pH encontra-se abaixo de 4,0. Essa diminuição ocorre, principalmente, quando a celulose bacteriana é obtida a partir de substrato rico em glicose, portanto, é de vital importância otimizar e controlar o pH da fermentação dentro de um intervalo ótimo de valor de pH (MASAOKA; OHE; SAKOTA, 1993; KONGRUANG, 2008).

A temperatura de incubação é um fator de fundamental importância na fermentação, pois afeta tanto o crescimento do micro-organismo como a produção de celulose (CHAWLA *et al.*, 2009). Na maioria dos estudos realizados utilizando espécies do gênero *Gluconacetobacter* foi observada uma temperatura ótima para a fermentação em uma faixa de 28 a 30°C (PECORARO *et al.*, 2008, HUNGUND; GUPTA, 2010).

No que se refere a composição do meio de cultura, a literatura relata estudos realizados relacionados à capacidade das bactérias do gênero *Gluconacetobacter* em metabolizar diferentes fontes de carbono e o impacto sobre o rendimento na produção de CB, visto que a composição e a quantidade de açúcar disponível no substrato é de vital importância para o metabolismo das mesmas (RAMANA; TOMAR ; SINGH, 2000; KESHK; SAMESHIMA, 2005; MIKKELSEN *et al.*, 2009).

Diversas fontes de carbono (monossacarídeos, oligossacarídeos, álcool, e ácidos orgânicos) já foram utilizadas para maximizar a produção de celulose bacteriana por muitas espécies de bactérias do gênero *Gluconacetobacter* (YANG *et al.*, 1998; ISHIHARA *et al.*, 2002; KESHK; SAMESHIMA, 2005; JUNG; JEONG, *et al.*, 2010).

Glicose, sacarose e manitol, foram consideradas as fontes de carbono ótimas para a produção de celulose por *G. xylinum* NCIM 2526 (RAMANA; TOMAR; SINGH, 2000). *G. hansenii* PJK (KCTC 10505 BP) produziu 1,72 g/L de celulose quando glicose foi fornecida como fonte de carbono (PARK; JUNG; PARK, 2003).

RAMANA, TOMAR e SINGH (2000) relataram que entre os substratos de carbono, a lactose, a galactose, ácido cítrico, amido e maltose produziram menos do que 2,0 g/L de celulose.

3.7 Fontes Alternativas de Carbono para Produção de Celulose

Uma boa parte dos estudos realizados para produção de celulose bacteriana baseiam-se em meios de culturas contendo açúcares simples e puros como fonte de carbono, o que chega a aumentar o investimento nesta produção, visto que a fermentação é responsável por cerca de 30% do custo total do processo. Logo, um dos aspectos mais importantes do processo fermentativo é o desenvolvimento de um meio de cultura rico em açúcar e de baixo custo (OIKAWA; OHTORI; AMEYAMA, 1995; CHAO; SUGANO; SHODA, 2001; RIVAS *et al.*, 2004; JUNG, JEONG, *et al.*, 2010).

Há uma grande quantidade de resíduos orgânicos ou subprodutos agroindustriais que, em muitos casos, não são comercializados e acabam sendo descartados de forma inadequada na natureza acentuando ainda mais a poluição. No entanto, muitos deles são ricos em açúcares tais como glicose, frutose, sacarose e lactose, bem como nutrientes (nitrogênio e vitaminas) que podem ser úteis para a síntese de celulose (ALMEIDA *et al.*, 2008; CASTRO *et al.*, 2011; KUROSUMI *et al.*, 2009). Sua utilização na produção de CB pode ser uma alternativa interessante para reduzir os custos de produção e agregar valor às importantes cadeias agroindustriais (JEONG *et al.*, 2010).

Diversos estudos sobre a produção de CB a partir de substratos de baixo valor, já foram realizados, na tentativa de diminuir custos de produção, utilizando sumos de frutas e resíduos ou subprodutos industriais (KUROSUMI *et al.*, 2009; CARREIRA, 2010; GOMES, 2011; GOMES *et al.*, 2013).

A partir de água de coco e sumo de ananás, ambos suplementados com extrato de levedura e etanol, produziu-se CB de cerca de 500 g/L (peso úmido) após 14 dias de cultivo estático (KONGRUANG, 2008). Sumos de sucos de frutas (ananás, maçã laranja, pêra e uva japonesa), foram estudados e quantidades significativas de CB foram obtidas a partir do sumo da laranja (6,9 g/L) e pêra japonesa (4,8 g/L) ambos suplementados com 2,0 % de peptona, 0,5 % de extrato de levedura e 0,12 % de ácido cítrico (KUROSUMI *et al.*, 2009).

Uma alternativa significativa para redução de custos é ir além do uso de resíduos industriais utilizando-se também fontes alternativas de carbono vindas de recursos renováveis que compõem a flora brasileira, agregando valor a muitas espécies que ainda apresentam potencial para novas aplicações, como é o caso da algaroba, fruto da algarobeira.

Sendo assim, avaliou-se o potencial da algaroba como substrato alternativo para produção de CB afim de gerar uma alternativa ao meio sintético e caracterizou-se essa celulose a partir de métodos que comprovassem que o material obtido era mesmo CB.

3.8 Celulose Bacteriana: Propriedades

A CB possui propriedades singulares como, alta resistência a degradação, retenção de água, cristalinidade, hidrofobicidade, além de possuir uma estrutura tridimensional em escala nanométrica. Essas características a tornam um material promissor e que tem sido utilizado em diversas áreas como alimentícia, farmacêutica, odontologia, eletrônica e biomedicina (CZAJA *et al.*, 2006; TROVATTI *et al.*, 2011; CASTRO *et al.*, 2011).

A película de CB, após passar por processo de secagem pode ser aquecida a temperaturas maiores que 300°C até que comece a se decompor com sua degradação ocorrendo em torno de 500°C (BARUD *et al.*, 2007; CHAWLA *et al.*, 2009; GEA *et al.*, 2012).Essa característica pode ser observada através de ensaios térmicos, como

análise termogravimétrica (TGA), que acompanha a variação de massa da amostra em função da temperatura e calorimetria exploratória diferencial (DSC) que monitora as variações de entalpia sofridas na amostra em relação a um material termicamente inerte, em função da temperatura (DENARI; CAVALHEIRO, 2012).

A celulose bacteriana é essencialmente caracterizada por ter uma estrutura cristalina na forma de rede tridimensional, onde as cadeias de celulose se agrupam por ligações por pontes de hidrogénio e formam nano e microfibras (IGUCHI; YAMANAKA; BUDHIONO, 2000). A CB apresenta um índice de cristalinidade entre 60 e 90%, considerado elevado, quando comparado ao da celulose extraída de plantas (40 a 60%). O grau de cristalinidade da CB varia de acordo com sua origem e pré-tratamento e pode ser definido como a proporção relativa de polímero com zonas altamente ordenadas. A cristalinidade de uma película de CB pode ser determinada por análise de difração de Raios X (PECORARO *et al.*, 2008).

A hidrofiliidade da CB é um parâmetro muito importante a ser determinado, principalmente quando se tem interesse em interagir a película de CB com outro material. A hidrofiliidade está diretamente ligada capacidade de adsorção da película. O caráter hidrofílico/hidrofóbico da película de CB é uma propriedade superficial que pode ser calculada através da medição dos ângulos de contato formados na superfície da CB por um líquido de referência polar, a água (NUNES, 2012). A película de CB possui caráter hidrofílico, apresentando medidas de ângulos de contato, formados pela água, menores que 50°. PERTILE (2010) e NUNES (2012) analisando a superfície da CB obtiveram medidas de ângulos de contato de 27° e 42° respectivamente.

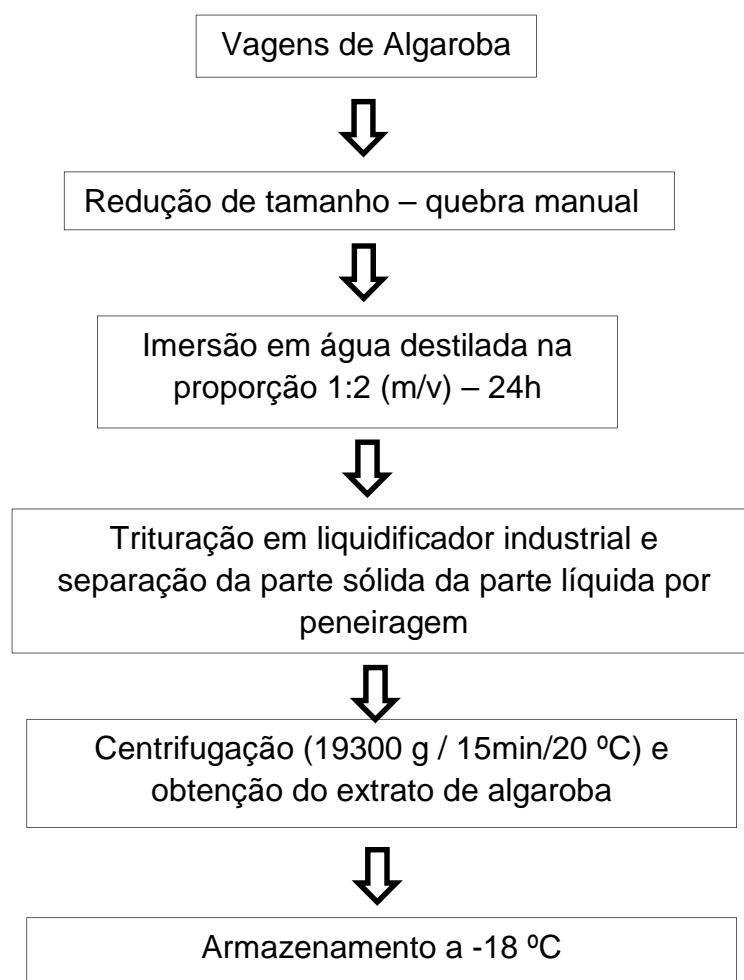
4. Material e Métodos

4.1 Material: Substrato e Micro-organismo

Obtenção do substrato

As vagens de algaroba foram coletadas nos municípios de Trairi, CE (TR) e Campina Grande, PB (CG). A obtenção do substrato seguiu as etapas representadas no fluxograma da Figura 8.

Figura 9 – Fluxograma de obtenção do extrato de algaroba.



Micro-organismo

A estirpe de *G. hansenii* ATCC 23765 foi adquirida da Coleção de Cultura da Fundação André Tosello (código CCT 1431) e mantida congelada a temperatura de -18 °C em 20% (v/v) de glicerol.

4.2 Métodos

Caracterização do Substrato

Os extratos de algaroba (TR e CG) foram caracterizados quanto aos teores de açúcares totais, sólidos solúveis totais, nitrogênio total e pH. O teor de sólidos solúveis, pH e densidade do extrato de algaroba foram determinados seguindo as

normas par procedimentos e determinações gerais do Instituto Adolf Lutz (IAL, 2008). A quantificação de açúcares foi medida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e pelo método do ácido dinitrosalisílico (DNS) sem nenhuma modificação. (GOUVEIA *et al.*, 2009; MILLER, 1959)

A análise de cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada sob as seguintes condições: Pré-coluna Varian PL Hi-Plex Ca Guard (50 x 7.7mm), 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, tendo como fase móvel água grau Mili-Q filtrada com fluxo de 0,5 mL minuto⁻¹. O volume de amostra injetada foi de 20 µL. As amostras foram previamente filtradas em película de acetato de celulose ME25 com poro de 0,45 µm e cartucho C18 (GOUVEIA *et al.*, 2009)

O nitrogênio total foi quantificado empregando-se o método micro-Kjedahl (AOAC, 1995). A densidade do extrato de algaroba foi obtida através do método do picnômetro (IAL, 2008).

