

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

JACQUELINE DE MORAIS CAMPÊLO

PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA EM MEIO DE GLICEROL

RECIFE
2017

JACQUELINE DE MORAIS CAMPÊLO

PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA EM MEIO DE GLICEROL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Processos Bioquímicos
Linha de pesquisa: Produção de biopolímeros

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Glória Maria Vinhas
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Olga Martins Marques

Recife
2017

Catálogo na fonte
Bibliotecária Valdicéa Alves, CRB-4 / 1260

C193p Campêlo, Jacqueline de Morais.
 Produção de celulose bacteriana em meio de glicerol / Jacqueline de
 Morais Campêlo - 2017.
 83folhas. Il.; Tab.; Abr.; e Sigl.

 Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Glória Maria Vinhas.
 Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Olga Martins Marques.

 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.
 Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2017.
 Inclui Referências Anexos e Apêndices.

 1. Engenharia Química. 2. Celulose bacteriana. 3. Gluconacetobacter
 hansenii. 4. Glicerol. I. Vinhas, Glória Maria. (Orientadora). II. Marques, Marques.
 (Coorientadora). III. Título.

UFPE

660.2CDD (22. ed.)

BCTG/2018- 97

JACQUELINE DE MORAIS CAMPÊLO

PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA EM MEIO DE GLICEROL

Linha de Pesquisa: Processos Bioquímicos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, defendida e aprovada em 19 de Dezembro de 2017 pela banca examinadora constituída pelos seguintes membros:

Prof^ª. Dr^ª. Glória Maria Vinhas/DEQ-UFPE
(Orientadora)

Prof^ª. Dr^ª. Olga Martins Marques/DEQ-UFPE
(Coorientadora)

Prof. Dr. José Marcos Francisco da Silva/DEQ-UFPE
(Examinador Interno)

Prof. Dr. Nelson Medeiros de Lima Filho/DEQ-UFPE
(Examinador Interno)

Prof^ª. Dr^ª. Samara Alvachian Cardoso Andrade/DEQ-UFPE
(Examinadora Externa)

*Dedico este trabalho a todos os que amo
e que contribuíram direta e
indiretamente para o meu progresso,
fazendo de mim a pessoa que sou hoje.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por nortear a minha vida, por ter me abençoado em todos os momentos e pela certeza de que Ele sempre cuidou e cuidará de mim.

Aos meus amados pais, Edson e Sandra, por todo incentivo incondicional durante toda a minha vida, por toda força, que mesmo com todas as dificuldades, sempre estiveram ao meu lado, me apoiando independente de qualquer coisa. Vocês são meu porto seguro e minha segurança de que as coisas sempre dão certo. Tudo o que tenho de bom em mim, eu sei que foram vocês que me ensinaram. Meu amor por vocês é eterno.

Às minhas queridas professoras e amigas, Glória e Olga, por todos os ensinamentos essenciais durante a minha formação, por todo apoio, atenção e dedicação, não medindo esforços e pela confiança demonstrada em meu trabalho. Vocês são verdadeiros exemplos de profissionais do ensino, sempre dispostas a ajudar e transmitir o conhecimento com tanto carisma e alegria. Obrigada pela orientação indispensável, pelos risos, conselhos e todo o tempo dedicado na orientação deste trabalho.

Ao meu querido esposo Demetrius, por todo o incentivo, apoio, compreensão, carinho e por todas as conversas e ensinamentos que me fazem buscar ser sempre uma pessoa melhor e querer transformar o mundo num lugar melhor através da busca e transmissão do conhecimento.

A UFPE que me acolheu como aluna e servidora por um período, e me deu a oportunidade de conhecer os meus amigos e professores que tanto me apoiaram, torceram, deram sugestões e ajudaram no decorrer das etapas desse trabalho e de outros trabalhos, como também da minha vida.

Aos queridos amigos da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental e do Departamento de Física desta Universidade, que me auxiliaram bastante nas caracterizações da biomembrana estudada neste trabalho.

E àqueles que contribuíram direta ou indiretamente na concretização deste sonho.

Meus sinceros agradecimentos!

"Não há progresso sem esforços, vitória sem luta, aperfeiçoamento sem sacrifício e tranquilidade sem paciência."

(Chico Xavier)

RESUMO

A celulose bacteriana (CB) é um polímero que vem cada vez mais sendo estudado como polímero alternativo e sustentável em diversas áreas com diferentes aplicabilidades, devido principalmente às suas características estruturais, mecânicas e biocompatíveis. Este polímero pode ser produzido por alguns grupos de micro-organismos, dentre eles destaca-se a bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, que é capaz de produzir celulose bacteriana em altos rendimentos utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Diversas fontes alternativas vêm sendo estudadas para a produção da CB, devido à baixa viabilidade econômica de produzi-la com meio sintético. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção da CB a partir de dois diferentes meios, um tradicional, Hestrin-Schram modificado e outro alternativo, contendo glicerol e sais, que foi denominado de salino, e ambos, utilizando como principal substrato o resíduo agroindustrial, glicerol. A produção foi feita pelo micro-organismo *Gluconacetobacter hansenii*, em condições estáticas e a temperatura ambiente. De modo a aperfeiçoar o processo no meio alternativo, fez-se um planejamento fatorial (2^3), em que variou-se o pH, a concentração do substrato e a concentração de cálcio. A maior produção de CB foi obtida após o cultivo de 10 dias, utilizando-se 40 g.L^{-1} de glicerol, pH 6 e 3 g.L^{-1} de CaCl_2 . Já para o meio tradicional Hestrin-Schram utilizou-se a mesma concentração de glicerol do meio alternativo salino. Foram feitas as avaliações da produção, produtividade da CB, massa da biomembrana, perda de água e capacidade de absorção de água. Além disso, foram feitas as caracterizações através das análises de FTIR, TGA, MEV, DRX e propriedades mecânicas para avaliar e comparar as características obtidas nas biomembranas produzidas com as da literatura. Um estudo cinético foi realizado com a produção da membrana durante 30 dias de cultivo, avaliando-se a variação do substrato, produção do biopolímero e o crescimento de células planctônicas. Em paralelo também houve a avaliação da variação da espessura e do pH da biomembrana e do meio, respectivamente. Com os parâmetros cinéticos, como produtividade, fator de conversão, velocidade máxima de crescimento, foi possível modelar o crescimento do meio Hestrin-Schram modificado através do modelo de Monod, utilizando-se a constante encontrada experimentalmente. Concluiu-se que as biomembranas obtidas nos dois meios apresentaram características coerentes com as da literatura e que o meio Hestrin-Schram modificado apresentou-se como um meio mais propício para uma maior produção da biomembrana.

Palavras-chave: Celulose bacteriana. *Gluconacetobacter hansenii*. Glicerol.

ABSTRACT

Bacterial cellulose (CB) is a polymer that is increasingly being studied as an alternative and sustainable polymer in several areas with different applications, mainly due to its structural, mechanical and biocompatible characteristics. This polymer can be produced by some groups of microorganisms, among them the bacterium *Gluconacetobacter hansenii*, which is able to produce bacterial cellulose in high yields using different sources of carbon and nitrogen. Several alternative sources have been studied for CB production, due to the low economic feasibility of producing it with synthetic medium. The present work had as objective to evaluate the production of the CB from two different media, one traditional, Hestrin-Schram modified and another alternative, containing glycerol and salts, that was denominated of saline, and both, using as main substrate agroindustrial residue, glycerol. The production was made by the microorganism *Gluconacetobacter hansenii*, under static conditions and at room temperature. In order to improve the process in the alternative medium, a factorial planning (2^3) was done, in which the pH, the substrate concentration and the calcium concentration were varied. The highest CB production was obtained after the 10 day culture using 40 g.L^{-1} glycerol, pH 6 and 3 g.L^{-1} CaCl_2 . For the traditional Hestrin-Schram medium, the same glycerol concentration of the alternative salt medium was used. Evaluations of the production, CB productivity, biomembrane mass, water loss and water absorption capacity were made. In addition, the characterizations were made through the FTIR, TGA, SEM, XRD and mechanical properties analyzes to evaluate and compare the characteristics obtained in the biomembranes produced with those of the literature. A kinetic study was carried out with the production of the membrane during 30 days of cultivation, evaluating the substrate variation, biopolymer production and planktonic cell growth. In parallel there was also the evaluation of the variation of the thickness and the pH of the biomembrane and the medium, respectively. With the kinetic parameters, such as productivity, conversion factor, maximum growth rate, it was possible to model the growth of the modified Hestrin-Schram medium through the Monod model, using the experimentally found constant. It was concluded that the biomembranes obtained in the two media presented characteristics consistent with those of the literature and that the modified Hestrin-Schram medium presented as a more propitious medium for a greater biomembrane production.

Keywords: Bacterial cellulose. *Gluconacetobacter hansenii*. Glycerol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura química da celulose. Fonte: KLEMM <i>et al.</i> , 2001.	18
Figura 2 -	Diferenças entre as fibras de celulose bacteriana (I) e celulose vegetal (II) quando micrografadas. Fonte: DONINI <i>et al.</i> , 2010.	19
Figura 3 -	Diferenças entre a celulose bacteriana (a) no estado hidratado (b) seca. Fonte: DONINI <i>et al.</i> , 2010.	20
Figura 4 -	Gluconacetobacter excretando fibras celulósicas. Fonte: DONINI <i>et al.</i> , 2010.	21
Figura 5 -	Principais princípios e etapas envolvidas na produção de celulose bacteriana.	22
Figura 6 -	Esquema da via metabólica da celulose na <i>G. hansenii</i> . Fonte: LEE (2014).	23
Figura 7 -	Vias bioquímicas para a produção de celulose bacteriana por <i>G. hansenii</i> . Fonte: Ross adaptado, 1991.	24
Figura 8 -	Formação da celulose bacteriana. Fonte: SHI <i>et al.</i> , 2014.	25
Figura 9 -	Gráfico de Pareto dos valores dos efeitos de todas as variáveis estudadas na produção de CB a partir do meio salino.	46
Figura 10 -	Gráfico de valores observados <i>versus</i> valores previstos.	47
Figura 11 -	Superfície de resposta do planejamento fatorial.	48
Figura 12 -	Membranas úmidas produzidas a partir do meio salino.	49
Figura 13 -	Membranas secas produzidas a partir do meio salino.	49
Figura 14 -	Membrana úmida produzida a partir do meio Hestrin-Schram.	51
Figura 15 -	Membranas secas produzidas a partir do meio Hestrin-Schram.	52
Figura 16 -	Espectro de FTIR das biomembranas obtidas em meios de cultivo diferentes.	53
Figura 17 -	Termograma de TGA das celuloses úmidas obtidas dos diferentes meios.	56
Figura 18 -	Termograma de TGA das celuloses secas obtidas dos diferentes meios. ..	57
Figura 19 -	a) Micrografias da CB produzida no meio salino e b) : Micrografias da CB produzida no meio Hestrin-Schram.	58
Figura 20 -	a) Micrografias da CB produzida no meio Hestrin-Schram modificado e	

	b): Micrografias da CB produzida no meio salino.	59
Figura 21 -	Difratogramas das CB obtidas dos diferentes meios.	60
Figura 22 -	Gráfico da cinética de consumo de substrato e produção de CB produzida a partir do meio salino.	62
Figura 23 -	Gráfico da cinética de consumo de substrato e produção de CB produzida a partir do meio Hestrin-Schram modificado.	62
Figura 24 -	Imagens das membranas úmidas produzidas com o passar do tempo, os números das imagens correspondem ao números de dias (5 dias; 10 dias; 15 dias; 20 dias; 30 dias) a) produção a partir do meio salino b) produção a partir do meio Hestrin-Schram modificado	64
Figura 25 -	Variação da espessura em função do tempo das membranas de CB secas.	65
Figura 26 -	Variação de pH dos meios.	65
Figura 27 -	Gráfico da modelagem do processo com meio Hestrin-Schram.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição do meio para manutenção da cultura.	34
Tabela 2 -	Composição dos meios de cultura.	35
Tabela 3 -	Níveis codificados das variáveis para os ensaios.	37
Tabela 4 -	Níveis decodificados das variáveis do processo.	37
Tabela 5 -	Resultados do planejamento fatorial 2^3 aplicado ao processo realizado em 10 dias, sem agitação e a 30°C.	45
Tabela 6 -	Resultados relacionados à biomembrana produzida a partir do meio salino	50
Tabela 7 -	Resultados relacionados à biomembrana produzida a partir do meio Hestrin-Schram modificado.....	52
Tabela 8 -	Frequências típicas de absorção no Infravermelho para a celulose bacteriana.....	54
Tabela 9 -	Dados do ensaio mecânico, com a média e desvio padrão, realizado nas biomembranas obtidas dos diferentes meios.....	55
Tabela 10 -	Parâmetros cinéticos calculados para cada meio estudado.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAA-	Capacidade de Absorção de Água
CB-	Celulose Bacteriana
DRX-	Difração de raios-X
FTIR-	Infravermelho com Transformada de Fourier
HS-	Hestrin-Schram
IC-	Índice de cristalinidade
IUPAC-	International Union of Pure and Applied Chemistry
K_S .	Constante de Monod
MEV-	Microscopia eletrônica de Varredura
MH-	Meio Hestrin
MS-	Meios Salino
PR	Produtividade
$\mu_{m\acute{a}x}$ -	Velocidade máxima específica
$Y_{X/S}$ -	Coefficiente de conversão de células formada por substrato consumido
$Y_{P/S}$ -	Coefficiente de conversão de produto obtido por substrato consumido
TGA-	Análise Termogravimétrica
UFPE-	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Celulose bacteriana.....	18
2.2	Gluconacetobacter hansenii	20
2.3	Biossíntese da celulose bacteriana.....	21
2.4	Parâmetros que influenciam a produção de celulose bacteriana.....	25
2.4.1	Influência do pH	26
2.4.2	Influência da Temperatura	26
2.4.3	Influência do oxigênio dissolvido	27
2.4.4	Composição do meio de cultura	27
2.5	Planejamento fatorial.....	28
2.6	Utilização de resíduos industriais para a produção de celulose bacteriana.....	29
2.6.1	Glicerol como fonte de carbono	30
2.6.1.1	<i>Estudos utilizando o glicerol para produção de celulose bacteriana ...</i>	31
2.7	Aplicabilidade da celulose bacteriana.....	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	Micro-organismo	34
3.2	Estudo comparativo da Produção de Celulose Bacteriana a partir de diferentes meios	35
3.2.1	Preparo dos meios de cultura	35
3.2.1.1	<i>Crescimento celular: preparo do inóculo</i>	35
3.2.2	Ensaio preliminar para a produção de CB no meio de sais	36
3.2.3	Produção de CB no meio de Hestrin-Schram modificado	37
3.2.4	Condições de tratamento das membranas	38
3.3	Caracterização da Celulose Bacteriana	38
3.3.1	Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	38
3.3.2	Propriedades Mecânicas	38
3.3.3	Análise Termogravimétrica (TGA)	39
3.3.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	39

3.3.5	Difratometria de Raios-X (DRX)	39
3.3.6	Capacidade de absorção de água	40
3.4	Estudo cinético da produção de CB.....	40
3.4.1	Cálculos dos parâmetros cinéticos	41
3.4.1.1	<i>Velocidade Específica de Crescimento das células planctônicas</i>	41
3.4.1.2	<i>Coefficientes de Conversão</i>	42
3.4.1.3	<i>Produtividade</i>	42
3.4.1.4	<i>Conversão de substrato</i>	43
3.4.2	Modelagem matemática do processo	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	Estudo comparativo da produção de CB a partir de diferentes meios.....	45
4.1.2	Ensaio preliminar com planejamento fatorial da produção de CB no meio de sais	45
4.1.3	Celulose bacteriana produzida a partir de meio salino	48
4.1.4	Celulose bacteriana produzida a partir de meio Hestrin-Schram	50
4.2	Caracterização das membranas	53
4.2.1	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	53
4.2.2	Propriedades Mecânicas	55
4.2.3	Análise Termogravimétrica (TGA)	56
4.2.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	58
4.2.5	Difratometria de Raios-X (DRX)	60
4.3	Estudo cinético da produção de celulose bacteriana.....	61
4.3.1	Modelagem matemática	66
4.3.1.1	<i>Balanço de materiais</i>	67
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	72
	REFERÊNCIAS	74
	ANEXO	81
	APÊNDICE.....	82

1 INTRODUÇÃO

A preocupação ambiental, cada vez mais presente nas mais diferentes esferas da sociedade, tem gerado um crescente investimento e investigação na utilização de materiais que possuem melhor relação com o meio ambiente e, preferencialmente, derivados de recursos renováveis. Neste contexto, especial atenção tem sido dada aos biopolímeros, os quais podem substituir os polímeros tradicionais, derivados de fontes não-renováveis como o petróleo, numa elevada gama de aplicações (MATHUR *et al.*, 2015).