Obtenção do Inóculo

O meio de cultura utilizado para produção de CB e manutenção da estirpe foi descrito por Hestrin e Schramm (HS) que é composto por 20 g/L de glicose, 5 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de levedura, 1,15 g/L ácido cítrico e 2,7 g/L de Na₂HPO₄. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,0 com uma solução de ácido cítrico na proporção de 1:1(v/v) (HESTRIN; SCHRAMM, 1954). O meio HS também foi utilizado como meio de referência para produção de CB.

A estirpe de *G. hansenii* foi previamente ativada em caldo manitol contendo 5 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de peptona e 2,5 g/L de D-manitol e incubada a 30°C por 48 horas.

O inóculo foi obtido por meio da adição de 3% da cultura contendo bactéria *G. hansenii*, previamente ativada, em caldo HS esterilizado a 121 °C por 15 minutos e incubado a 30°C por 72 horas.

Um estudo preliminar foi realizado para determinar o tempo de incubação ideal para obtenção do inóculo (72 horas). Este experimento foi realizado através da leitura espectrofotométrica a 600 nm, por 9 dias de incubação (Anexo).

Aumento da Produção da Celulose Bacteriana

Todos os ensaios para o aumento da produção de CB (variação de concentração de açúcar, pH, influência da suplementação do extrato de algaroba com extrato de levedura e do tempo de fermentação) foram realizados em 100 mL do extrato de algaroba, esterilizado a 121 °C por 15 minutos, inoculado com 3% de cultura (v/v), em placas de Petri de 14,5 cm de diâmetro, incubadas a 30 °C por cinco dias, exceto o teste da influência do tempo de fermentação. Os ensaios foram realizados em fermentação submersa em cultivo estático com três repetições e as médias dos resultados foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de significância.

(a) Influência da concentração de açúcar inicial na produção de CB

A partir do extrato concentrado foram realizadas diluições para se obter as seguintes concentrações iniciais de açúcar total: 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10; 15; 20 e 30 g/L. Esses ensaios foram realizados fixando o pH em 5 e conduzidas por 5 dias.

(b) Influência do pH do meio na produção de CB

Após a determinação da concentração de açúcar onde se estabeleceu a melhor produção de celulose em g/L, foi realizada a variação do pH inicial do substrato com o objetivo de verificar em qual pH obtinha um maior rendimento de CB. O pH das formulações, para uma mesma concentração de açúcar, variou de 4,0 a 8,0.

(c) Influência da suplementação do meio como fonte de nitrogênio na produção de CB

O extrato de algaroba foi suplementado com extrato de levedura e avaliado em diferentes concentrações (0; 1; 2,5; 5,0; 7,5; 10 e 15 g/L), a fim de verificar o aumento da produção de CB (g/L) fixando os dois parâmetros (concentração de açúcar inicial e pH) analisados anteriormente.

(d) Influência do tempo de fermentação na produção de CB

Um estudo da influência do tempo na produção de CB com duração de 15 dias foi realizado. As coletas das películas e dos extratos fermentados para as análises de açúcares foram realizadas do 1º ao 9º dia com amostras retiradas a cada 24 horas e,

posteriormente, essas coletas ocorreram em intervalo de dois dias (11^o, 13^o e 15^o dias). A influência do tempo de fermentação foi avaliada fixando-se os melhores resultados para concentração inicial de açúcar, valor de pH e suplementação obtidos nos ensaios anteriores realizados no extrato de algaroba.

Nesta etapa, o meio de referência HS, utilizado como padrão de comparação, foi utilizado de duas formas: HS modificado (45,8 g/L de glicose, 45,8 g/L de frutose, 25 g/L de peptona, 10g/L de extrato de levedura) de acordo com as características do extrato de algaroba em relação á açúcares predominantes e quantidade de nitrogênio presentes e meio HS com suas concentrações de referência (20 g/L de glicose, 5 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de levedura, 1,15 g/L ácido cítrico e 2,7 g/L de Na₂HPO₄).

Purificação das Películas de CB e Análise do Extrato Fermentado

Após o processo fermentativo, as películas foram coletadas, lavadas em água corrente e purificadas em solução de NaOH 4% (m/v) a 80 °C por 30 minutos para que toda a carga microbiana e o excesso de substrato fossem retirados. Após a purificação as películas foram lavadas em água destilada até pH neutro. Este método foi adaptado de trabalhos que utilizaram tratamento alcalino como forma de purificação da CB (SON et al. 2001; KESHK; SAMESHIMA, 2005; KONGRUANG, 2008; KUROSUMI *et al.* 2009).

A massa de celulose foi determinada através de secagem e pesagem da película em balança de infravermelho a uma temperatura de 170 °C. O rendimento de celulose Y_{CB/S} (%) foi calculado utilizando a Equação 1 e o açúcar consumido foi calculado de acordo com a Equação 2.

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

$$\text{Açúcar Consumido (\%)} = (\Delta S / S_i) \times 100 \quad (2)$$

Onde m_{CB} é a massa seca de celulose produzida, S_i é a quantidade de açúcar inicial, S_f é a quantidade de açúcar final no meio fermentado e ΔS é a quantidade de substrato consumido na fermentação.

4.2 Caracterizações da película de CB

As películas produzidas nas condições melhores condições avaliadas foram previamente secas em estufa a 100 °C por 15 min e caracterizadas por termogravimetria (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC), difração de raios X (DrX), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Para a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) as películas foram liofilizadas.

A umidade das películas também foi detectada através da desidratação das mesmas em balança de infravermelho a 170°C após retirada parcial de água com papel absorvente até peso constante.

As análises termogravimétricas foram realizadas em um analisador termogravimétrico Shimadzu modelo TGA-50, conduzidas entre 20 e 950 °C, a 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio em fluxo de 40 mL/min. As massas das amostras foram uniformizadas para valores compreendidos entre 5-10 mg.

As análises de calorimetria exploratória diferencial foram obtidas utilizando um equipamento DSC-Q20 dpUnion sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50mL/min a uma razão de aquecimento de 20 °C/ min e temperatura final de 400 °C. O peso das amostras das películas de extrato de algaroba e meio de referência HS foram 5,7 e 6,1 mg respectivamente.

O experimento para determinação de DRx foi realizado no Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará. Os difratogramas de raio X foram obtidos em difratômetro para amostras policristalinas modelo XPert Pro MPD – Panalytical, com tubo de Cu em 40 kV e 40 mA na escala de em 2θ. O intervalo angular (em 2θ) utilizado foi de 3° a 50° com uma velocidade de varredura de 0,5°/min.

A deconvolução dos picos do difratograma foi realizada utilizando-se função Gaussiana feita pelo software PeakFit® da Systat Software Inc (SigmaPlot®). O índice de cristalinidade foi calculado dividindo-se a área de picos cristalinos pela área total do difratograma.

A Equação 3 foi usada para o cálculo do índice de cristalinidade,

$$IC\% = \frac{I_C}{I_C + I_A} \quad (3)$$

Onde IC (%) representa a fração cristalina em porcentagem, I_c e I_A representam a área total dos picos cristalinos e do halo amorfo, respectivamente.

Os espectros vibracionais na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR) foram obtidos na faixa de 4000 a 600 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 25 varreduras. O equipamento utilizado foi um Cary 660 (Agilent), do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria Tropical, usando-se módulo ATR de seleneto de zinco.

Para a visualização por microscopia eletrônica de varredura (MEV), seções das amostras 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.

Os ângulos de contato foram medidos de acordo com a norma ASTM D-5725-99 (ASTM, 2003) para avaliar a hidrofiliicidade/hidrofobicidade da CB que foi observada por meio da variação das medidas de ângulo de contato em função do tempo (em segundos). As amostras de CB obtidas da fermentação do extrato de algaroba e do meio sintético HS foram cortadas nas dimensões de 3 cm de comprimento e 3 cm de largura. Cada amostra foi colocada ao goniômetro de ângulo de contato GBX Instrumentation Scientifique acoplado a uma câmera Pixelink Nikon com sistema de análise de imagens, operado em atmosfera e a temperatura ambiente.

A análise de ângulo de contato foi realizada através do depósito de gotas de água deionizada sobre a superfície das películas, com dimensões de 3 cm x 3 cm, com auxílio de uma seringa acoplada ao sistema de medida de ângulo de contato. As imagens foram capturadas por uma câmera Nikon logo após a formação da gota e o ângulo obtido na superfície do material polimérico foi calculado pelo programa ImageJ. O ângulo de contato formado entre a superfície da CB e a gota de água foi acompanhado em função do tempo. Para cada amostra, o volume da gota depositada foi o mesmo e medido por meio de uma seringa monitorada por um parafuso micrométrico. A evolução do formato da gota foi acompanhada por um sistema de análise de imagens. Devido à variação da rugosidade da superfície das amostras, pode-se obter uma grande dispersão de resultados entre uma gota e outra. A fim de

minimizar estes erros, para cada material foram realizadas 7 repetições e realizada, pelo menos, 5 medições em cada imagem e o valor médio de ângulo de contato formado foi considerado para caracterizar cada material.

5. Resultados e Discussão

5.1 Caracterização dos substratos

Os resultados da caracterização físico-química dos extratos de algaroba estão apresentados na Tabela 2. No presente trabalho, os parâmetros avaliados foram: composição e identificação de açúcares, nitrogênio, determinação do pH e sólidos solúveis totais (SST).

Os teores de açúcares totais dos extratos variaram de 93,7g/L (TR) a 89,8 g/L (CG), sendo a frutose o principal constituinte. Esse carboidrato compõe em torno de 38% (m/v) o extrato de algaroba do Trairi e 35% (m/v) o extrato de Campina Grande, seguido de celobiose com 33 e 32%, respectivamente e glicose contribuindo com cerca de 28% (TR) e 31% (CG) (Tabela 2).

Tabela 2 – Característica físico-química dos extratos estéreis de algaroba de Trairi (TR) e Campina Grande (CG)

	TR	CG
Sólidos Solúveis Totais (°Brix)	16,3 ± 0,2	15 ± 0,2
Frutose (g/L)	37,2 ± 0,3	33,8 ± 0,1
Celobiose (g/L)	25,6 ± 1,2	28 ± 1,1
Glicose (g/L)	30,8 ± 0,5	29 ± 0,3
Nitrogênio Total (g/L)	1,10 ± 0,1	2,0 ± 0,1
pH	4,7 ± 0,3	5,02 ± 0,3
Açúcares Redutores Totais (g/L)	93,7 ± 0,2	89,8 ± 0,3

O teor de nitrogênio dos extratos variou de 1,1 g/L (TR) a 2,0 g/L (CG), sendo similares ao encontrado no HS (1,2 g/L), meio sintético de referência para produção de CB. Esses resultados são interessantes pois a frutose e a glicose foram relatados na literatura como melhores fontes para a produção de CB (HUNGUND; GUPTA, 2010).

Estudos realizados por BORGES, 2004, SILVA *et al* 2007 e OLIVEIRA, 2011 mostram a composição centesimal da algaroba (vagens, sementes, vagens + sementes, folhas, farinha das vagens inteiras, melado concentrado das vagens) porém para o extrato aquoso retirado da trituração das vagens ainda não foi encontrado nenhum relato na literatura, o que impossibilita a comparação com resultados obtidos nesse estudo devido à diferentes condições que a algaroba é submetida em cada trabalho realizado. O que se pode observar é que, para cada pesquisa realizada, a algaroba possui quantidades significativas de açúcares redutores, proteínas e nitrogênio total, porém a contribuição e identificação de cada açúcar não é mostrada individualmente (GONZALEZ, *et al* 2008; SILVA *et al* 2009).

Os teores de açúcares redutores totais relatados na literatura variam de acordo com as condições de cultivo da planta. Borges (2004) e Oliveira (2011), avaliando a composição de açúcares redutores das vagens da algaroba encontraram 3,4 g/100g (32,8 g/L) e 4,03 g/100g (43,5 g/L) respectivamente. Para a farinha da algaroba, Silva e colaboradores (2007) obtiveram uma concentração de açúcares redutores de 4,6g g/100g equivalentes a 49,7 g/L. Os resultados da literatura em g/100g foram convertidos em g/L a partir do cálculo (não mostrado) pela densidade do extrato de algaroba ($\rho = 1007,8$ g/L).

Vale ressaltar que esse é o primeiro estudo sobre a utilização de extrato de algaroba na produção de celulose bacteriana. No entanto há muitos trabalhos realizados que utilizam outras fontes de carbono (sumos de frutas, água de coco, licor do cozimento de sulfito, licor do folheto de uva, efluente do processamento da batata, água da casca do processamento do arroz, resíduo da casca do café) alternativas ao meio sintético HS. (KESHK, RAZEK; SAMESHIMA, 2006; GOELZER *et al.*, 2009; KUROSUMI *et al.*, 2009; CARREIRA *et al.*, 2011; RANI; APPAIAH, 2011).

5.2 Influência da concentração inicial de açúcar na produção de CB a partir de extrato de algaroba

O efeito da variação da concentração inicial de açúcar utilizando extrato de algaroba como fonte alternativa é apresentado na Tabela 3.

De acordo com os resultados, observa-se que a bactéria produziu CB em todos os pontos do intervalo de concentração de açúcar estudado e que o ganho de massa de celulose observada para concentrações de 5,0 a 30 g/L variou de 0,3 a 0,8 g/L,

com um aumento gradativo da produção a medida que a concentração inicial de açúcares foi aumentando.

A diferença entre os valores de rendimento não foi significativa a nível de 95% de confiança, permanecendo em torno de 5%, com destaque para a concentração de açúcar de 5 g/L que apresentou um rendimento de 9%, porém, nesta concentração, foi obtida o menor ganho de massa e uma película visivelmente frágil ao manuseio. Tais resultados indicam que a essa concentração a bactéria não favoreceu a produção de CB haja vista o elevado consumo de açúcar nesse experimento.

Tabela 3 - Efeito da concentração inicial de açúcar na produção de CB (Δ CB) e rendimento ($Y_{CB/S}$) por *G. hansenii*, utilizando extrato de algaroba da região do Trairi como fonte alternativa.

Concentração inicial de açúcar (g/L)	Δ CB (g/L)	Açúcar Consumido (%)	$Y_{CB/S}$ (%)	pH Final
5	0,3 ± 0,00 ^a	66 ± 0,01 ^a	9,0 ± 0,04 ^b	5,5 ± 0,14 ^{cd}
7,5	0,4 ± 0,04 ^{ab}	56,4 ± 1,13 ^c	5,0 ± 0,40 ^{ab}	5,6 ± 0,10 ^{cd}
10	0,4 ± 0,02 ^{ab}	73,0 ± 0,21 ^{ab}	5,0 ± 0,12 ^{ab}	4,6 ± 0,01 ^{ab}
15	0,5 ± 0,11 ^{bc}	73,7 ± 0,15 ^b	4,8 ± 1,00 ^{ab}	4,7 ± 0,01 ^{ab}
20	0,6 ± 0,03 ^c	69,5 ± 0,20 ^{ab}	4,3 ± 0,29 ^{ab}	4,7 ± 0,02 ^{ab}
30	0,8 ± 0,08 ^d	68,3 ± 0,04 ^{ab}	7,0 ± 0,75 ^{ab}	4,5 ± 0,18 ^{ab}

* Letras iguais (a, b, c, d, e, f) na mesma coluna não apresentam diferenças significativas $\alpha = (0,05)$.

Destaca-se, também, a concentração de açúcar de 30 g/L, na qual foi obtido um maior ganho de massa de CB, com um rendimento de 7% e um consumo de açúcar maior que 50% (Tabela 3).

Os valores de pH do extrato de algaroba fermentado não sofreram variação significativa ficando os mesmos em torno de 5.

Alguns trabalhos relatam que quando a quantidade de açúcar inicial, é superior a 20 g/L, há interferência na produção e rendimento de CB, diminuindo-os (SON *et al.* 2003, BAE; SHODA, 2004, KESHK; SAMESHIMA *et al.* 2006, JUNG, *et al.* 2010). No entanto, em outros estudos envolvendo diferentes meios de cultivo e micro-

organismos é possível se obter uma produção significativa de CB a partir de uma concentração inicial de açúcar maior que 20 g/L.

CARREIRA e colaboradores (2011) avaliaram resíduos agroindustriais e observaram que a produção de CB em cultivo estático aumentou de 0,10 g/L para 0,63 g/L a partir extrato aquoso de pele de uva diluído contendo uma concentração total de açúcar de 46 g/L, sendo a glicose e galactose os carboidratos predominantes. No presente trabalho pôde-se obter uma maior produção de CB (0,80 g/L) a partir de uma menor concentração inicial de açúcares (30 g/L), fato que pode ser explicado pela diferença dos tipos de açúcares (glicose e frutose) que predominam o extrato de algaroba utilizado. KUROSUMI *et al* (2009) obtiveram uma maior produção de CB (1,8 g/L), quando comparada com este trabalho, utilizando suco de uva com concentração total de açúcares de 103 g/L onde a maior contribuição foi a da frutose (59 g/L).

Maior valor de produção de CB (4 g/L) foi relatado em estudo utilizando bagaço de uva proveniente da produção do vinho branco, contendo uma concentração de frutose variando de 14,5 a 22 g/L (VAZQUEZ *et al.* 2013).

Diante dos resultados obtidos nesta etapa, a concentração inicial de açúcar de 30 g/L foi selecionada como sendo a melhor condição inicial para a produção de CB a partir do extrato de algaroba.

5.3 Influência do pH inicial do meio na produção de CB a partir do extrato de algaroba

O efeito do pH inicial utilizando extrato de algaroba como substrato contendo concentração inicial de açúcar de 30 g/L é apresentado na Tabela 4, com valores de pH variando de 4,0 a 8,0.

A produção de celulose bacteriana variou de 0,3 a 0,8 g/L e apresentou diferença significativa em relação ao pH inicial da fermentação. Os melhores rendimentos (15 e 11%) e a melhor produção de CB (0,8 e 0,7 g/L) foram obtidos em pH's 4,0 e 5,0 respectivamente, e não apresentaram diferença significativa a nível de 95% de confiança.

Em valor de pH 4,0, a produção (0,8 g/L) de CB foi semelhante a encontrada na Tabela 2, quando se avaliou a concentração inicial de açúcar, porém o rendimento

(7%) e a quantidade de açúcar consumido (68,3%) foram menores do que os resultados encontrados na Tabela 4.

O maior consumo de açúcar não correspondeu necessariamente à maior taxa de conversão, pois observa-se que o consumo de açúcar durante a fermentação aumentou a medida que o pH do meio aumentava. Neste caso, valores mais elevados de pH devem priorizar outras rotas metabólicas que não sejam a produção de CB; como crescimento e produção de outros metabólitos, haja vista um consumo de açúcar em torno de 50% e uma baixa produção de CB em pH's 7,0 e 8,0.

Tabela 4 - Efeito do pH inicial da fermentação na produção de CB (Δ CB) por *G. hansenii* CCT 1431 utilizando extrato de algaroba como fonte alternativa.

pH	CB (g/L)	Açúcar Consumido (%)	$Y_{CB/S}$ (%)	pH final
4,0	0,8 \pm 0,02 ^c	35,7 \pm 0,13 ^a	15,8 \pm 0,43 ^b	4,2 \pm 0,02 ^a
5,0	0,7 \pm 0,03 ^c	44,4 \pm 0,01 ^a	11 \pm 0,04 ^b	4,4 \pm 0,29 ^{ab}
6,0	0,4 \pm 0,09 ^a	41,2 \pm 0,04 ^a	6,2 \pm 0,75 ^a	5,6 \pm 0,04 ^c
7,0	0,3 \pm 0,24 ^a	37,1 \pm 0,21 ^a	4,8 \pm 0,1 ^a	4,6 \pm 0,10 ^b
8,0	0,6 \pm 0,03 ^{ab}	51,5 \pm 0,15 ^a	8,0 \pm 1,00 ^{ab}	4,6 \pm 0,01 ^{ab}

Letras iguais (a, b, c, d, e, f) na mesma coluna não apresentam diferenças significativas $\alpha = (0,05)$.

Para todos os ensaios o pH final diminuiu ao término da fermentação, ficando em torno de 4,5. A literatura relata a formação de ácidos orgânicos (acético, cítrico, láctico, glucônico) no meio de cultivo durante a produção de CB acarretando uma diminuição da produção após um determinado tempo de fermentação, que varia de acordo com a estirpe utilizada, destaca-se, ainda, que a produção de CB diminui quando o pH inicial do substrato é abaixo de 4,0 (KONGRUANG, 2008; CHAWLA *et al.* 2009).

O pH ótimo para produção de CB depende da estirpe bacteriana, porém o que se atribui quando esse parâmetro é estudado é uma faixa de pH levemente ácida a neutra (pH de 4,0 a 6,0) (HESTRIN; SCHRAM, 1954; BIELECKI *et al.*, 2005; KONGRUANG, 2008; CARREIRA, 2011).

Para estudo utilizando bactérias do gênero *Gluconacetobacter* (CASTRO *et al.*, 2012) um máximo de produção de CB (4,6 g/L) foi obtido em meio ácido, com valor superior ao encontrado neste trabalho (pH 4,0)

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 4, optou-se, por utilizar o valor de pH 4,0 como valor ótimo para produção de CB no decorrer do estudo.

5.4 Influência da suplementação do meio com fonte de nitrogênio na produção de CB

Os resultados da influência da suplementação do extrato de algaroba utilizando diferentes concentrações de extrato de levedura como fonte de nitrogênios são apresentados na Tabela 5. As concentrações de extrato de levedura no substrato variaram de 0 a 20 g/L.

De acordo com a Tabela 5, a produção de CB variou de 0,6 a 1,4 g/L. Observa-se que no intervalo das concentrações 2,5 a 15 g/L há um aumento da produção de CB, havendo um crescimento ascendente dessa produção à medida que o açúcar é consumido e, conseqüentemente, um aumento do rendimento.

Tabela 5 - Efeito da suplementação com extrato de levedura na produção de CB por *G. hansenii* utilizando extrato de algaroba como substrato.

Extrato de Levedura (g/L)	Δ CB (g/L)	Açúcar Consumido (%)	$Y_{CB/S}$ (%)	pH final
0,0	0,8 \pm 0,15 ^a	80,6 \pm 0,19 ^a	5,0 \pm 0,80 ^b	5,0 \pm 0,41 ^b
2,5	0,7 \pm 0,06 ^a	81,1 \pm 2,7 ^a	5,5 \pm 1,06 ^{bc}	5,6 \pm 0,10 ^d
5,0	0,8 \pm 0,02 ^{ab}	78,3 \pm 2,6 ^a	7,3 \pm 1,67 ^{ab}	4,5 \pm 0,01 ^{ab}
7,5	1,1 \pm 0,04 ^{bc}	78,6 \pm 0,30 ^b	9,0 \pm 0,23 ^a	4,7 \pm 0,0 ^{ab}
10,0	1,2 \pm 0,14 ^c	82,1 \pm 0,62 ^{ab}	8,5 \pm 0,37 ^a	4,7 \pm 0,02 ^{ab}
15,0	1,4 \pm 0,08 ^c	88,6 \pm 0,15 ^c	9,8 \pm 0,11 ^a	4,5 \pm 0,18 ^a
20,0	0,8 \pm 0,06 ^b	79,6 \pm 0,24 ^b	5,3 \pm 0,08 ^b	5,0 \pm 0,0 ^b

Letras iguais (a, b, c, d, e, f) na mesma coluna não apresentam diferenças significativas $\alpha = (0,05)$.

Não houve diferença significativa na produção de CB, açúcar consumido e rendimento nas concentrações de 7,5, 10 e 15 g/L de extrato de levedura, porém a película de CB obtida a partir da concentração de 7,5 g/L de extrato de levedura,

apresentou-se quebradiça e sem resistência ao manuseio (HESTRIN; SCHRAMM 1954; KRYSZYNOWICZ *et al.* 2002; CHAWLA, 2009).