Entre os vários biopolímeros existentes, a celulose é o mais abundante, produzido principalmente pelas plantas. Além disso, é um dos mais importantes devido às suas mais versáteis aplicações em processos industriais, e o Brasil é o quarto maior produtor mundial, com produção anual de 18,77 milhões de toneladas (VALOR ECONÔMICO, 2017).

Processos industriais, normalmente, utilizam a celulose de origem vegetal, sendo obtida a partir da madeira e do algodão, gerando um alto consumo dessas matérias-primas. Fato este, que por sua vez, faz com que haja um aumento da exploração florestal, gerando uma maior necessidade de substituir o meio tradicional de produção por alternativas mais sustentáveis (PARK *et al.*, 2014). Uma rota vem sendo cada vez mais estudada para a diminuição da utilização da celulose vegetal, que é a outra forma de produção de celulose, através dos micro-organismos como algas, fungos e bactérias, que nesse caso, é denominada de celulose bacteriana (CB) (KESHK, 2014).

Em termos estruturais, a celulose vegetal é equivalente à bacteriana, e ambas são constituídas de unidades de β -D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas β -(1-4), em que as unidades monoméricas estão dispostas de tal maneira que uma molécula esteja rotacionada 180 graus em relação à outra (MOHITE; PATIL, 2014).

A principal diferença entre a celulose bacteriana da sua semelhante vegetal, ocorre principalmente na formação das fibras, por apresentar fibras de caráter nanométrico contra o micrométrico da vegetal, fato este, que lhe confere excelentes propriedades mecânicas, biodegradabilidade e maior cristalinidade (RAJWADE *et al.*, 2015). Outro aspecto importante diz respeito a pureza da celulose bacteriana, não havendo necessidade da separação de outros compostos como hemicelulose e lignina (REINIAT *et al.*, 2016). Essas características tornam a Celulose Bacteriana (CB) um biopolímero altamente versátil, possibilitando a sua utilização em diferentes setores economicamente importantes como produção de papel, síntese de membranas

compósitas, indústria alimentícia, farmacêutica e principalmente no setor biomédico (PICHETH *et al.*, 2017).

Apesar do enorme potencial de aplicação, a produção de CB ainda enfrenta alguns desafios como o elevado custo de produção e o baixo rendimento ocasionado pela falta de otimização do processo, tornando a sua obtenção comercialmente cara. Diante desta realidade, atualmente há um elevado interesse das indústrias no desenvolvimento de processos de produção mais econômicos (PICHETH *et al.*, 2017).

A CB pode ser produzida por bactérias dos gêneros *Sarcina*, *Agrobacterium* e *Gluconacetobacter*, sendo esta última a mais amplamente estudada (HUANG *et al.*, 2014). As bactérias do gênero *Gluconacetobacter* (anteriormente conhecidas por *Acetobacter*) são bactérias não patogênicas, comumente encontradas em frutas e vegetais, capazes de excretar celulose extracelularmente em forma de uma película na superfície do meio, como uma camada gelatinosa em cultivos estáticos, e em cultivos submersos agitados podem produzi-la como *pellets* formados no interior do meio de cultivo (GAMA *et al.*, 2012).

A síntese de CB é feita a partir de uma variedade de fontes de carbono, que atua não somente como fonte de energia, mas também como precursora da biossíntese do biopolímero. Assim, fontes de carbono provenientes de resíduos agroindustriais tem sido alvo de estudos com o objetivo do aproveitamento integral dos nutrientes contidos nos resíduos, como alternativa a meios sintéticos (VAZQUEZ *et al.*, 2013).

Entre os diversos ramos industriais, o Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel no mundo, com produção mensal, em agosto de 2017, de 399.997 m³ (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, 2016), gerando aproximadamente 40.000 m³ de glicerol residual, como coproduto, por meio da reação de transesterificação, em que estequiometricamente, 10 kg glicerol são gerados para cada 100 kg de biodiesel produzidos (SARMA *et al.*, 2012).

Dessa forma, com a elevada geração de glicerol e a dificuldade em ser utilizado por indústrias farmacêuticas e alimentícias como matéria-prima, pois os processos de purificação são onerosos, sua comercialização se torna inviável, aumentando assim, seus estoques (SARMA *et al.*, 2012). Além disso, sua disposição no meio ambiente, sem o tratamento adequado, pode causar diversos problemas como intoxicação, formação de espumas em ambientes aquáticos, mau cheiro, dentre outros (VIANA, 2011).

Portanto, assim como a produção de celulose, surge a necessidade de se encontrar caminhos viáveis e alternativos para o glicerol a fim de se manter a sustentabilidade econômica e ambiental. Dessa forma, o glicerol torna-se alternativa viável para a produção da CB, reduzindo custos de produção e contribuindo para a diminuição da poluição ambiental (MOHITE; PATIL, 2014).

O presente trabalho objetiva produzir celulose bacteriana utilizando resíduo agroindustrial, bem como caracterizar as membranas em função da alteração na composição do meio de fermentação.

Para os objetivos específicos, as principais atividades foram: produzir biopolímeros de celulose bacteriana, utilizando como fonte de carbono alternativa de baixo custo, um resíduo agroindustrial, o glicerol; comparar a produção utilizando dois meios diferentes, um sintético e outro composto por sais; selecionar a melhor condição de cultivo através de um planejamento fatorial; caracterizar os filmes de celulose bacteriana através da determinação da espessura, infravermelho (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), propriedades mecânicas, difratometria de raios-X (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV); realizar um estudo cinético em biorreator em batelada e determinar os parâmetros intrínsecos do sistema célula-membrana, tais como o coeficiente de conversão de substrato em produto e produtividade, e modelar o processo pelo modelo de Monod.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Celulose Bacteriana

A celulose ($C_6H_{10}O_5$)_n faz parte do grupo dos carboidratos, moléculas compostas basicamente de carbono, hidrogênio e oxigênio, também denominados por glicídios ou hidratos de carbono. É oriunda da junção de centenas de moléculas β-glicose, por meio de ligações β-1,4-glicosídicas, em que a unidade de repetição é a celobiose, a qual é formada pela união de duas moléculas de glicose. Dessa forma, sua hidrólise total produz moléculas de glicose e a hidrólise parcial produz celobiose (VAZQUEZ *et al.*, 2013).

Estruturalmente, cada monômero de glicose está rotacionado aproximadamente 180° em relação ao vizinho e a cadeia glicana pode conter de 2.000 a 25.000 monômeros de glicose, resultando num peso molecular bastante elevado. As ligações de hidrogênio garantem a forte associação do polímero linear de celulose, e como consequência, ocorre a formação de suas fibras, garantindo a rigidez da estrutura (TSOUKO *et al.*, 2015).

A Figura 1 mostra a estrutura química da celulose.

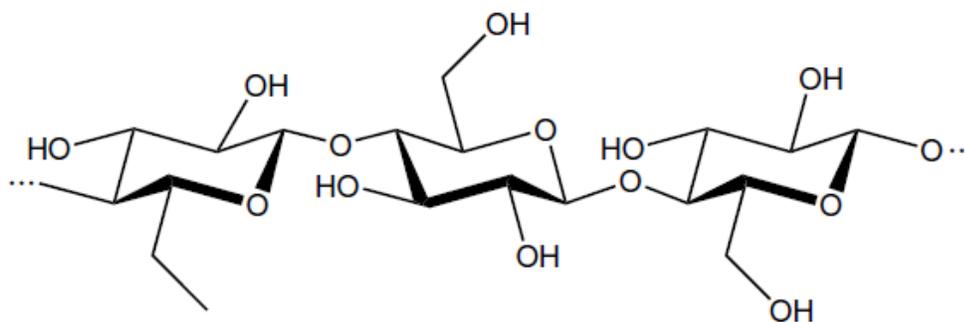


Figura 1: Estrutura química da celulose.
Fonte: KLEMM *et al.*, 2001.

A Celulose bacteriana (CB) foi descrita pela primeira vez na literatura em 1986, por A.J. Brown (BROWN,1986), que observou que alguns micro-organismos produtores de ácido acético eram capazes de produzir uma membrana na superfície do meio de cultura na presença de glicose e de oxigênio, denominando-os como *Bacterium xylinum* (BROWN,1986). Esta espécie, que pertence à família *Acetobacteriae*, foi reclassificada taxonomicamente diversas vezes até a atual designação como *Gluconacetobacter xylinum* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2005).

Apesar de possuir a mesma fórmula química da celulose vegetal, a CB possui propriedades químicas, físicas e mecânicas diferentes, devido, especialmente, às suas fibras nanométricas, contra as micrométricas da celulose vegetal, diferença mostrada na Figura 2 através de microscopia de varredura.

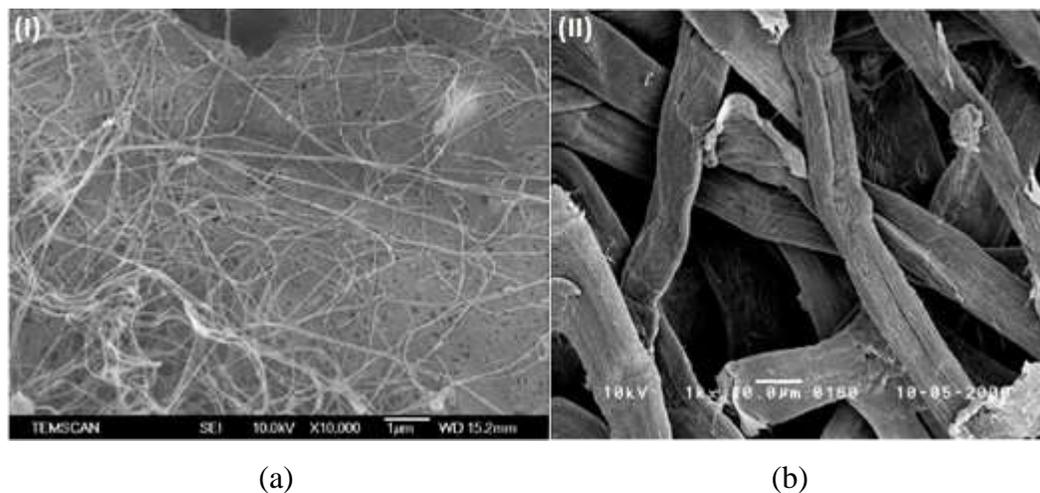


Figura 2: Diferenças entre as fibras de celulose bacteriana (a) e celulose vegetal (b) quando micrografadas.
Fonte: DONINI *et al.*, 2010.

As microfibrilas da CB (Figura 2a) em forma de fita, onde as unidades de celobiose estão dispostas em paralelo, conferindo a molécula de celulose uma orientação plana, são aproximadamente 100 vezes mais finas que as da celulose vegetal (Figura 2b), tornando-a um material de alta porosidade e excelentes propriedades mecânicas, além disso, é um biopolímero altamente cristalino, com alto grau de polimerização, alta força de tensão e elevada capacidade de hidratação, mesmo sendo insolúvel em água (YOSHINO *et al.*, 2013).

A celulose vegetal é produzida juntamente com outros compostos como hemicelulose, lignina e pectina, os quais precisam ser separados, e a separação é feita através de reações extremamente poluentes ao meio ambiente, com a geração de compostos organoclorados, por exemplo (DAS, 2013). Em contrapartida, a CB é obtida de forma pura, não contendo compostos indesejados, caso o processo seja bem conduzido. Além disso, após a retirada do microorganismo e de componentes do meio de cultivo, o processo de desidratação pode ser feito, sendo mais um fator que demonstra o amplo potencial econômico deste biopolímero. Dessa forma, obtém-se um produto com elevada aplicabilidade industrial, mais versátil, econômico e também ecologicamente sustentável (LIN *et al.*, 2014; KESHK, 2014).

A CB é produzida na forma de membrana gelatinosa (Figura 3a), composta por um alto teor de água, e quando seca assemelha-se a uma folha de papel translúcido (Figura 3b). Na Figura 3 está representada uma pequena porção de uma membrana de CB úmida (a) e seca (b).

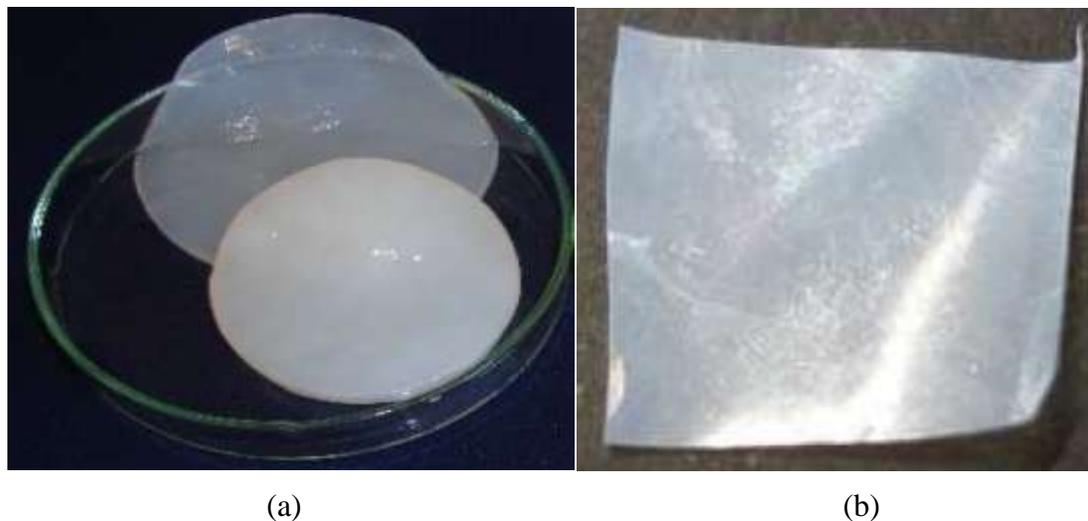


Figura 3: Diferenças entre a celulose bacteriana (a) no estado hidratado (b) seca.
Fonte: DONINI *et al.*, 2010.

2.2 *Gluconacetobacter hansenii*

Dentre todos os micro-organismos encontrados na literatura capazes de produzir celulose bacteriana, o mais utilizado e usado como modelo de produção é a bactéria *Gluconacetobacter hansenii* devido à sua capacidade de produzir celulose na presença de diferentes fontes de carbono e nitrogênio (LEE *et al.*, 2014).

A espécie *G. hansenii* apresenta morfologia de bastonetes retos ou ligeiramente curvos, alongados com um tamanho que varia entre $0.6-0.8 \times 10^{-4} \mu\text{m}$, podendo ser ou não móveis. São micro-organismos Gram-negativos, tolerantes a condições ácidas (pH abaixo de 5), estritamente aeróbios, não fotossintéticos, com uma temperatura ótima para crescimento entre os 15 e 34°C (LIMA, 2014). Pode-se encontrar a *G. hansenii* na superfície de frutas e vegetais em decomposição, no vinagre ou em bebidas alcoólicas (DAYAL *et al.*, 2013). Estas bactérias produzem quantidades consideráveis de CB a partir de diferentes substratos de carbono e fontes de nitrogênio complexas. Entre os micro-organismos pertencentes ao gênero *Gluconacetobacter* destacam-se ainda como produtores de CB as espécies *G. xylinus*, *G. pasteurianus*, *G. swingsii* e *G. sp. RKY5* (HUANG *et al.*, 2014). A Figura 4 mostra bactérias do gênero *Gluconacetobacter* excretando fibras de celulose bacteriana.

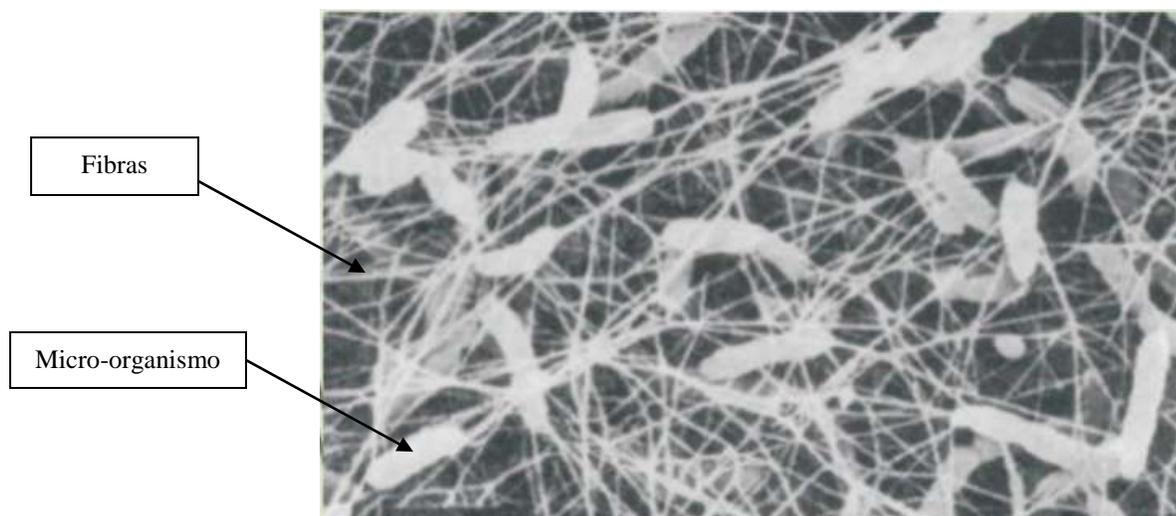


Figura 4: *Gluconacetobacter* excretando fibras celulósicas.
Fonte: DONINI *et al.* adaptada, 2010.

O biopolímero de celulose bacteriana desempenha importante papel para o micro-organismo, uma vez que funciona como mecanismo de flotação, onde a bactéria permanece em uma interface ar-líquido com a finalidade de obter oxigênio com mais facilidade. Por ser um material opaco, a biomembrana funciona como barreira à radiação UV, possui a capacidade de adsorver metais pesados e, por permanecer na superfície do meio, melhora o transporte de nutrientes pelo mecanismo de difusão (KLEMM *et al.*, 2011). E ainda previne a desidratação do substrato, uma vez que possui caráter altamente higroscópico, protegendo o substrato de micro-organismos não produtores do polímero (RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015).

2.3 Biossíntese da celulose bacteriana

A produção de celulose pela *G.hansenii* no meio de cultivo é associada ao crescimento celular. Assim, o consumo de nutrientes, especialmente a fonte de carbono, deve ser suficiente para a multiplicação celular e paralela produção de celulose (HUANG *et al.*, 2013).

Estima-se que produção de CB consome cerca de 10% da energia gerada nas reações catabólicas e não interfere nos processos anabólicos que ocorrem no meio intracelular (QURESHI *et al.*, 2013).

A Figura 5 mostra de forma simplificada as etapas envolvidas e os princípios de cada uma delas.

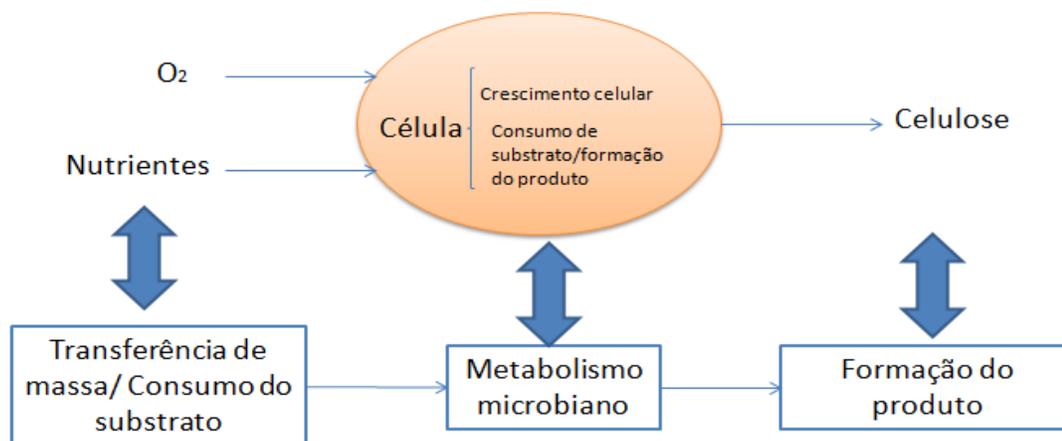


Figura 5: Principais princípios e etapas envolvidas na produção de celulose bacteriana.
Fonte: Autor.

A biossíntese da CB é um processo que envolve várias reações bioquímicas, as quais são reguladas por um número elevado de enzimas e de complexos de proteínas reguladoras e catalíticas (DONINI *et al.*, 2010).

Dependendo do estado fisiológico das células e da utilização do substrato para a produção da CB, a *G. hansenii* pode metabolizar pelo ciclo de Krebs, que envolve a oxidação de ácidos orgânicos, ou pelo ciclo das pentoses fosfato, onde ocorre a oxidação de carboidratos (LEE *et al.*, 2014).

O processo de biossíntese da CB está dividido em duas partes fundamentais, a primeira é a síntese do precursor da celulose, a uridina difosfoglicose (UDPGlc) e a segunda parte está relacionada com os mecanismos de polimerização (ROSS *et al.*, 1991; CHAWLA *et al.*, 2009).

De acordo com Lee (2014), quando a glicose, utilizada como fonte de carbono, é transportada do meio externo para o citoplasma bacteriano, sua conversão é catalisada por quatro enzimas principais:

- Glucoquinase: responsável pela fosforilação do carbono 6 da glicose;
- Fosfoglucomutase: catalisa a reação de isomerização da glicose-6-fosfato (Glc-6-P) para glicose-1-fosfato (Glc-1-P);
- UDPG-pirofosforilase (UGPase): sintetiza a UDP-glicose (UDPGlc);
- Celulose sintetase (CS): produz, de fato, a celulose a partir da UDP-glicose.

O esquema simplificado da via metabólica da celulose a partir da glicose na *G. hansenii* pode ser observado na Figura 6.

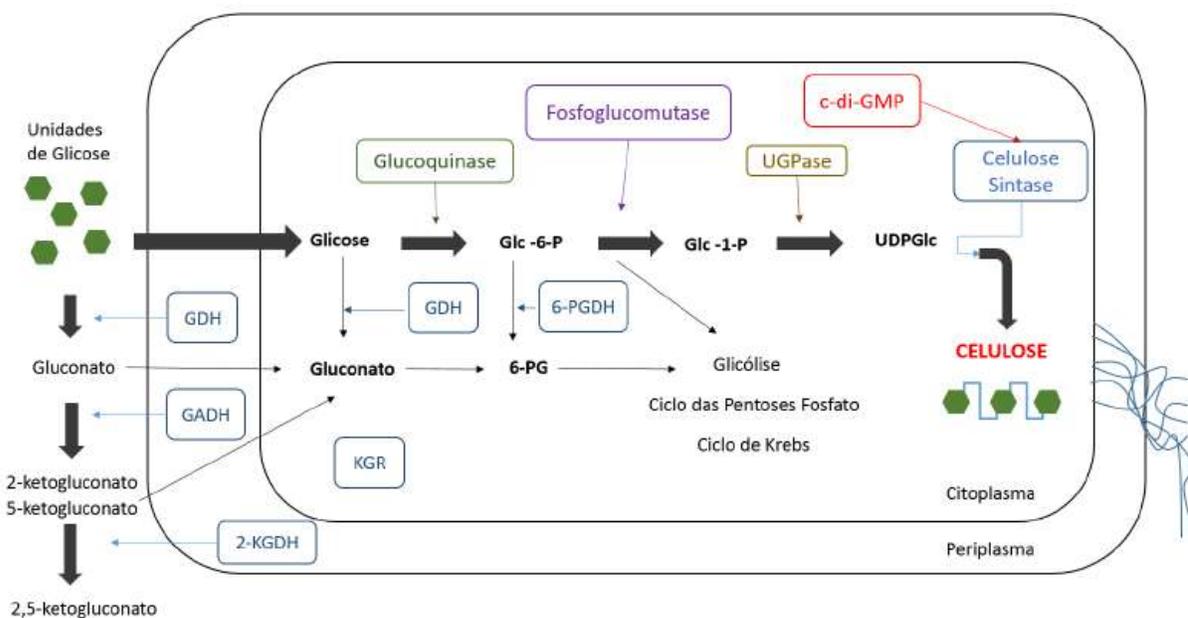


Figura 6: Esquema da via metabólica da celulose na *G. hansenii*.
Fonte: LEE (2014).

UDPGlc, o precursor direto da celulose, é um composto comum a muitos organismos. Já a enzima UGPase, que é bastante importante no processo de síntese da CB, é aproximadamente 100 vezes mais ativa em organismos produtores de celulose do que não produtores (SUNAGAWA *et al.*, 2013).

Em casos em que a fonte de carbono utilizada é diferente da glicose, como glicerol, dissacarídeos como manitol ou frutose, a via metabólica de síntese da celulose começa pela hidrólise desses compostos em monossacarídeos como frutose e glicose.

As vias bioquímicas e as etapas intermediárias na transformação desses substratos são mostradas na Figura 7.

ii) montagem e cristalização das cadeias de celulose, considerada a etapa limitante do processo com o entrelaçamento da estrutura (TABUCHI, 2007).

A CB começa a ser sintetizada quando a bactéria origina cadeias que se agregam originando sub-fibrilas com largura de, aproximadamente, 1,5 nm, as quais se agrupam com outras 36 iguais a elas, formando uma fibrila elementar com um diâmetro de aproximadamente 3-3,5 nm. Aproximadamente 46 fibrilas adjacentes juntam-se através de pontes de hidrogênio formando um *ribbon*, nome dado às fibras de CB (Figura 8). Esses *ribbons* ultra finos atingem comprimentos que variam entre 1 e 9 μm , e formam uma estrutura reticulada densa, que é estabilizada por pontes de hidrogênio (PECORARO *et al.*, 2008).

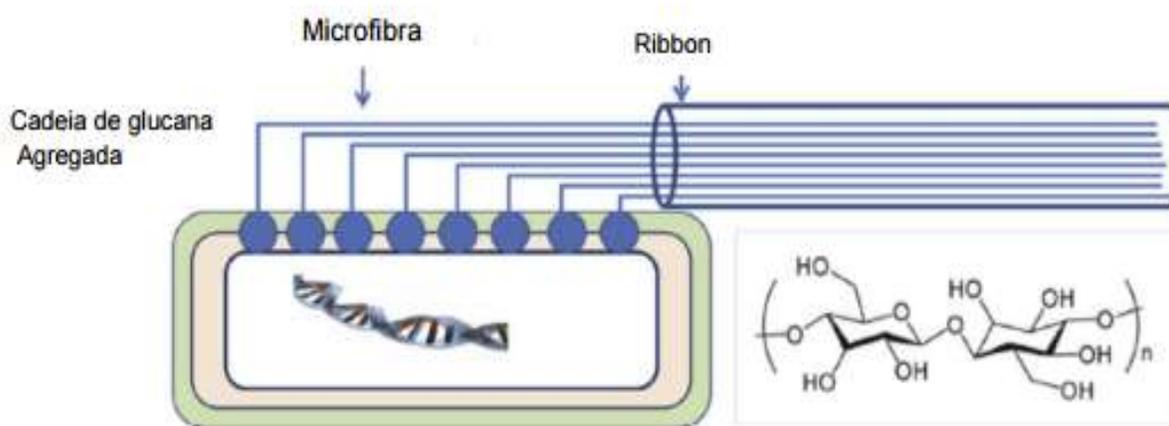


Figura 8: Formação da celulose bacteriana.

Fonte: SHI *et al.*, 2014.

A película formada de CB é o resultado de uma matriz de tiras interligadas. Como a celulose formada possui diversos grupos hidroxila dispostos em sua superfície, esse fato explica sua biodegradabilidade, hidrofiliçidade e sua alta capacidade de modificação química para diversas aplicações industriais (CASTRO *et al.*, 2011).