Um aumento de 75% da produção de CB foi observado quando substrato sem suplementação ($\Delta\text{CB} = 0,8 \text{ g/L}$) é comparado ao substrato suplementado ($\Delta\text{CB} = 1,2 \text{ g/L}$). Estudos realizados evidenciam que eficácia do extrato de levedura, utilizado como fonte nitrogênio para produção de CB, é a maior dentre outros compostos, como peptona, milhocina, extrato de malte, extrato de carne e sulfato de amônia (SON *et al* 2001; JUNG, *et al* 2010; COBAIN; BIYIK 2011; GOTTSCHALK *et al* 2013).

A produção e o rendimento de CB diminuíram a uma concentração de 20 g/L de extrato de levedura. GOTTSCHALK e colaboradores (2013) ao avaliarem diferentes fontes de nitrogênio em meio sintético e cultivo estático, não observaram aumento significativo na produção de CB no meio de cultivo adicionado 12,5 g/L de extrato de levedura. SON e colaboradores (2001) perceberam que a partir de uma concentração de 20 g/L, avaliando um intervalo de 10 a 80 g/L de extrato de levedura, a produção de CB permanecia praticamente inalterada após 7 dias de fermentação.

COBAN e BIYIK (2011) avaliaram o efeito do extrato de levedura utilizando diferentes fontes de carbono como, glicose, sacarose e frutose e obtiveram resultados significativos para a produção de CB 0,31g/L, 0,29g/L e 0,29g/L, respectivamente. Uma melhor produção (2,9 g/L) de CB, utilizando *Acetobacter* sp. A9 foi obtida por SON e colaboradores, em meio contendo 10 g/L de extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

O extrato de levedura é obtido da autólise da parede celular da leveduras através de enzimas ou ácidos presentes na célula que liberam o extrato celular e tem como aminoácido predominante o ácido glutâmico possuindo também o inositol, um importante promotor do crescimento de micro-organismos. É uma rica fonte de nitrogênio além de possuir vitaminas e minerais essenciais ao metabolismo celular (DAWSON, 2002; TIBBETTS, 2002; COSTA, 2004).

Diante dos resultados obtidos na Tabela 5, optou-se por escolher a concentração de 7,5 g/L de extrato de levedura para suplementar o extrato de algaroba.

5.5 Influência do tempo de fermentação na produção de CB a partir do extrato de algaroba de Campina Grande em suas melhores condições

A partir desta etapa foram consideradas as melhores condições para produção de CB obtidas a partir dos resultados do estudo dos efeitos da concentração inicial de açúcar (30 g/L), pH (4,0) e suplementação (7,5 g/L de extrato de levedura) no extrato de algaroba.

Os resultados para influência do tempo de fermentação na produção de CB foi analisada nos três substratos: extrato de algaroba com condições melhoradas (ALG), HS modificado (HS MOD) e HS com suas concentrações normais de referência (HS) e são apresentados na Figura 10.

Observa-se que para os três substratos utilizados o consumo de açúcar aumentou com o tempo. A produção de CB no extrato de algaroba variou entre 0,17 e 1,4 g/L, e apresentou maior produção (1,4 g/L) após 5 dias de fermentação. O resultado obtido para o meio HS modificado foi maior do que o extrato de algaroba e variou de 0,15 a 2,10 g/L, apresentando uma melhor produção no décimo quinto dia de fermentação.

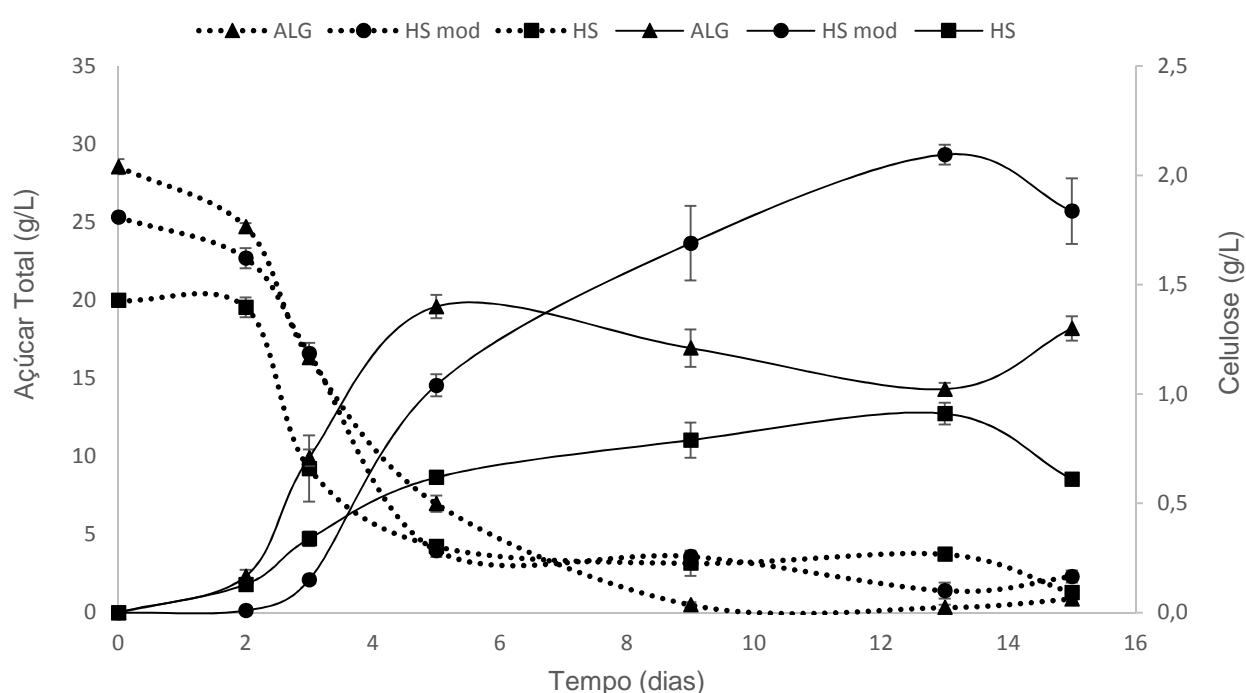
Apenas no HS modificado, o maior consumo de açúcar (94%) correspondeu a maior produção de CB (2,1 g/L), acredita-se que neste substrato a bactéria tenha utilizado uma rota metabólica diferente de qualquer outra utilizada pelos outros dois substratos, favorecendo uma maior produção de CB, visto que para cada fonte de carbono diferente utilizada na síntese de CB, é seguida uma via diferente durante o seu metabolismo, (ROSS *et al* 1991; CHAWLA *et al.* 2009; CARREIRA, 2010).

KESHK; SAMESHIMA (2005) obtiveram uma produção máxima de CB de 0,02 g/L, após 7 dias de cultivo em substrato contendo frutose como fonte de carbono no entanto, resultados diferentes foram obtidos no presente estudo, onde a produção máxima (1,4 g/L) de CB em extrato de algaroba contendo frutose como a principal fonte de carbono, foi obtida após 5 dias de cultivo.

A literatura relata que em estudos realizados com meio sintético HS utilizando micro-organismos diferentes, como: *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 10245, *Acetobacter* sp. V6, a produção de CB não aumenta de 6 a 8 dias de cultivo, sendo sua máxima produção obtida de 2 a 4 dias de cultivo (SON *et al* 2003; KESHK; SAMESHIMA, 2005; KESHK *et al* 2006, JUNG *et al.*, 2010; MIKKELSEN *et al.* 2009;

WEE *et al.* 2011), porém neste estudo a produção máxima de CB em meio HS sintético (0,91 g/L) foi obtida no décimo terceiro dia de cultivo. Este aumento no tempo de fermentação pode ser explicado pelas diferentes estirpes de bactérias do gênero *Gluconacetobacter* utilizadas nos estudos.

Figura 10 – Produção de CB (—) e consumo de açúcar (.....) em extrato de algaroba com condições melhoradas HS modificado e em meio sintético HS em condição estática durante 15 dias de cultivo a 30 °C.



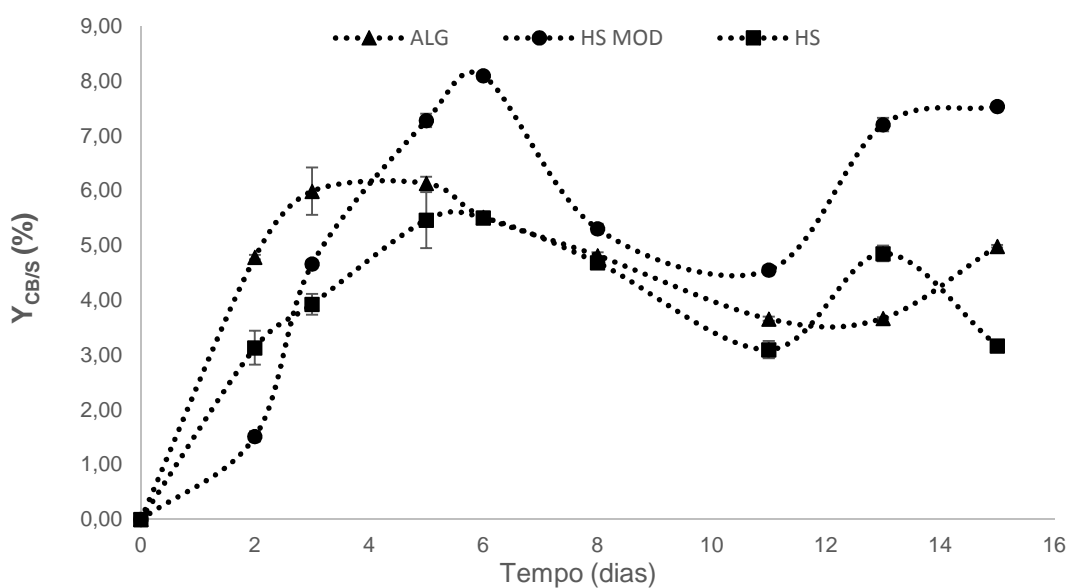
O resultado para o estudo da influência do tempo no rendimento da CB obtida a partir do extrato de algaroba variou de 3,66 a 6,13% m/m (Figura 11), sendo seu maior valor obtido no quinto dia de cultivo, o que se leva a acreditar que nesse tempo a bactéria metabolizou o açúcar contido no substrato favorecendo a produção e o rendimento de CB, visto que de acordo com a Figura 10, mostrada anteriormente, a maior produção de CB (1,4 g/L) foi obtida também no quinto dia de cultivo.

O resultado do rendimento do extrato de algaroba começa a decrescer com o tempo após atingir seu valor máximo (6,13% m/m), esse decréscimo de rendimento pode ser explicado pela possível formação de metabólitos que inibam o crescimento celular diminuindo a atividade microbiana, existindo, também, a possibilidade do

micro-organismo utilizar o substrato não somente para produção de CB, mas também para manutenção celular (IGUCHI *et al* 2000; KESHK; SAMESHIMA, 2005)

THOMPSON e HAMILTON (2001) avaliando o comportamento de duas estirpes de *Acetobacter xylinus* ATCC 10821 e 23770 utilizando glicose proveniente de efluentes do processamento de alimentos como fonte de carbono obtiveram maiores rendimentos 48% e 27% respectivamente. Esses valores de rendimento confirmam que tanto a produção quanto o rendimento da CB em uma fermentação depende de fatores como, pH, fonte de carbono e principalmente a espécie de micro-organismo utilizado (HUNGUND; GUPTA, 2010; JUNG *et al.*, 2010)

Figura 11 – Variação dos rendimentos ($Y_{CB/S}$) durante a produção de CB no extrato de algaroba com condições melhoradas (\blacktriangle), HS modificado (\bullet) e em meio sintético HS (\blacksquare) em condição estática durante 15 dias de cultivo a 30 °C

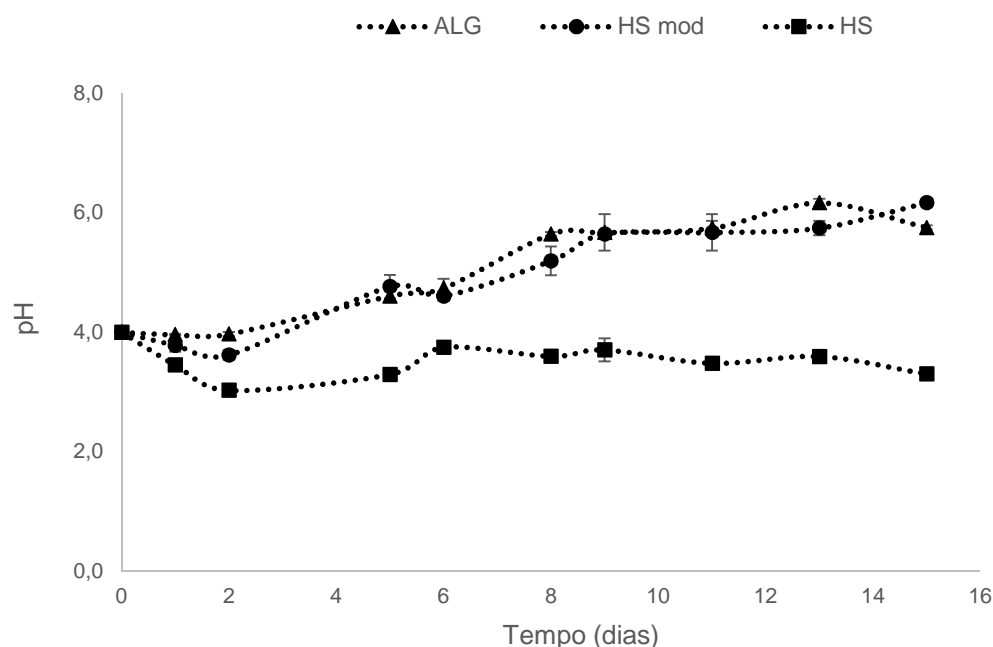


A variação do pH durante o estudo da influência do tempo de cultivo na produção de CB a partir de extrato de algaroba está representado na Figura 12.

O pH variou de 3,0 a 6,0 conforme Figura 12. No HS houve diminuição dos valores de pH o que frequentemente ocorre em fermentações com esse substrato devido a produção de ácidos orgânicos.

G. hansenii converte glicose em ácido glucônico durante o processo de fermentação devido a conservação de parte da D-glicose pelo ATP proveniente do ácido cítrico, que acidifica o meio diminuindo a produção de CB, no entanto o açúcar em maior quantidade no xarope de algaroba é a frutose, não havendo a conversão deste açúcar em ácido glucônico, o que explica o aumento do pH na fermentação do extrato de algaroba e HS modificado (EMBUSCADO, MARKS e BEMILLER, 1994; VANDAMME *et al.*, 1998)

Figura 12 – Variação pH durante a produção de CB no extrato de algaroba com condições melhoradas (▲) HS modificado (●) e HS (■) durante 15 dias de cultivo em condição estática a 30 °C.



De acordo com os resultados apresentados nos gráficos das figuras 9 e 10, concluiu-se que o melhor tempo para produção de CB a partir do extrato de algaroba é de 5 dias.

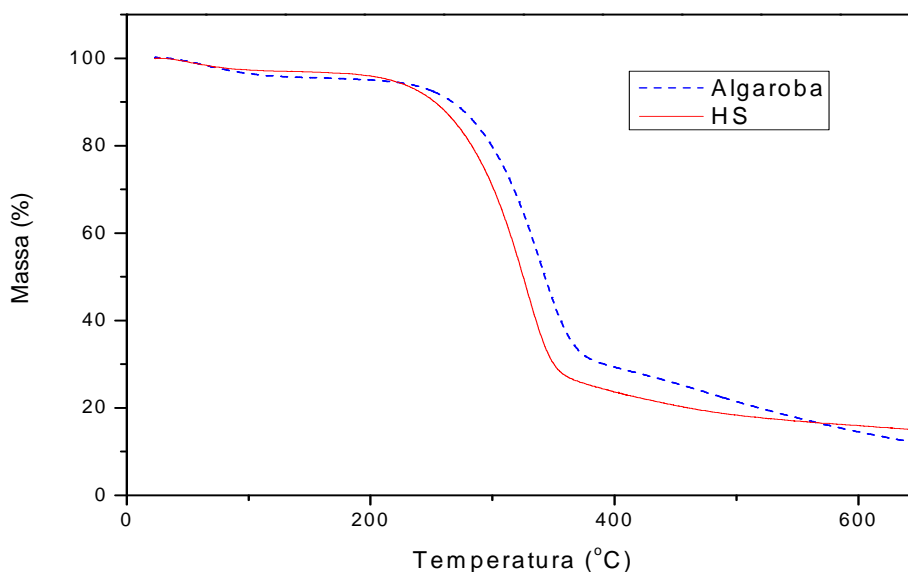
5.6 Caracterização das Películas

5.6.1 Análise Termogravimétrica (TGA)

As curvas das análises termogravimétricas das películas provenientes do extrato de algaroba com condições melhoradas (com 30 g/L de açúcar inicial, 10 g/L

de extrato de levedura cultivadas sob pH 4,0) em condições estáticas, e meio sintético padrão HS estão apresentadas nas Figura 13.

Figura 13 – Termogramas de TGA das CB's obtidas a partir do extrato de algaroba com condições melhoradas (- - -) e meio sintético de referência HS (—) a temperatura de 30 °C, sob pH 4,0 por 5 dias.



Em ambas as curvas ocorre um primeiro evento na temperatura em torno de 100 °C que é característico da perda de umidade. Essa perda de umidade foi menos expressiva na CB obtida a partir do meio HS sintético e ficou em torno de 3,6% (Tabela 7). Na CB obtida a partir do extrato de algaroba com condições melhoradas a perda de umidade foi de 5,2 %, indicando um maior teor de umidade na CB obtida a partir do extrato de algaroba.

Em um segundo evento, observado no gráfico, a curva da CB obtida a partir do meio HS sintético apresentou uma perda de massa equivalente a 74,2% que ocorreu no intervalo de temperatura de 273,6 a 322,5 °C, característica da decomposição térmica da celulose bacteriana (BARUD *et al.*, 2007). O mesmo evento ocorre na CB obtida a partir do extrato de algaroba com condições melhoradas porém, ocorre uma perda de massa em torno de 67,4% em um intervalo de temperatura de 288,6 a 338,7 °C (Tabela 6). Pode-se perceber, analisando as temperaturas iniciais das duas amostras de CB, que a CB obtida a partir do extrato de algaroba é 5,5% mais estável termicamente do que a CB obtida a partir do HS sintético. Acima de 350 °C, observa-

se a degradação termo-oxidativa da celulose, que pode se estender até 500 °C (ROMAN; WINTER, 2004)

Observa-se, ainda, no gráfico da Figura 13, que a ocorrência de somente eventos característicos de perda de umidade, decomposição e degradação de CB indicam que a purificação da CB com NaOH 4% foi efetiva na remoção de material biológico e impurezas.

Tabela 6 – Resultados dos eventos da análise termogravimétrica de CB obtida a partir de extrato de algaroba com condições melhoradas e HS sintético.

Amostras	Eventos	Onset (°C)	Perda de massa (%)
CB ext. de algaroba	1º	100	5,2
	2º	288,6	67,4
CB HS	1º	100	3,6
	2º	273,6	74,2

Estudos que investigam a estabilidade térmica de CB por termogravimetria apontam perfis de degradação térmica semelhantes aos encontrados neste trabalho, pois relatam curvas com a ocorrência de dois eventos principais correspondentes a perda de massa pela desidratação da película, a uma temperatura em torno de 100 °C e uma segunda perda de massa relacionada a degradação térmica a um intervalo de temperatura de 200 a 400 °C (BARUD *et al.* 2007; GEA, *et al* 2001; VAZQUEZ, *et al* 2013).

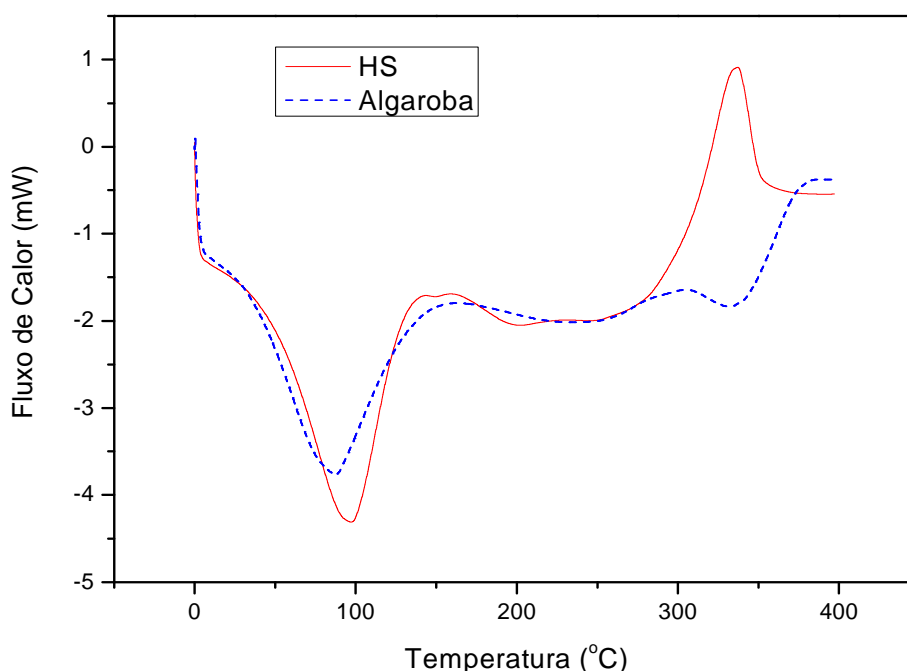
5.6.2 Determinação da umidade da CB

A umidade das CB's obtidas a partir do extrato de algaroba com condições melhoradas e meio HS sintético ficou em torno de 98%. Como era esperado, esses resultados comprovam a alta umidade da CB em relação a umidade da celulose vegetal (60%), característica que permite a utilização da CB em diversas áreas como a biomedicina e engenharia de tecidos, farmacêutica e alimentícia, como já foi relatado (ANDRADE *et al.* 2010; PECORARO *et al.* 2008).

5.6.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas de calorimetria exploratória diferencial das CBs obtidas a partir dos extrato de algaroba e meio sintético de referência HS estão apresentadas na Figura 14.

Figura 14 – Termogramas de DSC das CBs obtidas a partir do extrato de algaroba com condições melhoradas (- - -) e meio sintético de referência HS (—) a temperatura de 30 °C, sob pH 4,0 por 5 dias.



As duas curvas apresentaram picos endotérmicos em torno de 100 °C característico da perda de umidade. Moléculas de água fisicamente adsorvidas e ligações de hidrogênio podem ser perdidos neste primeiro estágio (BARUD *et al.* 2007).

As películas de CB obtidas do xarope de algaroba apresentaram um pico exotérmico acima de 300 °C característico da decomposição da celulose bacteriana (PECORARO *et al.* 2008). Porém o pico mais largo observado para a CB de algaroba sugere que esta amostra termicamente mais estável do que a obtida em HS, corroborando com os dados de TG.

A literatura relata que o perfil característico das curvas de DSC obtidas a partir da análise de CB apresenta temperaturas referentes a desidratação em torno de 90 °C e à decomposição da CB em torno de 370 °C (BARUD *et al.* 2007; PECORARO *et al.*, 2008; WONG *et al.* 2009).