2.4 Parâmetros que influenciam a produção de celulose bacteriana

Alguns parâmetros operacionais são determinantes na produção do biopolímero, pois os micro-organismos tendem a responder rapidamente no que diz respeito à indução ou à inibição da atividade proteica e mudanças na morfologia celular, entre eles destacam-se: temperatura, pH, oxigênio dissolvido no meio e composição do meio de cultura.

2.4.1 Influência do pH

Variações no pH durante o processo fermentativo podem resultar em aumento ou diminuição no consumo de açúcares, devido as alterações na atividade e síntese enzimática, conseqüentemente afetando a divisão celular e quantidade de nutrientes disponíveis. Meio com diferentes condições iniciais de pH conduzem a respostas diferentes quanto à produção de CB (PANESAR *et al.*, 2012).

O pH ótimo para a o crescimento de bactérias e paralela produção de CB depende da estirpe do micro-organismo utilizado, normalmente variando entre 4 e 7. Segundo Yassine *et al.*(2016), a produção de CB foi observada em amplas faixas de pH, em meio de glicose, entre 4,5 e 7,5 com a maior produção ocorrendo a pH 6,5.

A produção industrial de membranas de CB para aplicações biomédicas, por exemplo, nomeadamente Biofill e Gengiflex, foi conduzida a pH baixo, entre 4 e 4,5, a fim de evitar a contaminação do meio durante o cultivo. (PANESAR *et al.*, 2012).

Embora a CB possa ser produzida em amplas gamas de pH, deve-se ter cuidado com a variação do pH do meio, que pode diminuir durante a produção de CB, devido à produção de metabólitos de caráter ácido, como os ácidos glucônico, láctico e acético, nesse caso para evitar uma boa diminuição, é interessante fazer a adição de um tampão (CHAWLA *et al.*, 2009).

2.4.2 Influência da Temperatura

Outro parâmetro importante no processo de produção da CB é a temperatura em que o processo é conduzido. Son *et al.* (2001) estudaram a influência da temperatura, na faixa de 20 a 40 ° C no rendimento de BC produzida em meio Hestrin-Schram, encontraram que a temperatura ideal para a produção de BC foi 30°C. Além disso, verificaram que ao baixar a temperatura da cultura de 30 °C para 25°C, não diminui significativamente o rendimento da CB em comparação com a diminuição de 35 °C para 30 °C. Resultados semelhantes foram encontrados por Erbas *et al.* (2015) e Zeng *et al.* (2011).

Além do rendimento na produção de CB, a estrutura da morfologia e do cristal foi afetada por temperatura de cultivo. Hirai *et al.*(1997) relataram que CB produzida por *A. xylinum* ATCC 23769 em meio Hestrin-Schram a 4 °C estava com uma estrutura de celulose II, em que o pico cristalino característico está situado entre os ângulos $13^{\circ} \leq 2\theta \leq 15^{\circ}$ e $18^{\circ} \leq 2\theta \leq 22^{\circ}$, enquanto CB produzida em 28 °C, por outro lado, obtiveram celulose do tipo I, onde o halo amorfo e o pico cristalino ficam situados entre os ângulos $18^{\circ} \leq 2\theta \leq 19^{\circ}$ e $22^{\circ} \leq 2\theta \leq 23^{\circ}$.

2.4.3 Influência do oxigênio dissolvido

Este parâmetro é essencial para o metabolismo de respiração celular, que interfere no aumento do rendimento, como também nas propriedades do polímero final. A CB pode ser produzida tanto em meio estático quanto em meio agitado, e a escolha de cada caso é feita de acordo com a aplicação desejada.

Em meio agitado, a CB pode formar grânulos, ou *pellets*, e ainda tornar o meio viscoso com a presença de celulose em estruturas gelatinosas. O cultivo em meio agitado é geralmente utilizado quando se deseja aumentar a produção de celulose em massa e quando não há interesse na formação da película. Já em meio estático, a biomembrana permanece na interface líquido-ar formando uma película, que aumenta de tamanho com o tempo de cultivo (ERBAS *et al.*, 2015).

Yan *et al.* (2008) estudaram que a resistência mecânica também pode ser influenciada pelo meio a qual foi produzida, e que a CB obtida do meio agitado possui menor resistência se comparada à produzida no meio estático.

Hungud e Gupta (2010) mostraram que altas taxas de oxigênio dissolvido, obtidas no cultivo agitado, podem aumentar a concentração de ácido glucônico, inviabilizando a célula a sintetizar a celulose.

2.4.4 Composição do meio de cultura

Em relação à composição do meio de cultura, a literatura relata estudos realizados os quais relacionam a 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 (MIKKELSEN *et al.*, 2009).

O principal meio de produção de CB é o meio sintético HS, mencionado em Hestrin-Schram (1954), em que a glicose e o ácido cítrico são utilizados como fonte de carbono, e o extrato de levedura e a peptona são utilizados como fontes de nitrogênio. Castro e colaboradores (2011) verificaram a produção de CB por *Gluconacetobacter swingsii*, utilizando outros açúcares (maltose, frutose, celobiose, manitol, xilose, sacarose e galactose) em substituição à glicose no meio HS e observaram que tais fontes não proporcionaram maior produção. Em contrapartida, Hong e Qui (2008) e Yodswan e colaboradores (2012) utilizando a cepa *G. xylinus*, consideraram

que o manitol e a frutose são as melhores fontes de carbono para a produção de CB. Já Keshk e Sameshima (2006) e Jung *et al.* (2010) obtiveram uma produção significativa apenas com o uso de glicose, frutose e glicerol, como fontes de carbono.

Além das fontes principais de carbono, nitrogênio e fósforo, os meios precisam conter elementos em menor quantidade, chamados oligoelementos, como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} entre outros, os quais desempenham papel importante como cofatores enzimáticos nas vias de produção do polissacarídeo.

Então, determinar um meio ideal e um conjunto adequado de condições de crescimento que permitam altos níveis de produção de celulose agrega características necessárias para ampliação desta tecnologia para uma situação industrial (RUKA *et al.*, 2012).

2.5 Planejamento fatorial

O planejamento experimental é uma ferramenta poderosa para estudar o efeito de vários fatores sobre uma variável de resposta de interesse e permite correlacionar as variáveis independentes com a dependente através de um número mínimo de ensaios. No planejamento fatorial, estão envolvidos k fatores (ou variáveis) e cada um deles está presente em diferentes níveis. Na realização de um experimento com k fatores, são 2^k observações da variável resposta (BARROS-NETO *et al.*, 2007).

Através dessa técnica de planejamento experimental é possível avaliar a influência das variáveis independentes nas variáveis de resposta, bem como as interações entre elas. Neste caso, deve-se selecionar um número fixo de níveis para cada um dos fatores e fazer os experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis. A partir da análise da variância, pode-se obter um modelo probabilístico adequado que correlacione às respostas em função das variáveis independentes, o que permite determinar os valores destas, otimizando o desempenho do bioprocessamento de uma maneira geral (BARROS-NETO *et al.*, 2007).

Atualmente, os planejamentos fatoriais têm sido bastante utilizados, tanto em processos químicos como bioquímicos, com grande sucesso. Nos processos bioquímicos são aplicados nos melhoramentos dos meios de cultura e na otimização de processos. O bioprocessamento de CB, assim como qualquer processo microbiológico, é muito complexo devido ao grande número de variáveis envolvidas.

Portanto, um meio de cultura balanceado, juntamente com valores ótimos de pH, temperatura, concentração de substrato, concentração de microrganismos e oxigênio no meio, são necessários para alcançar uma boa produtividade.

2.6 Utilização de resíduos industriais para a produção de celulose bacteriana

Diversos fatores influenciam na escolha do meio necessário para desenvolvimento do processo das fermentações microbianas, pois como o meio contém os nutrientes necessários para o crescimento, este pode representar cerca de 30% do custo total do processo (RIVAS *et al*, 2004). Sendo assim, um dos aspectos mais relevantes no processo fermentativo é o desenvolvimento de um meio de cultura de baixo custo, diminuindo, o custo final do produto.

A grande parte dos estudos realizados nesta área é feita com meios de cultura contendo açúcares puros como fonte de carbono ou adicionados de fontes de nitrogênio e vitaminas, como extrato de levedura e peptona. Mas, em termos econômicos, esses nutrientes tornam o meio economicamente inviável, pois são substratos muito caros.

Sabe-se que é possível desenvolver processos para a produção de CB em meios alternativos, em que o foco principal é a utilização de produtos ou resíduos da agroindústria, os quais podem conter algum tipo de açúcar, que servirá como fonte de carbono para o processo fermentativo (JUNG *et al*, 2010). No caso da CB, a produção poderá se mostrar igual ou até mesmo superior quando comparada a produção convencional com meios sintéticos.

A recuperação de resíduos como fontes de nutrientes, contribui não só para a valorização dos mesmos, como também no que se trata do problema ambiental, pois como alguns necessitam de tratamento antes do seu envio para os sistemas de esgotos, eleva-se o custo do processo para as empresas que os produzem (HUANG *et al.*, 2014).

Segundo Kongruang (2008), é possível produzir CB 50 g/L (peso úmido), a partir de sumos de coco e de ananás, ambos suplementados com extrato de levedura e etanol, em cultura estática, após 14 dias de cultivo. Com o mesmo período de cultivo, Son *et al.* (2002) produziram cerca de 0,5 g/L de CB a partir de sumos de maçã, ananás, pêra japonesa ou uva e 2,1 g/L a partir de sumo de laranja.

Hungund *et al.* (2013) utilizaram 20 g.L⁻¹ dos sucos de melão, melancia e laranja, e obteve 8,08 , 5,98 e 6,18 g.L⁻¹ de CB, respectivamente.

Jung e colaboradores (2010) verificaram a produção a partir do melaço da cana, com concentrações de 50 , 20 e 10 g.L⁻¹ e a maior produção foi de 2,21 g.L⁻¹ de CB, a partir do meio de 50 g.L⁻¹ .

Nos exemplos citados, a maioria dos resíduos utilizados foram suplementados com outras fontes de nutrientes, como o extrato de levedura e peptona, pois os autores consideraram a suplementação proteica indispensável para a produção de maiores rendimento. Embora contribuam para o aumento da produção de CB, podem resultar num aumento dos custos de produção.

Por esses motivos é necessário sempre fazer uma análise da relação custo/benefício para os resíduos escolhidos, pois muitos deles embora ricos em fonte de carbono são pobres nos restantes nutrientes necessários ao crescimento dos micro-organismos.

2.6.1 Glicerol como fonte de carbono

Quimicamente, o glicerol é um tri-álcool com 3 carbonos em sua estrutura, tendo como nome sistemático (IUPAC) 1,2,3-propanotriol. É um líquido incolor, com gosto adocicado, sem cheiro e muito viscoso, derivado de fontes naturais ou petroquímica. O nome glicerol deriva da palavra grega *glykys*, doce. A presença de três grupos hidroxila na estrutura do glicerol é responsável pela solubilidade em água e sua natureza higroscópica. É uma molécula altamente flexível, formando ligações de hidrogênio tanto intra como intermoleculares (ARAÚJO; LIMA, 2011).

O glicerol pode ser obtido de diferentes maneiras, como a partir do propeno, que por sua vez é proveniente de combustíveis fósseis; a partir do álcool alílico, por via fermentativa; através da hidrogenação/hidrogenólise de carboidratos e, principalmente, pela produção de biodiesel (WANG *et al.*, 2001).

O biodiesel pode ser produzido a partir de uma variedade de matérias-primas, as quais se incluem óleos vegetais (de soja, palma, amendoim, girassol, côco), gorduras animais, bem como óleos residuais, como óleo de fritar já usado. As matérias-primas são sujeitas a uma reação de transesterificação, em que os óleos vegetais e as gorduras animais reagem com um álcool, na presença de um catalisador (normalmente básico), originando os ésteres alquílicos, correspondentes aos diferentes ácidos graxos encontrados nas gorduras e nos óleos. Essa reação forma alguns subprodutos, como sabão, metanol, quantidade variada de água, resíduos de catalisadores, ácidos graxos livres, triglicerídeos que não reagiram no processo, sendo o principal deles o glicerol, aproximadamente 90% do resíduo total gerado (VALERIO *et al.*, 2015).

Tais compostos impedem a utilização deste resíduo em aplicações tradicionais do glicerol, como na indústria alimentar ou farmacêutica, a não ser que sejam feitos processos de purificação, os quais possuem elevado custo para a empresa(FREITAS *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, a produção de biodiesel aumentou consideravelmente, juntamente com a quantidade de resíduos gerados durante a produção, o glicerol.

Este resíduo tem custos de eliminação associados, sendo por isso, necessário encontrar novas rotas de valorização, como a utilização deste resíduo como substrato para a produção de polímeros microbianos (FREITAS *et al.*, 2010).

2.6.1.1 Estudos utilizando o glicerol para produção de celulose bacteriana

Vários trabalhos científicos, que serão discutidos nos próximos parágrafos, já demonstraram interesse na utilização alternativa do glicerol na produção de celulose bacteriana.

Jung e colaboradores (2010) estudaram a influência do glicerol na produção e nas propriedades físico-estruturais da celulose bacteriana e compararam com resultados já obtidos, utilizando a glicose como fonte de carbono. O estudo mostrou que a melhor produção ocorreu com 3% (w/v) de glicerol no meio Hestrin-Schram, com uma produção de $4,98 \text{ g.L}^{-1}$, em meio agitado durante 7 dias. O pH do meio manteve-se em torno de 5,5, a morfologia microscópica mostrou-se semelhante à obtida com a glicose, com fibras nanométricas, variando em torno de 65-80 nm, a cristalinidade obtida foi em torno de 85% e as características conformacionais, verificadas na espectroscopia de infravermelho, mostrou que as bandas em torno de 2.900 cm^{-1} , 3.400 cm^{-1} e 1.740 cm^{-1} correspondiam às encontradas na CB. Além disso, verificou-se que o crescimento celular foi máximo em torno de 3 g.L^{-1} em torno do 7º dia de cultivo.

Carreira *et al.* (2011) também estudaram a utilização do glicerol, mas compararam com a utilização de outros resíduos, como resíduos das indústria de vinho, polpa de frutas e de queijo. Verificaram que a melhor produção da biomembrana ocorreu utilizando 20 g.L^{-1} do glicerol cru com 20 g.L^{-1} do glicerol purificado no meio, e a produção foi de $2,07 \text{ g.L}^{-1}$ após 96h de incubação. Além disso, mostrou que a adição de nutrientes, como extrato de peptona e levedura ao meio levaram a uma melhoria de 200% na produção.