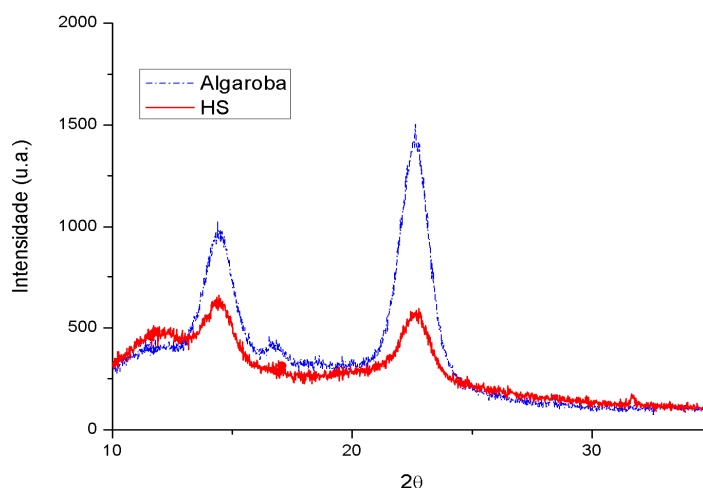
5.6.4 Difração de Raios X (DRX)

O difratogramas de raios X de CB produzidas a partir do extrato de algaroba e HS estão apresentados na Figura 15.

Os difratogramas das películas de CB do extrato de algaroba e HS apresentaram padrões típicos de celulose do tipo I, dominante em CBs sintetizadas por bactérias, com picos de difração 2θ em 14°, 16° e 22°, normalmente atribuídos aos planos cristalográficos (101), (10 $\bar{1}$) e (002) (MAEDA *et al.*, 2006, VAZQUEZ *et al.* 2013).

Os Índices de cristalinidade (IC) da CB proveniente do extrato de algaroba e meio sintético de referência HS foram de 92% e 91,5%, respectivamente. Esses resultados confirmam que a estrutura da CB obtida a partir do extrato de algaroba não foi alterada no que concerne a uma das mais importantes características da CB, visto que o grau de cristalinidade exerce influência sob algumas características físico-químicas e físicas da película como sua resistência a tração e capacidade de retenção de água (SCHENZEL *et al.*, 2005; KLEMM *et al.* 2005). É devido à alta cristalinidade e fibra de diâmetro pequeno que a CB possui excelente resistência mecânica e elevada área superficial, quando comparados a celulose derivada de plantas (SOKOLNICKI *et al.* 2006).

Figura 15 – Difratomogramas de raio X das películas de CB de extrato de algaroba com condições melhoradas (— — —) e meio sintético de referência HS (—) a temperatura de 30 °C, sob pH 4,0 por 5 dias.



A literatura relata que o índice de cristalinidade da CB encontra-se ente 60 e 95 % (TOMÉ, 2008, TROVATTI *et al.*, 2011). MIKKELSEN e colaboradores (2009); RUKA e colaboradores (2012) avaliando a influência de diferentes fontes de carbono na produção de CB por *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53524, encontraram índices de cristalinidade com valores em torno de 90%, confirmando os valores de IC encontrados nesse estudo.

5.6.5 Ângulo de Contato

As medições do ângulo de contato (AC) nas CB's provenientes do extrato de algaroba com condições melhoradas e meio HS sintético são apresentadas na Figura 16.

Os valores dos AC foram obtidos com o objetivo de medir um dos parâmetros importantes das películas de CB, seu caráter hidrofílico/hidrofóbico, que determina a interação da CB com vários compostos, aumentando ainda mais o leque de aplicações deste biopolímero (NUNES, 2012).

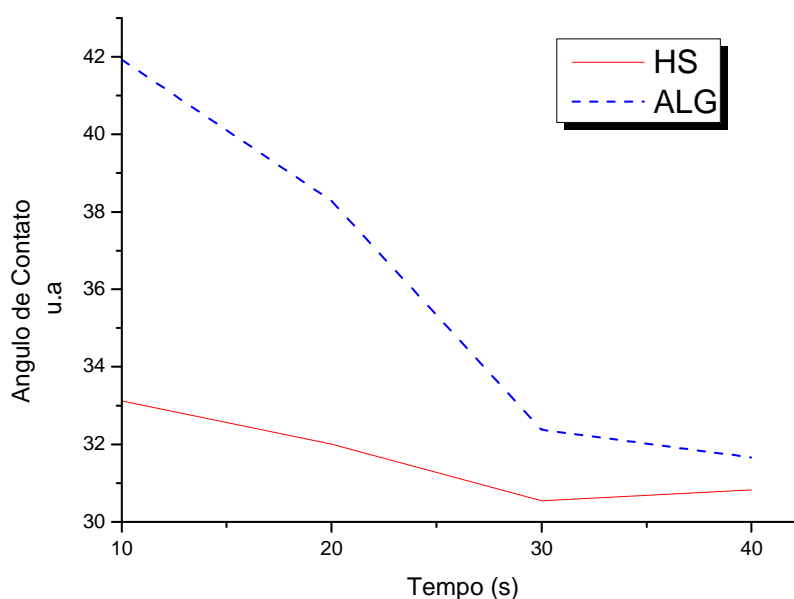
Na Figura 16 pode-se observar que ambos os valores de AC obtidos das duas amostras de CB (extrato de algaroba e meio sintético HS) apresentaram o mesmo

perfil, com uma acentuada diminuição com o tempo na CB proveniente do extrato de algaroba.

A CB obtida do extrato de algaroba apresentou um valor médio para o ângulo de contato em torno de 44° , porém um valor menor foi obtido para a CB do meio HS sintético, ficando este em torno de 32° . Embora as duas amostras de CB's tenham apresentado diferenças nos valores de ângulos de contato, ambas apresentaram caráter hidrofílico, o que corrobora com o descrito por GARDNER (2008) e PERTILLE (2010). As propriedades hidrofílicas da celulose devem-se aos grupos hidroxilo (OH) que se encontram em posição equatorial no tipo de conformação adoptada pelo anel glicopiranosídico, o que provoca a formação de um local hidrofílico paralelo ao plano do anel (KONDO, 2005).

Como a cristalinidade da CB da algaroba é maior que a do HS é razoável que no tempo zero o ângulo de contato da algaroba tenha sido superior, em razão de cristais de celulose serem menos hidrofílicos que celulose amorfa, pois nos cristais as pontes de hidrogênio estão todas ligadas entre as glicoses, sem estarem muito disponíveis para a água circundante. Depois que a água entra em equilíbrio, ela começa a difundir ao longo dos poros da película (TOMÉ, 2008)

Figura 16 – Valores dos ângulos de contato versus tempo, medidos com água, nas CB's provenientes do extrato de algaroba com condições melhoradas (- - -) e meio sintético HS (—), cultivados a temperatura de 30°C , sob pH 4,0 por 5 dias.



Uma superfície hidrofílica possui um ângulo de contato com a água, abaixo de 90° , quanto menor o ângulo de contato com a superfície, mais hidrofílica ela será. Já para a superfície hidrofóbica esse ângulo é acima de 90° , podendo ser maior que 160° , nesse caso é caracterizada de super hidrofóbica (HEURISON, 2010; NUNES, 2012).

5.6.6 Espectroscopia do Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A Tabela 8, mostra os intervalos das frequências de absorção características da CB e as frequências de absorção encontradas nas CB's provenientes do extrato de algaroba e HS. Para frequência de onda há uma atribuição que corresponde ao grupo funcional encontrado na CB

As principais bandas que caracterizam a CB são as que se encontram na região de 3390 cm^{-1} correspondente ao estiramento dos grupos hidroxilo, 2921 cm^{-1} ; estiramento CH de alcanos e estiramento assimétrico; CH_2 1636 cm^{-1} deformação do OH; 1410 cm^{-1} deformação CH_2 ; 1340 cm^{-1} deformação OH. Essas frequências não foram encontradas na CB proveniente do extrato de algaroba, porém na Tabela 8, estão apresentadas algumas frequências de ondas que caracterizam a celulose bacteriana.

A técnica de FTIR permitiu verificar e confirmar a efetividade da purificação da celulose bacteriana através de lavagens da película com NaOH 4% (m/v), pois os espectros não apresentaram nenhuma vibração diferente das características da CB.

Figura 17 - Espectros de FTIR obtidos de CB's de extrato de algaroba com condições melhoradas (- - -) e meio sintético de referência HS (—).

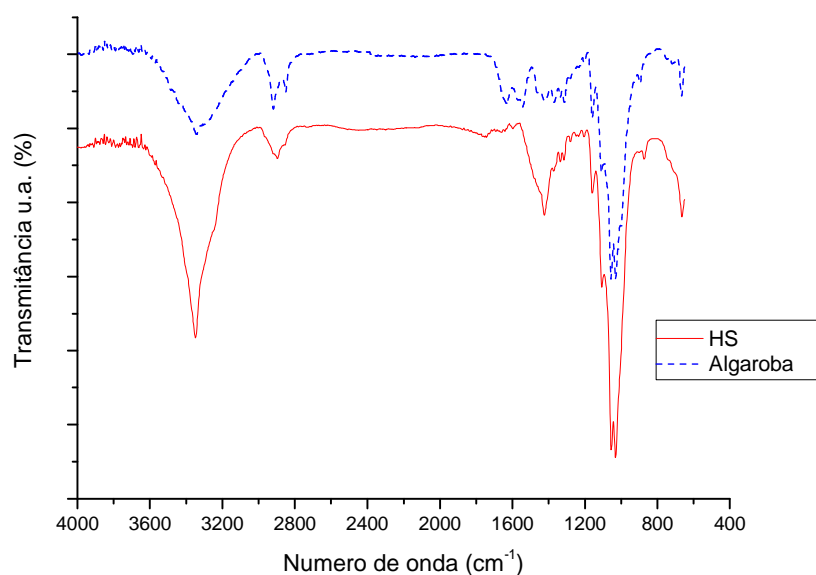


Tabela 7 - Frequências de absorção de infravermelhos típicas para a celulose bacteriana

Nº de onda característico de CB (cm ⁻¹)	Nº de onda - CB algaroba (cm ⁻¹)	Nº de onda - CB HS (cm ⁻¹)	Atribuição
3500 - 3300	3342	3342	ν OH
3000 - 2870	2850; 2918	2894	ν CH e CH ₂ (CHOH; CH ₂ OH)
1430 - 1330	1369	1331	δ_s C–OH e CH
1200 - 1 000	1056	1053	ν C–O (–C– O– H)
1146- 1160	1159	1159	ν_a (C– O–C); deformação CH
900 - 700	718	898	δ_{as} no plano CH ₂ δ C–H
700 -400	666; 612	665; 612	δ fora do plano OH

Fonte: GEA *et al.*, 2011; PECORARO *et al.*, 2008.

5.6.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das películas de CB obtidas do extrato de algaroba e meio sintético de referência HS está representada pelas micrografias da Figura 18.

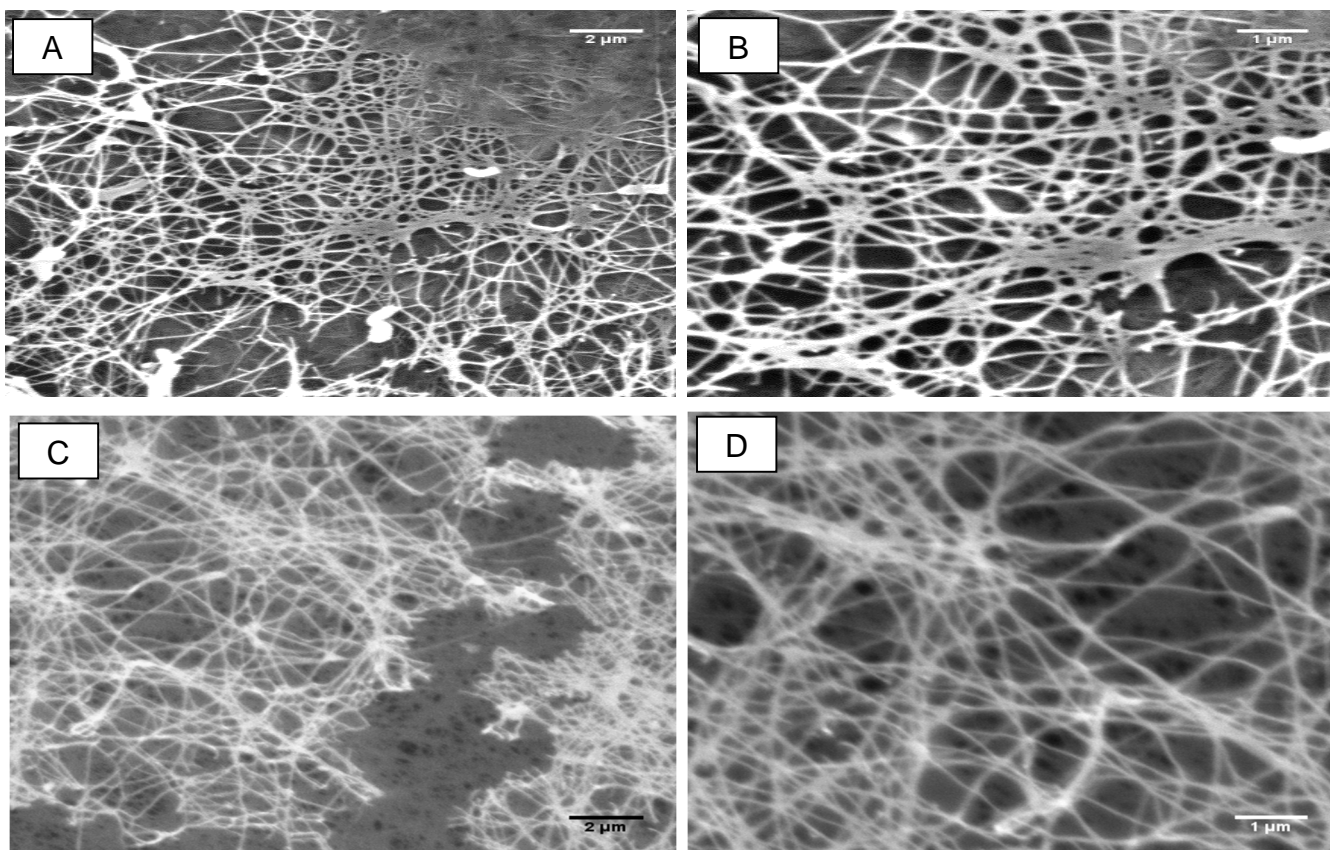
A estrutura em rede, composta por um emaranhado de fibras tipicamente nanométricas, é mostrada pelas micrografias das CB's obtidas a partir do extrato de algaroba com condições melhoradas e do meio sintético HS (Figura 18)

Foram realizadas 50 medições das dimensões das fibras das CB's partir das micrografias obtidas. Para a CB do extrato de algaroba a largura da fibra ficou em torno de 74 ± 7 nm e para a CB obtida do meio sintético HS essa largura foi de $76 \pm$ nm, esses valores estão de acordo com os valores relatados por PECORARO *et al* (2008) e CHAWLA *et al* (2009), que afirmam que os valores de largura das fibras de CB estão no intervalo de 70 a 80nm.

Diante dos resultados das características da CB obtida a partir do extrato de algaroba, observa-se que esse material polimérico é compatível com a CB obtida a

partir do meio sintético (HS) utilizado como referência, permitindo assim em estudos posteriores, que essa CB obtida a partir do extrato de algaroba possa ser aplicada na biomedicina, indústrias farmacêutica, materiais elétricos, ópticos e magnéticos, alavancando o interesse pela sua funcionalidade enquanto nano material de alta cristalinidade, juntamente com a crescente demanda de desenvolvimento de novas tecnologias como dispositivos eletrônicos e sensores inteligentes (GÓMEZ *et al.* 2011; MULLER *et al.* 2012; HUANG *et al.* 2014).

Figura 18 - Micrografias de CB obtidas a partir do extrato de algaroba com condições melhoradas e meio HS sintético. A e B – CB algaroba 5000x e 10000x / C e D – CB HS 5000x e 10000x.



6. Conclusões

As melhores condições estabelecidas para obtenção de CB utilizando o extrato de algaroba foram: pH 4,0, concentração inicial de açúcar 30 g/L, suplementação com extrato de levedura a uma concentração de 10 g/L, durante cinco dias de cultivo a temperatura de 30°C. As películas de CB produzidas nas condições otimizadas apresentaram-se com aspecto gelatinoso e adequada resistência ao manuseio. As caracterizações térmicas (TGA e DSC) e as análises de Raios-x e FTIR comprovaram ser possível obter películas com características padrões de CB obtidas em escala nanométrica, como alto grau de cristalinidade e termicamente mais estável, utilizando extrato de algaroba como substrato alternativo.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA I.F.; PEREIRA T.; SILVA N.H.C.S.; GOMES F.P.; SILVESTRE A.J.D.; FREIRE C.S.R.; COSTA P.C Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: an in vivo skin compatibility study. (2014) **Eur. J. Pharm. Biopharm**

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..

ALVES, M. F. Potencialidades biotecnológicas da algaroba (*prosopis juliflora sw, dc*) para produção de fermento biológico. Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande - **UFCG**- Campina Grande - Paraíba. 2008

ANDRADE, F.K.; PERTILE, R.N.; DOURADO, F.; GAMA, F.M., Bacterial cellulose: properties, production and applications. Editors: A. Lejeune, T. Deprez, pp. 427-458 **Nova Science. Publishers**. 2010

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 16 ed., Washington. 1995

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

BIELECKI, S; KRYSZYNOWICZ, A.; TURKIEWICZ, M.; KALINOWSKA, H. Bacterial Cellulose. **Biopolymers Online** 2005.

BORGES, I.F. Obtenção e caracterização do melado de algaroba (*Prosopis juliflora*) e sua utilização em uma formulação alimentícia. Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Paraíba - **UFPB**. João Pessoa, 2004

BRACELPA. Relatório Estatístico 2011/2012. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/estatisticas/rel2011.pdf>>. Acesso em: 4 jan. 2014.

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

BROWN, R. M. (2004), Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century?. **J. Polym. Sci. A Polym. Chem.**, 42: 487–495.
doi: 10.1002/pola.10877

BUDHIONO, A.; ROSIDI, B.; TAHER, H.; IGUCHI, M. Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in *nata-de-coco* culture system. **Carbohydr. Polym.** 40 (2000) 137–143

CANNON, R.E; ANDERSON, S. M. Biogenesis of Bacterial Cellulose. **Crit. Rev. Microbiol.**, 1991, 17, (6), 435-447.

- CARREIRA, P. M. D. C. Produção de celulose bacteriana a partir de resíduos industriais. Dissertação de Mestrado, v. Único, n. Universidade de Aveiro - Portugal, p. 72p, 2010.
- 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. **Bioresour. Technol.** v. 102, n.15, p. 7354-7360, 2011.
- 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. **Carbohydr. Polym.** v. 84, p. 96-102, 2011.
- 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. **Carbohydr. Polym.** v. 89, p. 1033-1037, 2012
- CHAO, Y.; SUGANO, Y.; SHODA, M. Bacterial cellulose production under oxygen-enriched air at different fructose concentrations in a 50-liter, internal-loop airlift reactor. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 55, n. 6, p. 673-679, 2001.
- CHÁVEZ, P.J. L.; MARTÍNEZ, S.Y.; ZENTELLA, C. E.; MARVÁN, E. Celulosa bacteriana en *gluconacetobacter xylinum*: Biosíntesis y aplicaciones. **Redalyc** 7(1):18-25, 2004
- CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 47, n. 2, p. 107-124, 2009.
- CHO, S.; ALMEIDA, N. Dietary fiber and health. **CRC Press** Taylor and Francis Group (2012)
- COBAN, E. P.; BIYIK, H. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter lovaniensis* HBB5. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 10, n. 27, p. 5346-5354, 2011.
- COSTA, L.F. Leveduras na nutrição animal. **Revi. Eletr. Nutrit.**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2004.
- CZAJA, W.; KRZYSTYNOWICZ, A.; BIELECKI, S. R.; BROWN, M. J. Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. **Biomaterials.** v. 27, p. 45-151, 2006.
- DAWSON, K. Not just bread and beer: new applications for yeast and yeast products in human health In: LYONS, T.P. AND JACQUES, K.A. (ed.). Proceedings of the 18TH Annual Symposium. **Allte.Biotech.**: Nottingham University Press, Nottingham, UK, p.225-232, 2002.
- DENARI, G.B.; CAVALHEIRO, E. T.G. Principios e aplicações de análises térmicas. Instituto de química de São Carlos. UFSP, 2012.

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

EMBUSCADO, M. E.; MARKS, J. S.; BEMILLER, J. N. Bacterial cellulose. I. Factors affecting the production of cellulose by *Acetobacter xylinum*. **Food Hydrocolloids**, v. 8, n. 5, p. 407-418, 1994.

FARIA, L. Caracterização taxonômica e produção de polissacarídeos utilizando bactérias isoladas de amostras de solo. 2002. Tese (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos)–Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto

FRICAIN J.C.; GRANJA P.L.; BARBOSA M.A.; BARTHE, B. N.; BAQUEY, C. Cellulose phosphates as biomaterials. In vivo biocompatibility studies. **Biomaterials**. 2002 Feb;23(4):971-980.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydr. Polym.** 2013; 92:1432-1442.

GEA, S.; REYNOLDS, T.C.; ROOHPUR, N.; WIRJOSENTONO, B.; SOYKEABKAEW, N.; BILLOTTI, E.; PEIJS, T. Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. **Bioresour. Technol.** 102 (2011) 9105-9110.

GARDNER, D. J.; OPORTO, S.G.; MILLS R.; SAMIR, A.S.A. Adhesion and Surface issues in cellulose and nanocellulose. **J. Adhes. Sci. Technol.**. 2008. **22**: 545-567

GOELZER, F.; FARIA-TISCHER, P.C.S.; VITORINO, J.C.; SIERAKOWISKI, M. R.; TISCHER, C.A.; Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinus* from processed rice bark. **Mater. Sci. Eng., Proc. Conf.** v. 29, n. 2, p. 546-551, 2009.

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. **IXI Simp. Nacio. Biop.** Agosto. 2010. Foz do Iguaçu. PR

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 Bioenergy**. v. 55, p. 205-211, 2013.

GOMES, F. P. A. Biossíntese de celulose bacteriana a partir de resíduos industriais. Dissertação de mestrado em biotecnologia alimentar. Universidade de Aveiro . 2011.

GÓMEZ H, RAM MK, ALVI F, VILLALBA P, STEFANAKOS EL, KUMAR A (2011) Graphene-conducting polymer nanocomposite as novel electrode for supercapacitors. **J. Power Sources** 196 (8):4102–4108

GOUVEIA, E.R; NASCIMENTO, R.T; SOUTO-MAIOR, A.M; ROCHA, G.J.M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 6, 1500-1503, 2009.

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 J. Chem. Eng.** v. 25, n. 4, p. 812-815, 2008.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochem J.**, v. 58, n. 2, p. 345-352, 1954.

HEURISON, S.S. Técnica de angulo de contato. Universidade Federal do Piauí - UFPI. Departamento de Física. 2010.

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 acetii* subsp. *xylinus* ATCC 23770. **Carbohydr. Polym.** v. 72, n. 3, p. 545-549, 2008.

HUANG, Y.; ZHU, C.; YANG, J.; NIE, Y.; CHEN, C.; SUN, D.; Recente advances in bacterial cellulose. **Cellulose.** (2014) 21:1-30

HUNGUND, B. S.; GUPTA, S. Improved production of bacterial cellulose from *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2. **J. Micro. Bioch. Tech.** v. 2, p. 127-133, 2010.

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose - a masterpiece of nature. **J. Mater. Sci.** 35: 261-270 p. 2000.

ISHIHARA, M. et al. Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 31, n. 7, p. 986-991, 2002.