Mikkelsen *et al.*(2009) compararam a produção e caracterizou a celulose bacteriana produzida a partir do meio Hestrin-Schram modificado, com a adição de 20 g.L^{-1} de diferentes fontes de carbono, como: manitol, glicose, glicerol, frutose, sacarose e galactose. O estudo mostrou que a melhor produção ocorreu no meio de glicerol, obtendo-se $3,96 \text{ g.L}^{-1}$ após 96 h de incubação em cultivo estático. Também avaliou que o maior valor encontrado de consumo de

substrato foi de 57 %, observado no meio contendo glicerol, e mostrou que apesar das diferentes fontes de carbono utilizadas, as características químicas e microscópicas avaliadas nas películas obtidas de todos os meios mantiveram-se bem semelhantes entre si, caracterizando a CB.

Zhong *et al.*(2013) estudaram o fluxo metabólico da *Gluconacetobacter xylinus* para a produção de CB a partir de diferentes fontes de carbono, como glicose, glicerol e frutose. Demonstraram que a maior produção foi de 6,05 g.L⁻¹, obtida a partir do meio contendo 25 g.L⁻¹ de glicerol, adicionado de 0,02 % de CaCl₂, com pH ajustado para 6. Durante o processo fermentativo, o pH manteve-se praticamente constante, entre 6 e 7, avaliou-se que 47,96 % do glicerol transformou-se em CB, em contrapartida apenas 19,05% de glicose e 24,78% de frutose foram convertidas. As características químicas da biomembrana foram semelhantes às obtidas nos estudos citados e a avaliação das propriedades mecânicas mostrou que a tensão mecânica foi maior no meio do glicerol e apresentou-se em torno de 83,5 MPa, adicionalmente, as fibras do meio de glicerol mostraram-se mais finas e a membrana com uma maior porosidade.

2.7 Aplicabilidade da celulose bacteriana

O uso da celulose bacteriana tem ganhado espaço em diversos ramos industriais. O primeiro uso industrial de CB foi na indústria alimentícia, como nata de coco em 1949 (CHAWLA *et al.*, 2009). A nata de coco é uma iguaria muito apreciada nas Filipinas e em outros países, sendo produzida naturalmente a partir da fermentação da água ou leite de cocoe da carragenina (uma espécie de extrato de algas marinhas encontradas nas costas do Atlântico da Europa e América do Norte), sendo rica em fibra e com baixo teor de gordura. É mais comumente adoçada e consumida como uma sobremesa, mas pode acompanhar picles, bebidas, sorvetes e salada de frutas (LEE *et al.*, 2014). 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 tais como diabetes, obesidades, doenças cardiovasculares e diverticulites (CHO; ALMEIDA, 2012; SHI *et al.*, 2013).

A associação de nanofibras de CB à polímeros condutores implica em um aumento da sua aplicabilidade, tanto na área científica como na industrial. Pode-se citar alguns exemplos como: baterias recarregáveis, dispositivos eletrônicos, sensores químicos, térmicos e mecânicos, colas e tintas condutoras (UI-SLAM *et al.*, 2015).

Na indústria de cosméticos, a CB é utilizada como constituinte de hidratantes e adstringentes. Em empresas de aparelhos eletroacústicos é utilizada como película para aparelhos de áudio de alta qualidade (REINIATI, 2016).

Além dessas áreas, pode-se afirmar que nos últimos anos, o maior desenvolvimento da utilização da celulose bacteriana é na área biomédica, com exemplos representativos na engenharia de tecidos, em que a CB é utilizada como enxertos vasculares, cartilagem, barreira antimicrobiana, pele artificial, regeneração neural e curativos (PICHETH *et al.*, 2017; MULLER, 2012; HUANG *et al.*, 2014).

Destaca-se também sua aplicação como pele artificial no tratamento de queimaduras e feridas de difícil cicatrização, substituindo pele, cartilagem, ossos, vasos sanguíneos, entre outros tecidos. 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 à pele humana, além disso, recentemente foi demonstrada a compatibilidade da CB com a pele para aplicações dérmicas, o que estende ainda mais o leque de aplicações desse biopolímero (HUANG *et al.*, 2014; ALMEIDA, 2014).

No Brasil, empresas de produtos biotecnológicos como a Bionext e a Membracel, com sedes em São Paulo e no Paraná, respectivamente, já produzem tecido biológico, com a utilização de celulose bacteriana, para uso médico, como substituto temporário da pele em queimaduras, feridas traumáticas, úlceras crônicas. As vantagens do produto estão associadas principalmente à biocompatibilidade e fácil adesão à ferida, graças à estrutura microfibrilar, transparência e permeabilidade seletiva, bem compatível com a pele humana (EMBRAPA, 2014). Entretanto, o custo na produção desse polímero ainda precisa ser otimizado, surgindo desta forma estudos que tentem cada vez mais buscar resolver essa questão, principalmente com inovações de meios alternativos como fonte de carbono.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo será apresentado o desenvolvimento experimental utilizado no estudo da produção do biopolímero CB. As atividades experimentais envolvendo várias etapas, incluindo o cultivo do micro-organismo, a inoculação, a produção de celulose bacteriana em dois tipos diferentes de meios de cultivo, a purificação, secagem, posterior caracterização e cálculos pertinentes aos processos cinéticos.

3.1 Micro-organismo

Os microrganismos produtores de BC foram isolados de uma fonte comercial, o chá de Kombucha. O isolamento foi feito a partir de um mililitro de chá que foi diluído (diluição em série) em solução fisiológica e propagados em placas de Petri com meio Hestrin-Schram (20 g / L de glicose, 5 g / L de peptona, 5 g/L de extrato de levedura, 2,7 g / L de Na_2HPO_4 , 1,15 g / L de ácido cítrico, 12 g / L de ágar e pH 5) por 5 dias a 30° C. Após esse período, cada colônia cultivada foi isolada em uma placa de Petri contendo meio HS solidificado e testado para produção de BC em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio líquido HS. A manutenção das culturas produtoras foi feita em tubos de ensaio contendo meio com HS solidificado. A cepa bacteriana produtora foi identificada, no Departamento de Antibióticos da UFPE, como *Gluconacetobacter hansenii*.

A espécie foi mantida ativa em refrigerador utilizando o meio de cultura Hestrin-Schram modificado com a composição descrita na Tabela 1, e repicada a cada 30 dias.

Tabela 1: Composição do meio para manutenção da cultura.

Componente	Concentração (g.L⁻¹)
Peptona	5
Extrato de levedura	5
Glicerol	20
Ágar	12
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,7
Ácido cítrico	1,13

3.2 Estudo comparativo da produção de celulose bacteriana a partir de diferentes meios

3.2.1 Preparo dos meios de cultura

Para comparar a produção de CB, foram preparados 2 meios de cultura com diferentes composições. Para manutenção periódica da cultura microbiana bem como para preparo da suspensão celular e produção do biopolímero, utilizou-se o meio, conhecido na literatura por Hestrin-Schram (HS) (Hestrin-Schram, 1984), que neste caso foi modificado, trocando-se a glicose pelo glicerol P.A. , como fonte de carbono.

O outro meio, chamado neste trabalho de meio salino, utilizado paralelamente para suspensão celular e produção da CB, foi um meio composto apenas por sais, em que a única fonte de carbono utilizada foi o glicerol P.A. Os meios utilizados têm suas composições descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Composição dos meios de cultura.

Meio Hestrin Modificado		Meio Salino	
Componente	Concentração (g.L ⁻¹)	Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Peptona	5	KH ₂ PO ₄	1
Extrato de levedura	5	(NH ₄)H ₂ PO ₄	3
Ácido Cítrico	1,15	FeSO ₄	0,2
Na ₂ HPO ₄	2,7	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Glicerol	20	Glicerol	20

3.2.1.1 Crescimento celular: preparo do inóculo

A cultura bacteriana foi inicialmente repicada no meio descrito na Tabela 1 e cultivada por 72 horas a 30°C em tubo de ensaio com meio inclinado. Após este período, com auxílio de uma alça, flambada em chama, as células foram suspensas e transferidas assepticamente para 2 frascos de Erlenmeyer de capacidade de 250ml, contendo 150 mL de cada meio de fermentação, previamente autoclavados, a 121 °C, 1 atm por 15 minutos, e mantidos a 30± 2°C em condições estáticas por 72h.

3.2.2 Ensaio preliminar para a produção de CB no meio de sais

Para o estudo de meio salino, cuja composição básica está descrita na Tabela 2, foi necessário fazer um ensaio preliminar utilizando um planejamento fatorial com três variáveis independentes a dois níveis (2^3), a fim de verificar as melhores condições para uma maior produção.

As variáveis independentes foram escolhidas pelas seguintes razões: a variação do substrato no meio pode interferir diretamente no metabolismo microbiano, aumentando ou inibindo a produção do biopolímero; o pH influencia na estabilidade do meio e pode atuar sobre o crescimento do micro-organismo e a concentração de CaCl_2 pode ser um fator de importância na formação das fibras de CB, uma vez que estudos mostram que o Ca presente no meio atua como um agente que facilita a agregação das fibras. Além disso, uma das aplicações que vem sendo estudada é a utilização da CB na regeneração óssea (SILVA, 2012; ZIMMERMAN *et al.*, 2011).

Nesse caso, utilizou-se 3 variáveis independentes (fatores): concentração de glicerol (g.L^{-1}), o pH e a concentração de CaCl_2 (g.L^{-1}), e como variável dependente (resposta) a produção de celulose bacteriana (g.L^{-1}). Na Tabela 3 estão apresentados os ensaios com seus níveis codificados e fatores que podem influenciar. Foram feitos 11 experimentos, em duplicata, e três foram repetidos no ponto central. Na Tabela 4 são mostrados os níveis decodificados.

O inóculo de cada ensaio foi feito com 1% (v/v), descrito no item 3.2.1.1, em 150 mL de meio salino. Os meios inoculados foram mantidos em reatores horizontais estáticos, previamente esterilizados por 15 minutos a 121°C , e incubadas por 10 dias, em condições estáticas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

Todos os ensaios foram realizados conforme mostram as Tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Níveis codificados das variáveis para os ensaios.

Ensaio	Glicerol(g.L⁻¹)	pH	CaCl₂(g.L⁻¹)
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Tabela 4: Níveis decodificados das variáveis do processo.

Níveis decodificados	Glicerol(g.L⁻¹)	pH	CaCl₂(g.L⁻¹)
-1	20	4	0
1	40	6	3
0	30	5	1,5

A análise do planejamento fatorial foi realizada através do Software STATISTICA[®] versão 8.0. E as análises de importância estatística das variáveis de entrada e das suas interações na variável de resposta foram feitas mediante a avaliação de gráficos e tabelas.

3.2.3 Produção de CB no meio de Hestrin-Schram modificado

Como o meio de Hestrin-Schram (HS) já foi estudado e especificado na literatura com diferentes fontes de carbono, inclusive com o glicerol, não foi realizado um planejamento fatorial para determinar as melhores condições de cultivo.

A composição do meio para a produção está descrita na Tabela 2, ajustando-se o pH e utilizando-se a mesma concentração inicial de glicerol obtida no planejamento fatorial a fim de ser feita uma comparação da produção com ambos os meios.

O inóculo de cada ensaio também foi feito com 1% (v/v) do pré-inóculo em 150 mL de Meio Hestrin-Schram modificado e foram mantidos em nos reatores por 10 dias, em condições estáticas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.2.4 Condições de tratamento das membranas

As membranas obtidas em cada meio foram purificadas nos próprios reatores utilizados para seu cultivo, retirando-se o meio remanescente e adicionando-se 50 mL de hidróxido de sódio (NaOH) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ por 1h a 80°C . Em seguida, foram lavadas com água destilada e colocadas em estufa com circulação de ar por 24h a 40°C para o processo de secagem. Posteriormente, as amostras foram caracterizadas.

3.3 Caracterização da Celulose Bacteriana

As membranas de CB utilizadas para caracterização foram produzidas, lavadas, purificadas e secas conforme descrito anteriormente. Os métodos utilizados na sua caracterização estão descritos nos próximos itens.

3.3.1 Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) tem sido muito empregada na investigação de filmes poliméricos. É uma técnica mais avançada que o infravermelho dispersivo, pois apresenta vantagens em relação ao aumento da razão sinal-ruído, do aproveitamento de energia, da capacidade de processamento e da rapidez de varredura, sendo, portanto muito sensível às pequenas mudanças estruturais da cadeia polimérica (SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010).

A análise de FTIR foi realizada, no Laboratório de Polímeros não convencionais, do Departamento de Física da UFPE, no espectrômetro IR Tracer-100 da Shimadzu, e o espectro foi obtido no comprimento de onda de 400 até 4.000 cm^{-1} , a fim de caracterizar a estrutura química da biomembrana, identificando os grupos funcionais presentes.

3.3.2 Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas dos materiais poliméricos são de grande importância e interesse científico e tecnológico, devido aos requisitos que os polímeros devem atender na maior parte de suas aplicações. Valores de propriedades mecânicas tais como resistência à tensão, módulo de

elasticidade, alongamento podem servir como base de comparação do desempenho mecânico das celuloses produzidas.

Os testes para determinar a força máxima (N), tensão de ruptura (MPa) e módulo de elasticidade (MPa) foram realizados pelo laboratório Materiais Poliméricos e Caracterização (LMPC), no Departamento de Engenharia Química da UFPE.

Realizou-se os testes em triplicata, em um dinamômetro digital, sendo a distância entre as garras 100 mm, os corpos de prova de 7,5 cm x 2,5 cm e com velocidade de 50 mm/min.

3.3.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

As películas secas e úmidas foram submetidas à análise termogravimétrica, a fim de verificar as temperaturas características da perda de água e decomposição da CB, utilizando um equipamento STA 5000 da Perkin Elmer, em que as amostras foram conduzidas entre 30 e 600°C, a 10°/min. As análises foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

3.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Esta análise foi realizada para observar as superfícies dos filmes poliméricos, possibilitando verificar a existência das nanofibras nas membranas. Para a realização da análise, seções das amostras foram colocadas sob "stubs", suportes utilizados nessa análise, e foi feita uma metalização com uma fina camada de ouro em aparelho de cobertura metálica. A análise foi realizada no microscópio eletrônico de varredura da marca TESCAN e modelo MIRA3, e foram visualizadas sob uma aceleração de voltagem 10 kV, em diferentes aumentos.

A metalização foi realizada na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental e a análise em si foi feita no Laboratório de Microscopia do Departamento de Física, ambos da Universidade Federal de Pernambuco.

3.3.5 Difractometria de Raios-X (DRX)

A análise de difratometria de raios-x foi realizada no ITEP (Instituto Tecnológico de Pernambuco). Os difratogramas foram obtidos em difratômetro Rigaku, com tubo de Cu em 40 kV e 20 mA na escala de 2θ . O intervalo angular (2θ) foi de 10-50° e a velocidade de varredura foi de 0,5°/min. O cálculo do índice de cristalinidade foi feito dividindo-se a área dos picos cristalinos pela área total do difratograma.

A equação 1 foi utilizada para calcular o índice de cristalinidade (Rosli *et al.*, 2013):

$$IC\% = \frac{I_c - I_a}{I_c} \cdot 100 \quad (1)$$

Em que, IC representa a fração cristalina em porcentagem, I_c representa a área total dos picos cristalinos e I_a representa a área total do halo amorfo.