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

JUNG, H. I. JEONG, J. H.; LEE, O.M.; PARK, G.T.; KIM, K.K.; PARK, H.C.; LEE, S.M.; KIM, Y.G.; SON, H.J. Production and Characterization of Cellulose by *Acetobacter* sp V6 Using a Cost-Effective Molasses-Corn Steep Liquor Medium. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 162, n. 2, p. 486-497, 2010.

KESHK, S.; SAMESHIMA, K. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 4, n. 6, p. 478-482, 2005.

KESHK, S. M.; RAZEK, T. M.; SAMESHIMA, K. Bacterial cellulose production from beet molasses. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 5, n. 17, 2006.

KLEMM, D.; SCHUMANN D.; UDHARDT U.; MARSCH S. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angew. Chem. Int.** v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.

- KLEMM, D.; SCHUMANN D.; UDHARDT U.; MARSCH S. Bacterial synthesized cellulose—artificial blood vessels for microsurgery. **Prog. Polym. Sci** v. 26, n. 9, p. 1561-1603, 2001.
- KONDO, T. Hydrogen Bonds in Cellulose and Cellulose Derivatives, in Polysaccharides: structural diversity and functional versatility, S. Dumitriu (Ed.), Marcel Dekker, 2005.
- KONGRUANG, S. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 148, n. 1-3, p. 245-256, 2008.
- KRYSTYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; CZAJA, W.; RZYSKA, M. Application of bacterial cellulose for clarification of fruit juices. **Prog. Biotechnol.** 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. **Carbohydr. Polym.**, v. 76, n 2, p. 333-335, 2009.
- LUTZ, I. A. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. **Instituto Adolfo Lutz, São Paulo**, 2008.
- MAEDA, H. et al. Bacterial cellulose/ silica hybrid fabricated by mimicking biocomposites. **J. Mater. Sci.**, v. 41, n. 17, p. 5646-5656, 2006.
- MASAOKA, S.; OHE, T.; SAKOTA, N. PRODUCTION OF CELLULOSE FROM GLUCOSE BY ACETOBACTER-XYLINUM. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 75, n. 1, p. 18-22, 1993.
- 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. **J. Appl Microbiol.** 2009; 107:576-583.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MOHARRAM, M.A., MAHMOUD, O.M., 2008. FTIR spectroscopic study of the effect of microwave heating on the transformation of cellulose I into cellulose II during mercerization. **J. Appl. Polym. Sci.** 107, 30–36.
- MULLER, D. Incorporação de polímeros intrinsecamente condutores em nanofibras de celulose bacteriana. Tese. Engenharia de Materiais. Universidade Federal de Santa Catarina. **UFSC**. 2012.
- MULLER D, MANDELLI JS, MARINS JA, SOARES BG, PORTO LM, RAMBO CR, BARRA GMO (2012) Electrically conducting nanocomposites: preparation and properties of polyaniline (PAni)-coated bacterial cellulose nanofibers (BC). **Cellulose** 19(5):1645–1654
- NUNES, A.S.C. Bacterial Cellulose as a Nanostructured Functional Material for Biomedical Applications. Dissertação de mestrado - Escola de Engenharia Universidade de Minho. 2012.

OLIVEIRA, N. F. Avaliação Físico-química e funcional da algaroba *prosopis juliflora* proveniente da mesoregião agreste do Rio Grande do Norte. Dissertação de mestrado, Univ. Fed. Rio Grande do Norte - **UFRN**, Fevereiro, 2011

OIKAWA, T.; OHTORI, T.; AMEYAMA, M. Production of cellulose from d- mannitol by acetobacter- xylinum ku- 1. **Biosci.Biotechnol. Biochem.** v. 59, n. 2, p. 331-332, 1995.

O'SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v.4, p.173-207. 1997.

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

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

PEGADO, C. M. A.; ANDRADE, L.A.; FÉLIZ, L.P.; PEREIRA, I.M. Efeitos da invasão biológica de algaroba-*Prosopis juliflora* (Sw.) DC. sobre a composição ea estrutura do estrato arbustivo-arbóreo da caatinga no Município de Monteiro, PB, Brasil. **Acta Bot. Bras.** v. 20, n. 4, p. 887-898, 2006.

PÉRTILE, R.A.N. "Bacterial cellulose: studies on biocompatibility, surface modification and interaction with cells", Centre os Biological Engineering, Universidade do Minho, 2010

PIOTTO, Z. C. Eco-eficiência na indústria de celulose e papel. 357 p. Tese (Doutorado em Engenharia) – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.

POLETTTO, M.; PISTOR, V.; ZATTERA, A.J.; Structural Characteristics and Thermal Properties of Native Cellulose. **Cellulose - Fundamental Aspects**, Dr. Theo G.M. Van De Ven (Ed.), ISBN: 978-953-51-1183-2, InTech, DOI: 10.5772/50452 (2013)

RAMANA, K.; TOMAR, A.; SINGH, L. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 16, n. 3, p. 245-248, 2000.

RANI, M. U.; APPAIAH, K. A. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 using coffee cherry husk. **J. Microbiol Biotechnol** p. 1-8, 2011.

RECOUVREUX, D. D. O. S. Desenvolvimento de novos biomateriais baseados em celulose bacteriana para aplicações biomédicas e de engenharia de tecidos. Dissertação de Mestrado.universidade Federal de Santa Catarina. 2008.

RIBASKI, J.; DRUMOND M. A.; OLIVEIRA, V.R.; NASCIMENTO, C.E.S. Algaroba (*Prosopis juliflora*): árvore de uso múltiplo para a região semiárida brasileira. **Embrapa Florestas. Comunicado Técnico**, v. 240, 2009.

RIVAS, B. et al. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. **Int. J. Food Microbiol.** v. 97, n. 1, p. 93-98, 2004. ISSN 01681605.

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. **Microbiol. Molecul. Biol. Rev.** v. 55, n. 1, p. 35, 1991.

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

SANTOS, W. L. P.; REIS, I.N.; MOREIRA, J.E.B.; BRASILEIRO, L.B. Papel, como se fabrica? **Quím.Socie.** São Paulo: Nova Geração, 2005.

SCHENZEL, K.; FISCHER, S.; BRENDLER, E. New method for determining the degree of cellulose I crystallinity by means of FT Raman spectroscopy. **Cellulose**, v.12, n.3, p.223-231. 2005.

SHI, Z. et al. Utilization of bacterial cellulose in food. **Food Hydrocolloids**, 2013.

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. **Biotechnol. Bioprocess Eng.** v. 10, n. 1, p. 1-8, 2005..

SILVA, J.; TOLEDO, R.; ALBINO, L. Composição química e valores energéticos da semente de cunhã (*Clitoria ternatea* L.) feijão guandú (*Cajanus cajan*) e da vagem de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC) para aves. **Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia**, v. 38, p. 891-892, 2001.

SILVA, C.G.M.; MELO FILHO, A.B.; PIRES, E.F.; STAMFORD, T.L.M.; Caracterização Físico-química e microbiológica da farinha de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW.) DC). **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, 27(4): 733-736, 2007

SILVA C.G. Otimização do processo de produção da aguardente de algaroba e aproveitamento dos resíduos sólidos em produtos alimentares. 232f. 2009 (tese) Centro de tecnologia. Universidade Federal de Campina Grande. **UFCG**. Campina Grande

SOKOLNICKI, A. M; FISHER, RJ; HARRAH, TP; KAPLAN, DL. Permeability of bacterial cellulose membranes. **J. Membr. Sci.** 2006, 272, (1-2), 15-27.

SON, H. J.; HEO, M.S.; KIM, Y.G.; LEE, S.J. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter*. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v. 33, n. 1, p. 1-5, 2001.

- 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. **Bioresour. Technol.** v. 86, n. 3, p. 215-219, 2003
- STEIN, R. B. D. S.; TOLEDO, R.L.A.; ALMEIDA, F.Q.; ARNAUT, A.C.; PATITUCCI, L.T.; NETO, J.S.; COSTA, V.T.M. Effects of feeding mesquite pod meal (*Prosopis juliflora* (Swartz) D.C.) for horses. **R. Brasi. Zootec.** v. 34, p. 1240-1247, 2005.
- SUN D.; ZHOU WU Q.; YANG S. Preliminary research on structure and properties of nano-cellulose. **J. Wuhan Univ Technol Mater Sci Ed** 22(4):677–680 (2007)
- SUNLEE. Sunlee - Distribuidora de Produtos Alimentícios. 2013. Acesso em: 01 de Outubro de 2013 as 10:11 horas.
- STEINBUCHER, A. ; Doi Y. , **Biotechnol. Biopolym.** Wiley-VCH Verlag , Weinheim 2005 p.381 .
- TABUCHI, M. Nanobiotech versus synthetic nanotech? **Nat. Biotechnol.** v. 25, n. 4, p. 389-390, 2007.
- HOMPSON, D. N.; HAMILTON, M. A. Production of bacterial cellulose from alternate feedstocks. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 91-3, p. 503-513, 2001.
- TIBBETTS, G.W. Nucleotides from yeast extract: potential to replace animal proteinsources in food animal diets. In: In: Lyons, T.P. and Jacques, K.A. (ed.). Proceedings of the 18TH Annual Symposium. Proceed., Nottingham: Nottingham University Press, p.225-232, 2002.
- TOMÉ, L. S. C. Preparação e avaliação da permeabilidade de substratos de celulose modificados. Dissertação em Materiais derivados de recursos renováveis. Universidade de Aveiro. Portugal. 2008.
- TONOUCHI, N.; TSUCHIDA, T.; YOSHINAGA, F.; BEPPU, T.; HORINOUCHE, S. Characterization of the biosynthetic pathway of cellulose from glucose and fructose in *Acetobacter xylinum*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 60 (8) 1996: 1377-1379
- TROVATTI, E.; SERAFIM, L. S.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. *Gluconacetobacter sacchari*: An efficient bacterial cellulose cell-factory, **Carbohydr.Polym.**, v. 86, n. 3,p. 1417-1420, 2011
- VANDAMME, E. J., BAETS, S., VANBAELEN, A., JORIS, K., WULF, P. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. **Polym. Degrad. Stab.** v.59, n. 1-3, p.93–99, 1998.
- VAZQUEZ, A.; FOREST, M.L.; CERRUTI, P.; GALVANO, M. Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by *Gluconacetobacter xylinus*. **J. Polym. Environ.** p. 1-10, 2013.WAN, Y.; HONG, L.; JIA, S.R.; HUANG, Y.; ZHU, Y.; WANG, Y.L.; JIANG, H.J. Synthesis and characterization of hydroxyapatite–bacterial cellulose nanocomposites. **Compos. Sci. Technol.** 66, n. 11, p. 1825-1832, 2006. 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. **Afr. J. Biotechnol.** v. 10, n.72, p. 16267-16276, 2011.

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

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.-I.; ISHIKAWA, T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 61, n. 8, p. 1244-1251, 1997.

YANG C, GAO C, WAN Y, TANG T, ZHANG S, DAI K Preparation and characterization of three-dimensional nanostructured macroporous bacterial cellulose/agarose scaffold for tissue engineering. **J. Porous Mater.** 18(5):545–552 (2011)

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

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. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 61: 219-224 p. 1997.

ANEXO

O crescimento da bactéria *G. hansenii* ATCC 23769 para a obtenção de um inóculo ideal, foi avaliado através do monitoramento da absorbância do mesmo em um tempo de 9 dias. A análise foi iniciada através de medição da absorbância do meio HS sem adição de cultura, como ponto inicial (dia zero) e posteriormente, nos demais dias, essa medição era realizada no caldo HS contendo bactérias *G. hansenii* ATCC 23769, considerando a turbidez do meio como indicativo de aumento de biomassa.

De acordo com o gráfico da Figura A1, no tempo de 3 dias de incubação é o período que indica a fase logarítmica do crescimento microbiano, sendo este o período escolhido como ideal para o tempo de incubação do inóculo contendo *G. hansenii* ATCC 23769. Segundo, BORGES e colaboradores (2013), a absorbância está diretamente relacionada com a concentração de células ativas.

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