3.3.6 Capacidade de absorção de água

Para determinar a capacidade de absorção de água, a membrana seca foi imersa em água destilada em temperatura ambiente, $27 \pm 2^\circ\text{C}$, até o equilíbrio (48 horas). Em seguida, a biomembrana foi retirada da água, retirado o excesso e fez-se a pesagem em balança analítica até peso constante. A água absorvida foi calculada através da equação 2:

$$C_{\text{absorção}}(\%) = \frac{M_h - M_s}{M_s} \cdot 100 \quad (2)$$

Em que M_h é a massa hidratada da biomembrana (g) e M_s a massa seca (g).

3.4 Estudo cinético da produção de CB

O estudo cinético foi realizado com os dois meios descritos no item 3.2.1 e a produção foi realizada segundo a metodologia já citada nos tópicos 3.2.2, em sua melhor condição, e no 3.2.3. O processo foi acompanhado pela quantificação do substrato consumido, do crescimento das células planctônicas e do produto formado durante 30 dias.

Foram realizados experimentos com 50 ml de cada meio de cultivo. Estes foram previamente esterilizado em autoclave, por 15 minutos a 121°C , e adicionados de 1% de inóculo. Após inoculação, os frascos de Erlenmeyer foram mantidos em condições estáticas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

As membranas foram coletadas nos tempos de incubação 5, 10, 15, 20 e 30 dias, depois foram filtradas e lavadas com água destilada para remover o caldo de cultivo remanescente; logo após, foram armazenadas na geladeira até que todas as amostras tivessem sido coletadas.

O meio de cultura remanescente em cada ensaio foi coletado e armazenado na geladeira para posterior quantificação em HPLC e no espectrofotômetro.

Após os 30 dias, todas as amostras foram tratadas como descrito no tópico 3.2.4.

As membranas foram pesadas em balança analítica e utilizada a massa para o cálculo da produção de celulose (g.L^{-1} de meio de cultivo), produtividade, rendimento e fatores de conversão.

O glicerol residual da fermentação foi quantificado na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE, por um equipamento de cromatografia líquida da Shimadzu, usando uma coluna C8, e um detector PLANO. O eluente, uma solução de acetonitrilo/água deionizada 75:25, foi bombeado com uma vazão de $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$ e a temperatura de 45°C . O volume injetado foi de $20 \mu\text{L}$ e todas as amostras foram centrifugadas e filtradas com membrana de $0,20 \mu\text{L}$. Para a quantificação do glicerol, foi efetuada uma curva analítica utilizando padrões com concentrações entre $0,5$ e 5 g.L^{-1} .

O crescimento celular planctônico foi avaliado na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE, através da medida da absorbância em 600 nm no Espectrômetro UV-VIS da Perkin Elmer, Lambda 650. As amostras foram homogeneizadas e filtradas, para então serem analisadas. A curva analítica utilizada nesta etapa apresenta-se no Apêndice A.

3.4.1 Cálculos dos parâmetros cinéticos

3.4.1.1 Velocidade Específica de Crescimento das células planctônicas

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) da bactéria no meio foi calculada na fase exponencial da curva do crescimento celular a partir da equação 3 (SCHMIDELL, 2001).

$$\mu = \frac{\ln(X_f/X_i)}{(t_f - t_i)} \quad (3)$$

Onde: μ = velocidade específica de crescimento

X_f = Concentração final de bactérias em g/L

X_i = Concentração inicial de bactérias em g/L

t_f = tempo final do crescimento acentuado da bactéria

t_i = tempo inicial do processo

3.4.1.2 Coeficientes de Conversão

O coeficiente de conversão $Y_{X/S}$, que expressa a massa de células formada por substrato consumido e o coeficiente de conversão de substrato consumido em produto formado $Y_{P/S}$ foram calculados pelas expressões definidas nas equações (4) e (5):

$$Y_{X/S} = \frac{(X_f - X_i)}{(S_i - S_f)} \quad (4)$$

$$Y_{P/S} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f)} \quad (5)$$

Onde: X_f = Concentração final de bactérias em g/L

X_i = Concentração inicial de bactérias em g/L

P_f = Concentração final do produto (CB) em g/L

P_i = Concentração inicial do produto (CB) em g/L

S_i = Concentração inicial do substrato (glicerol) em g/L

S_f = Concentração final do substrato (glicerol) em g/L

3.4.1.3 Produtividade

A produtividade em CB, PR_p , expresso como a concentração de celulose por volume ($g.L^{-1}.h^{-1}$) do meio e produtividade em células PR_x foram calculados pelas equações 6 e 7 definidas como:

$$PR_p = \frac{P_f}{t} \quad (6)$$

$$PR_x = \frac{X_f}{t} \quad (7)$$

Onde: PR = produtividade ($g.L^{-1}.h^{-1}$)

t = tempo do processo

X_f = Concentração final de bactérias em g/L

P_f = Concentração final do produto (CB) em g/L

3.4.1.4 Conversão de substrato (φ)

$$\varphi = \frac{\Delta S}{S_i} \cdot 100 \quad (8)$$

em que φ é a conversão do substrato, ΔS é a quantidade de substrato (glicerol) consumido e S_i a concentração de substrato inicial.

3.4.2 Modelagem matemática do processo

A análise matemática do bioprocessamento tem como objetivo descrever equações que possam representar o crescimento, o consumo do substrato limitante e a formação do produto pelo microrganismo durante o bioprocessamento. Para se realizar esta análise matemática no biorreator, algumas considerações foram feitas de modo a simplificar o equacionamento do processo.

Através dos dados obtidos da cinética, foi possível testar a modelagem do processo com um modelo bastante usual em estudos biológicos, que é o modelo de MONOD (1952). Esse modelo descreve uma relação entre a velocidade específica de crescimento e a concentração do substrato limitante.

O modelo de Monod é essencialmente matemático baseado na análise do crescimento exponencial de culturas puras de microrganismos e é constituído por uma equação empírica, em condições ambientais constantes, em que o substrato é o único nutriente limitante. O modelo de Monod é descrito através da seguinte equação:

$$\mu = \mu_{máx} \frac{C_s}{K_s + C_s} \quad (9)$$

Em que:

- μ é a taxa de crescimento celular;
- $\mu_{máx}$ é a velocidade específica máxima de crescimento;
- K_s é a constante de saturação pelo substrato;

- C_S é a concentração do substrato.

O parâmetro K_s tem o mesmo valor da concentração do substrato limitante quando a velocidade específica de crescimento alcança a metade do seu valor máximo e é possível encontrá-lo linearizando a equação de Monod, conforme Anexo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo comparativo da produção de CB a partir de diferentes meios

4.1.2 Ensaio preliminar com planejamento fatorial da produção de CB no meio de sais

Nesta etapa inicial do trabalho ainda não haviam sido definidas as condições propícias para a produção do biopolímero a partir do meio Salino e o planejamento fatorial foi utilizado para avaliar as variáveis: concentração de glicerol, pH e concentração de CaCl_2 , e avaliar quais desses parâmetros poderiam ser capazes de interferir no processo.

A Tabela 5 mostra os resultados do planejamento fatorial 2^3 .

Tabela 5: Resultados do planejamento fatorial 2^3 aplicado ao processo realizado em 10 dias, sem agitação e a 30°C .

ENSAIO	FATORES			MÉDIA DOS RESULTADOS
	Concentração de glicerol ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	pH	CaCl_2 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Produção de CB ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	20	4	0	0,32
2	40	4	0	0,74
3	20	6	0	0,99
4	40	6	0	1,01
5	20	4	3	0,76
6	40	4	3	1,85
7	20	6	3	1,89
8	40	6	3	2,30
9	30	5	1,5	1,13
10	30	5	1,5	1,47
11	30	5	1,5	1,32

De acordo com os dados verificados na tabela acima, é possível observar que o ensaio 8 apresentou a maior produção de celulose. O resultado foi de acordo com os estudos de Zhong *et al.* (2013), que utilizou CaCl_2 no meio e verificou que o melhor pH era 6. Os dados também foram de acordo com os resultados obtidos por Carreira *et al.* (2011) que utilizou $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glicerol e obteve $2,07 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de celulose bacteriana em 7 dias de cultivo.

A Figura 9 é apresentada o gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis avaliadas e suas interações no processo estudado.

No gráfico, o eixo das ordenadas contém as variáveis independentes e as interações entre elas. Já no eixo das abscissas, tem-se o valor absoluto do efeito estimado, calculado a partir da razão entre os efeitos estimados e seus respectivos desvios padrões.

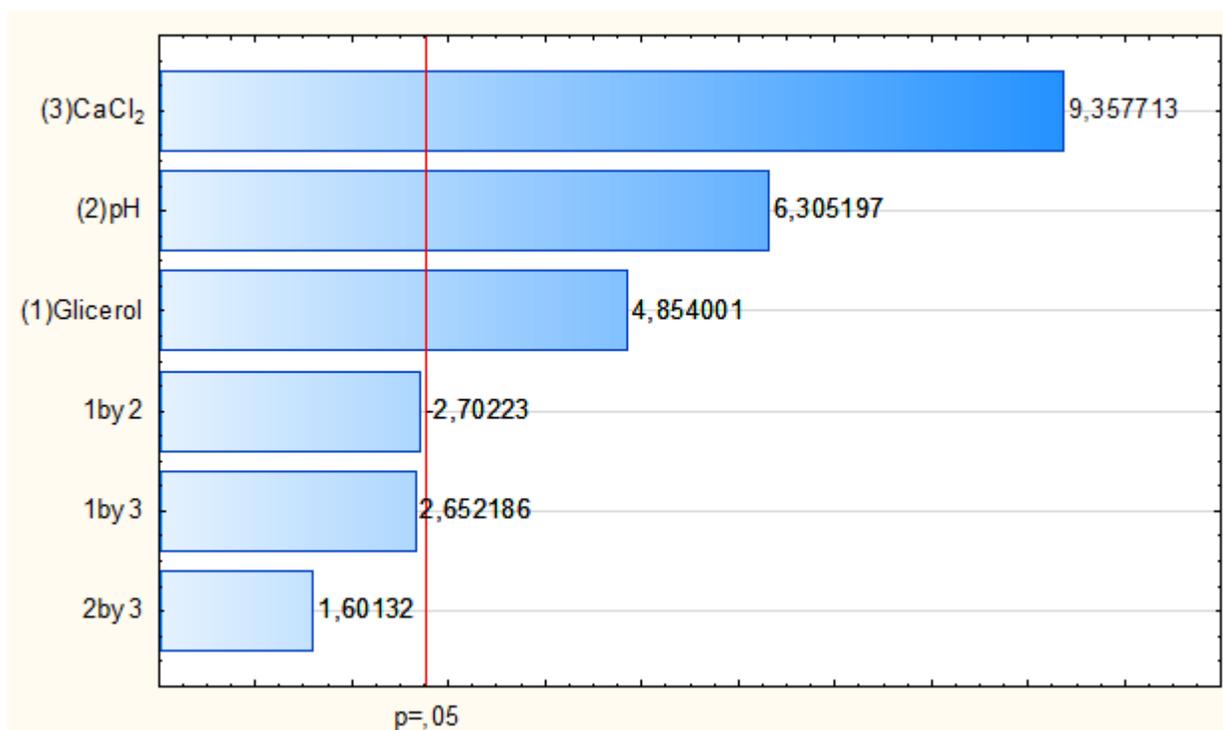


Figura 9: Gráfico de Pareto dos valores dos efeitos de todas as variáveis estudadas na produção de CB a partir do meio salino.

O gráfico mostra que as variáveis avaliadas para a produção de CB possuem significância estatística, porém as interações entre elas não se apresentaram estatisticamente significantes.

A partir dos dados obtidos com os experimentos é possível obter modelos empíricos capazes de prever a produção de CB, dentro do intervalo de estudo para as três variáveis estudadas.

No estudo em questão, os coeficientes da Equação 10 foram gerados através dos dados obtidos na tabela de coeficientes de regressão do programa.

$$Y = 1,253 + 0,242 * (\text{Glicerol}) + 0,315 * (\text{pH}) + 0,468 * (\text{CaCl}_2) \quad (10)$$

A adoção de P para que os coeficientes de regressão da equação acima fossem aceitos foi de $P \leq 0,05$.

Outro aspecto importante de ser avaliado no planejamento fatorial é a relação entre os valores previstos para o experimento e os valores observados, através da correlação linear. O gráfico de valores previstos versus valores observados é dado na Figura 10.

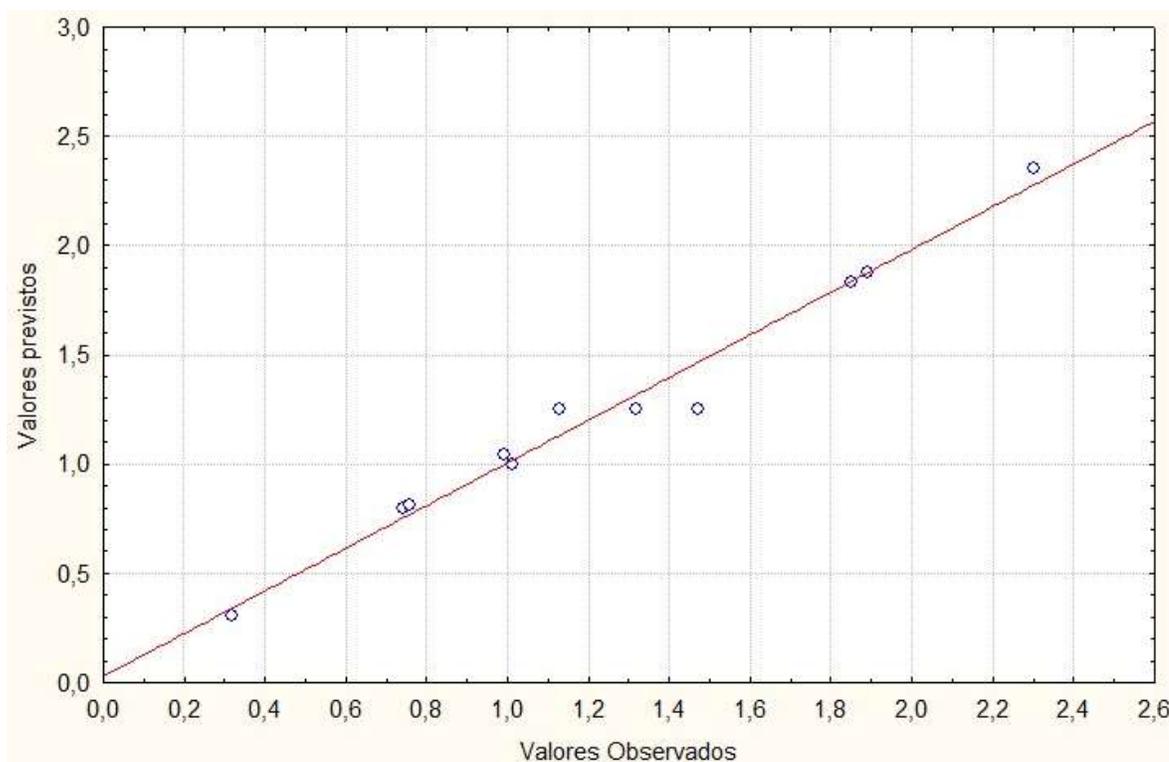


Figura 10: Gráfico de valores observados *versus* valores previstos.

Através do gráfico mostrado na figura acima, é possível observar um ajuste bem satisfatório, com $R^2 = 0,977$, em que os pontos localizam-se bastante próximos à reta, mais uma vez que os desvios-padrão foram bem menores que os parâmetros avaliados, caracterizando assim, um experimento bem executado.

A superfície de resposta, relacionando a concentração de CaCl_2 e o pH, parâmetros que mais interferiram na produção de CB, está representada na Figura 11:

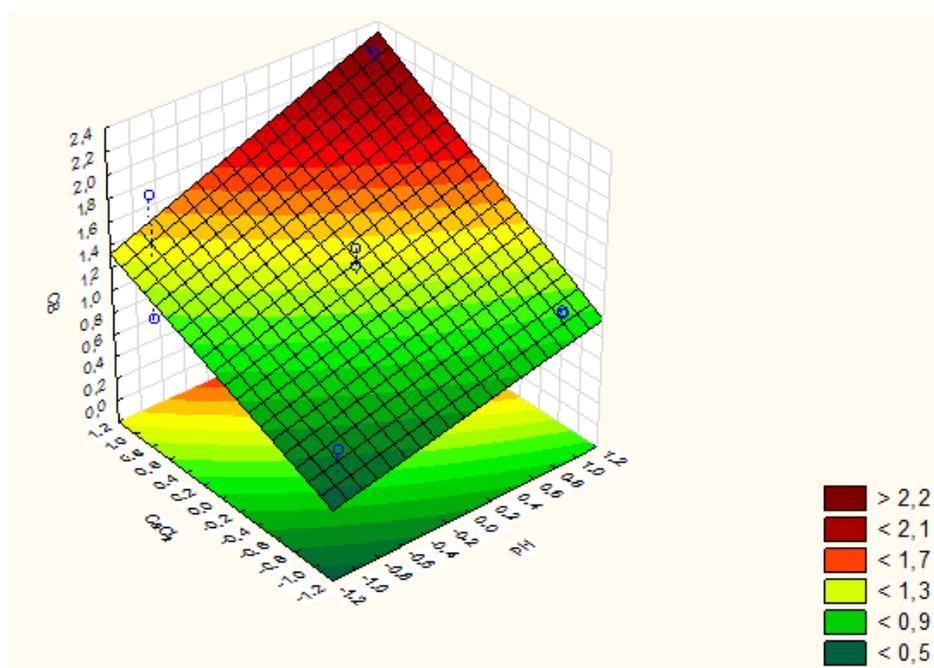


Figura 11: Superfície de resposta do planejamento fatorial.

Com os resultados obtidos no planejamento fatorial, é possível observar que os parâmetros pH, concentração de CaCl_2 e concentração de glicerol são importantes no processo de formação de CB, sendo os dois primeiros importantes para o processo de polimerização, enquanto a concentração de glicerol tende a aumentar a massa do biofilme.

4.1.3 Celulose bacteriana produzida a partir de meio salino

A partir da melhor condição determinada no estudo preliminar, em que a produção mais significativa ocorreu mediante os seguintes parâmetros: 40 g.L^{-1} de glicerol, pH 6 e 3 g.L^{-1} de CaCl_2 , foi feita uma batelada para a produção das membranas com o objetivo de caracterizá-las.

A produção ocorreu conforme descrito na metodologia, e após os 10 dias obteve-se as membranas gelatinosas, com aspecto plastificante, transparente e no formato do reator em sistema estático em que foi produzida, conforme mostra a Figura 12.



Figura 12: Membranas úmidas produzidas a partir do meio salino.

Com as membranas ainda no estado gelatinoso, foi feita a pesagem para verificar a perda de massa de água.

Posteriormente, foram tratadas e secas conforme descrito na metodologia.

Após feita a secagem, o biopolímero apresentou-se bem mais fino, com aspecto de um plástico e ligeiramente brilhoso, como mostra a Figura 13.



Figura 13: Membranas secas produzidas a partir do meio salino.

Foram produzidas 5 biomembranas para serem estudadas e caracterizadas. Os resultados em relação à massa hidratada, produção por dia, e perda de água para a membrana de celulose bacteriana estão apresentados na Tabela 6 a seguir:

Tabela 6: Resultados relacionados à biomembrana produzida a partir do meio salino.

Massa da biomembrana hidratada	6,56 ± 1,81 g
Massa da biomembrana seca	0,29 ± 0,01 g
Produtividade da CB	0,021 ± 0,002 g.dia ⁻¹
Produção	1,99 ± 0,04 g.L ⁻¹
Perda de água	95,57 ± 0,63%
Capacidade de absorção de água	2.162,07 ± 21,31 %

Os dados mostram que houve uma produção de CB bem abaixo do que foi encontrado nos trabalhos da literatura, que produzem em média 4 g.L⁻¹ de CB em 7 dias de cultivo no meio Hestrin-Schram. Esse fato pode ser devido ao meio utilizado ter apenas o glicerol como fonte de carbono, diferente do meio Hestrin-Schram que possui o ácido cítrico como uma segunda fonte, que foi utilizados nos trabalhos com maiores rendimentos.

A perda de água, que está diretamente interligada à umidade presente na biomembrana, apresentou um valor semelhante aos dados da literatura, em que mencionam que a CB pode apresentar perda de água variando de 95 a 99% (PECORARO *et al.*, 2008).

Outra característica, apresentada pela biomembrana, é a altíssima capacidade de absorção de água, a qual torna a CB ideal para aplicações como curativos e substitutos temporários de pele no tratamento de queimaduras (CZAJA *et al.*, 2006).

4.1.4 Celulose bacteriana produzida a partir de meio Hestrin-Schram modificado

As biomembranas produzidas a partir do meio Hestrin-Schram modificado foram desenvolvidas mediante a composição do meio descrito na Tabela 2 e com a concentração de 40 g.L⁻¹ de glicerol. Também foi feita uma batelada para a produção das membranas com o objetivo de caracterizá-las.

A produção ocorreu conforme descrito na metodologia, e após os 10 dias obteve-se as membranas gelatinosas, com maior espessura que as produzidas em meio salino, com aspecto plastificante, com coloração amarelada proveniente do meio que é amarelado, e no formato do reator em sistema estático em que foi produzida, conforme mostra a Figura 14.



Figura 14: Membrana úmida produzida a partir do meio Hestrin-Schram modificado.

Com as membranas ainda no estado gelatinoso, foi feita a pesagem para verificar a perda de massa de água. Posteriormente, foram tratadas e secas conforme descrito na metodologia.

Após feita a secagem, o biopolímero apresentou-se bem mais fino, porém com a espessura ainda maior que a produzida a partir do meio salino, com aspecto de um papel e ao mesmo tempo maleável e ligeiramente brilhoso, como mostra a Figura 15.



Figura 15: Membranas secas produzidas a partir do meio Hestrin-Schram modificado.

Do mesmo modo que ocorreu com as membranas do meio salino, foram produzidas 5 biomembranas para serem pesadas, caracterizadas e calcular o teor de perda e absorção de água, sua produtividade e produção, os resultados obtidos estão na Tabela 7:

Tabela 7: Resultados relacionados à biomembrana produzida a partir do meio Hestrin-Schram modificado.

Massa da biomembrana hidratada	28,62 ± 5,03 g
Massa da biomembrana seca	0,59 ± 0,08 g
Produtividade da CB	0,059 ± 0,012 g.dia ⁻¹
Produção	3,98 g.L ⁻¹
Perda de água	97,94 ± 0,45%
Capacidade de absorção de água	4.750,84 ± 52,32 %

Comparando-se os dados da Tabela 7 com os da Tabela 6, é possível observar que a produção de membrana no meio Hestrin-Schram modificado é maior, e está de acordo com os dados obtidos por Mikkelsen *et al.* (2008). Esse fato reside na produção usando o meio Hestrin-Schram conter outros componentes, como o ácido cítrico que podem servir também como nutriente para a bactéria produzir a CB.

A perda de água também foi alta, em torno de 98%, além disso, é possível observar a alta capacidade de absorção e retenção de água (mais de 50x da sua massa seca).

Os valores obtidos para a perda de água e capacidade de absorção também estão de acordo com os dados obtidos na literatura (PECORARO *et al.*, 2008).

Essa alta absorção de água também pode ser uma alternativa para a utilização da CB na indústria alimentícia, melhorando a qualidade de alimentos através da estabilidade térmica, reduzindo a viscosidade de pastas, reforçando hidrogéis e substituindo gorduras (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

4.2 Caracterização das membranas

4.2.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram feitos para determinar os picos característicos das bandas de celulose e verificar a ocorrência de novos picos provenientes de alguma interação entre os componentes do meio e a celulose. Os espectros das biomembranas são mostrados na Figura 16, e mostram semelhanças entre as celuloses produzidas nos dois meios diferentes.

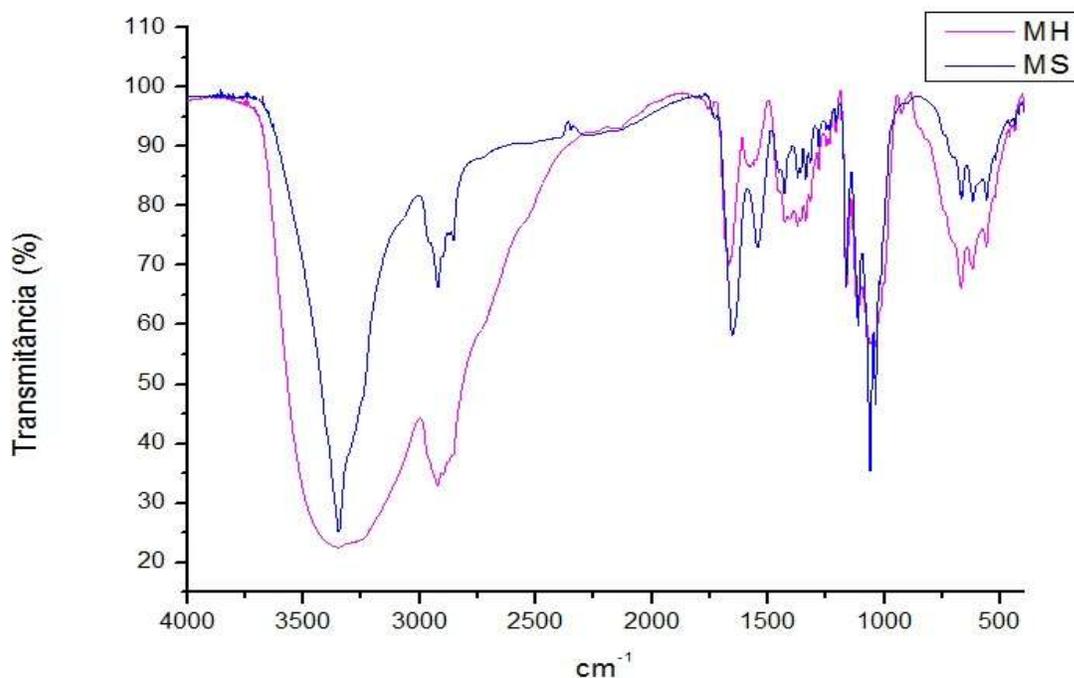


Figura 16: Espectro de FTIR das biomembranas obtidas em meios de cultivo diferentes. MH (Hestrin-Schram modificado) e MS (Meio Salino).

É possível observar, na Figura 16, que há semelhança entre os picos encontrados nas membranas produzidas nos diferentes meios, e cada frequência de onda há uma atribuição correspondente a celulose bacteriana.

As principais bandas características da celulose bacteriana dispostos na literatura com seus respectivos grupos funcionais, são comparados com os picos encontrados nos espectros das celuloses produzidas a partir dos meios estudados. A Tabela 8 mostra as frequências encontradas.

Tabela 8: Frequências típicas de absorção no Infravermelho para a celulose bacteriana.

Número de onda (cm ⁻¹)	Característica da CB e grupo funcional responsável	Número de onda encontrada na Celulose produzida	
		Meio Salino	Meio Hestrin
3400-3200	Banda forte e larga, resultante de associações poliméricas do estiramento do grupo Hidroxila (OH)	3345	3347
2960-2850	Estiramento de CH de alcanos e estiramento assimétrico CH ₂	2920	2921
1680-1620	Deformação de CH ₂ -OH	1638	1668
1430-1330	Deformação C-OH e CH	1425	1373
1200-1000	Estiramento C-O (-C-O-H)	1058	1033
1160-1146	Estiramento (C-O-C) ; deformação CH	1114	1164
700-400	Deformação fora do plano -OH	614	667

Fonte: PECORARO *et al.* adaptado, 2008.

A análise de FTIR (Figura 16) permitiu confirmar os grupos funcionais presentes na celulose bacteriana, além disso, foi possível observar que não houve interações dos componentes do meio com a celulose, pois não há picos referentes à bandas de absorção de grupos diferentes dos encontrados na CB, mostrando assim, a eficácia do processo de purificação.

4.2.2 Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas mais importantes decorrem de relaxações moleculares, são úteis para a identificação de filmes flexíveis e podem ser medidas através de testes de tração.

A Tabela 9 apresenta os dados dos testes de tração e alongamento, nas membranas secas e úmidas de cada meio, os quais se obteve como resultados: a tensão de ruptura (MPa), deformação na ruptura(%) e o módulo de elasticidade (MPa).

Tabela 9: Dados do ensaio mecânico, com a média e desvio padrão, realizado nas biomembranas obtidas dos diferentes meios.

	Meio Hestrin-Scram modificado		Meio Salino	
	Hidratada	Seca	Hidratada	Seca
Tensão de Ruptura (MPa)	0,793 ± 0,533	45,635 ± 3,486	0,249 ± 0,070	3,325 ± 0,494
Deformação na Ruptura (%)	2,265 ± 1,096	5,305 ± 1,571	1,181 ± 0,336	1,897 ± 0,202
Módulo de Elasticidade (MPa)	14,753 ± 3,531	406,400 ± 66,185	97,920 ± 22,712	222,821 ± 17,049

Segundo MULLER *et al.*(2013), PHISALAPHONG(2010) e ZHONG *et al.*(2013) a faixa de valores apresentados para o módulo de elasticidade para as amostras secas de CB são de 0,1–16 GPa, a tensão de ruptura (3–85 MPa) e a deformação na ruptura (1 – 5%), sendo assim, os dados apresentados para ambas as amostras de CB secas estão de acordo com os valores encontrados na literatura.

Já as amostras no estado hidratado, apresentam menor módulo de elasticidade, comprovando que as amostras no estado hidratado são mais elásticas que as estudadas no estado seco. As amostras no estado hidratado exibiram uma redução dos valores da tensão na ruptura, o que já era esperado, pois a hidratação provoca uma redução da organização da estrutura e um aumento das interações de hidrogênio entre a água e as fibras(GEORGE *et al.*, 2005).

Comparativamente, as amostras do meio Hestrin-Schram modificado, apresentaram maiores diferenças entre o estado hidratado e o seco, do que as amostras do meio salino. Isso se deve pelo

fato das amostras do meio salino terem apresentado menor diferença na espessura entre os estados secos e hidratados, e uma maior fragilidade na membrana comparada ao meio Hestrin.

4.2.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

Foram realizadas análises termogravimétricas das membranas secas e úmidas. As curvas da variação do percentual de massa pela temperatura são mostradas nas Figuras 17 e 18.

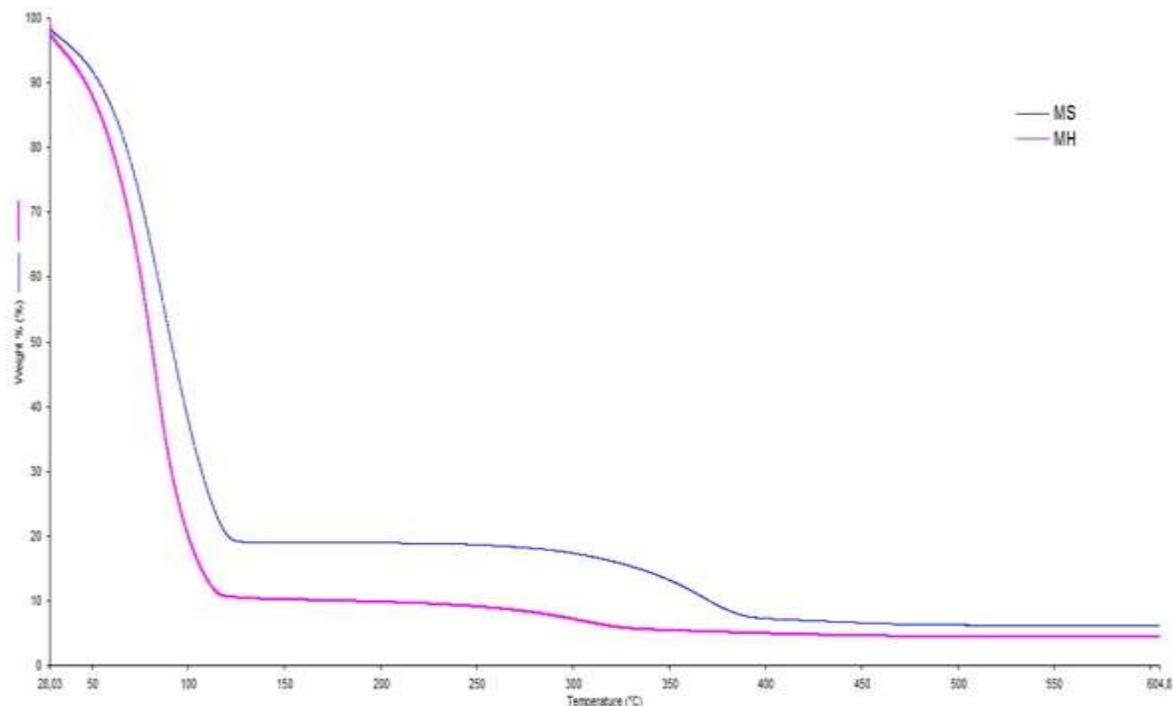


Figura 17: Termograma de TGA das biomembranas úmidas obtidas dos diferentes meios.

A Figura 17 mostra que as duas membranas apresentaram perfil de degradação semelhantes. Analisando-se as curvas, pode-se perceber que houve uma perda de massa significativa, já que as membranas estavam no estado hidratado, em 100°C que é característica da perda de umidade. Essa perda de umidade foi mais expressiva na celulose produzida a partir do meio Hestrin-Shram(MH), ficando em torno de 90%, indicando um maior teor de água absorvido; da mesma forma, houve diminuição de 80% no meio salino (MS).

Em maiores temperaturas, em torno de 280°C a 350°C, há outra perda de massa, característica da decomposição térmica da celulose, que apresenta os processos de : despolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas, seguida da formação de resíduos de carbono. Este é o principal evento característico da CB na análise de

TGA (BARDU *et al.*, 2008; SASKA *et al.*, 2011; NUNES *et al.*, 2012). Nesse caso, a perda de massa foi de aproximadamente 5% em ambos os meios.

Em torno de 350°C a 400°C, ocorre outra fase, um pouco mais discreta correspondente a degradação termo-oxidativa da celulose que normalmente estende-se até 500°C (PECORARO *et al.*, 2008).

Além da análise das amostras hidratadas, também foi feita a análise das amostras secas, a fim de observar as eventuais diferenças e temperaturas características.

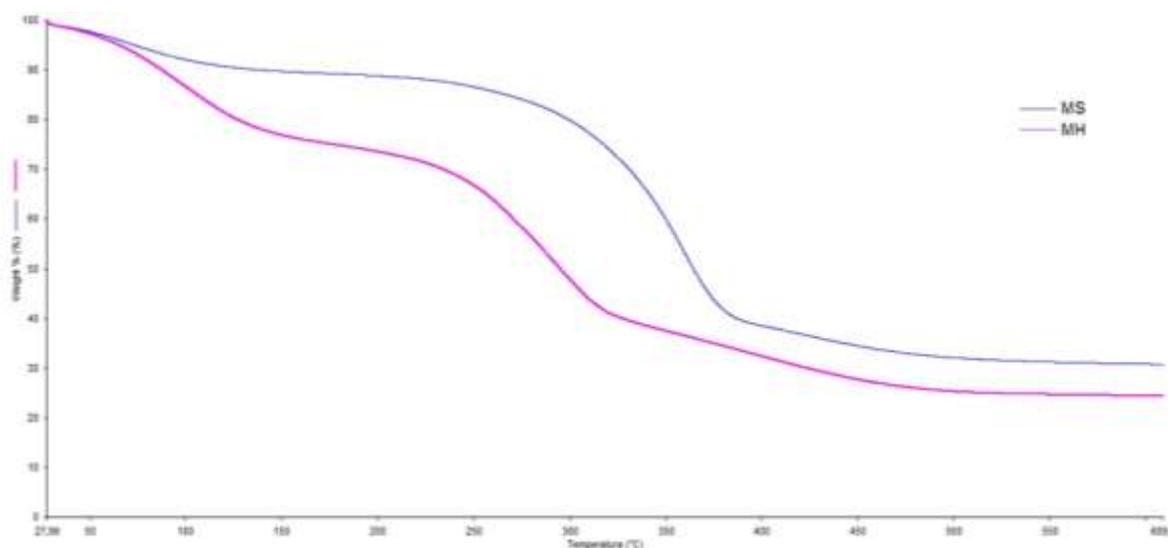


Figura 18: Termograma de TGA das celuloses secas obtidas dos diferentes meios.

A Figura 18 mostra uma diminuição bem menos significativa da perda de umidade em torno de 100°C, pelo fato das membranas já estarem secas, e a perda foi devida à evaporação de uma pequena quantidade de água absorvida. Nessa temperatura, no meio Hestrin-Schram modificado houve uma perda de 15% e de 8% no meio Salino.

Com o aumento da temperatura a massa foi diminuindo e na faixa de degradação da celulose bacteriana, houve uma diminuição de 30% da massa no meio Hestrin e 40% da massa no meio salino. Acima de 350°C houve a degradação termo-oxidativa que estabilizou a massa da celulose em torno de 30% da inicial em ambos os casos.

As análises das Figuras 17 e 18 evidenciam que ocorreram somente os eventos relacionados à celulose bacteriana, como a perda de umidade, degradação térmica e degradação termo-oxidativa, nos intervalos característicos, o que demonstra que o material

produzido é realmente o esperado, e que o tratamento com NaOH foi efetivo na remoção de material biológico e impurezas.

Além disso, a partir das Figuras 17 e 18, é possível afirmar que a CB obtida a partir do meio salino possui uma maior estabilidade térmica, em relação à produzida a partir do meio Hestrin-Schram modificado, independente da quantidade de água absorvida.

Na literatura, há estudos que investigam a estabilidade térmica da CB por termogravimetria, e neles há perfis de degradação bem semelhantes aos encontrados nesse trabalho, corroborando com as curvas apresentadas, em que há dois eventos principais, o primeiro correspondente à perda de massa por desidratação da película (100°C) e os outros relacionados à degradação, incluindo térmica e oxidativa (250-400°C) (GEA *et al.*, 2011; STUMPF *et al.*, 2013; VAZQUEZ *et al.*, 2013).

4.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias da CB produzida no meio Hestrin-Schram modificado e no meio salino são mostradas nas Figuras 19 e 20. A estrutura em rede característica da CB, assim como as fibras nanométricas são evidenciadas nestas figuras:

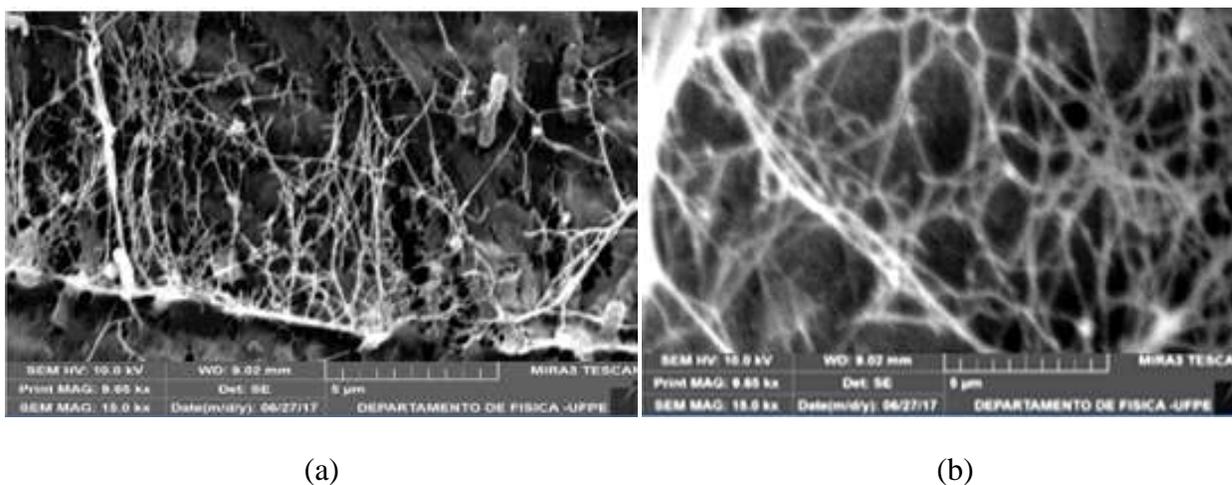


Figura 19 a) e b) : Micrografias da CB produzida no meio Hestrin-Schram modificado.

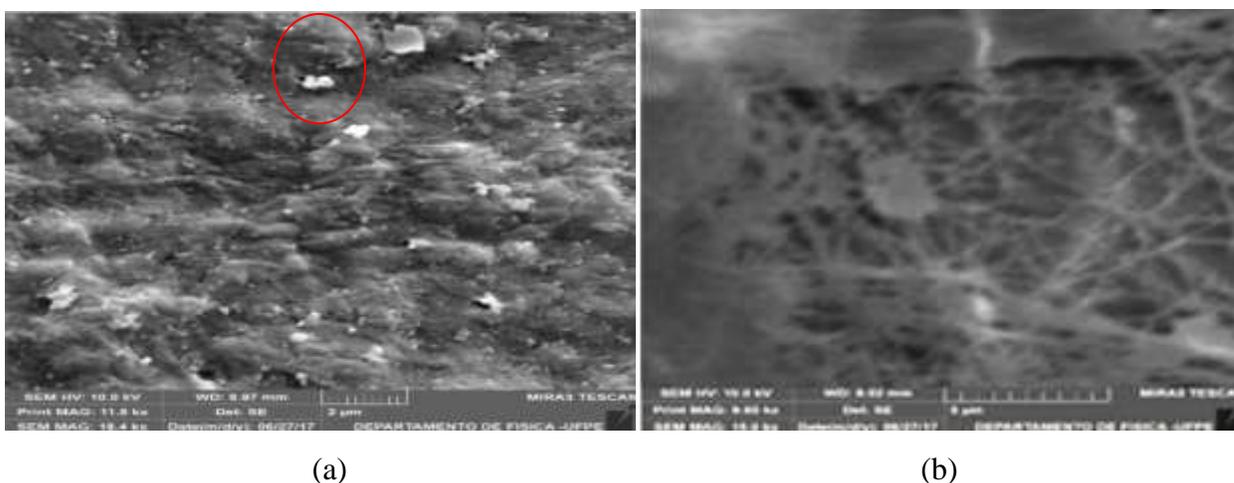


Figura 20 a) e b): Micrografias da CB produzida no meio salino.

A estrutura morfológica da CB produzida pela *G. hansenii* pode ser definida por uma orientação aleatória de nanofibrilas distribuídas não uniformemente na rede formada na película. É possível visualizar que há áreas que possuem agregados de estruturas fibrilares e outras em que as fibras estão mais dispersas, tornando a estrutura mais porosa. Nunes *et al.* (2012) afirma que essa estrutura desorganizada possa ser resultante do processo de secagem, em que a remoção da água da estrutura 3D resultará na aproximação das nanofibras que irão se agregar aleatoriamente através da formação de pontes de hidrogênio.

A estruturação nanométrica em rede é semelhante as micrografias evidenciadas na literatura (CASTRO *et al.*, 2012; SASKA *et al.*, 2001; JEON *et al.*, 2010). Em relação às dimensões das fibras, não houve grande diferença entre os diâmetros, os quais apresentaram valores de $73,65 \pm 17,75$ nm para a CB do meio Hestrin-Schram e $79,43 \pm 15,05$ nm. De acordo com Pecoraro e colaboradores (2008), as larguras das fibras nanométricas variam em torno de 70 a 80 nm.

A nanomorfologia única da CB resulta numa alta capacidade de retenção de água, fato que é um indicativo de uma elevada área superficial e uma alta capacidade de adsorção de biomoléculas (NUNES *et al.*, 2012).

As micrografias do meio salino mostraram alguns cristais precipitados no meio (Figura 20a), esse fato provavelmente ocorreu por causa da presença do cálcio que foi precipitado como cristalitos, fato semelhante também ocorreu com Batista (2014), que fez a análise do nanocompósito da CB misturada com hidroxiapatita, que por sua vez possui cálcio no meio.

4.2.5 Difractometria de Raios-X (DRX)

Os difratogramas de raios X obtidos das duas membranas secas são mostrados na Figura 21:

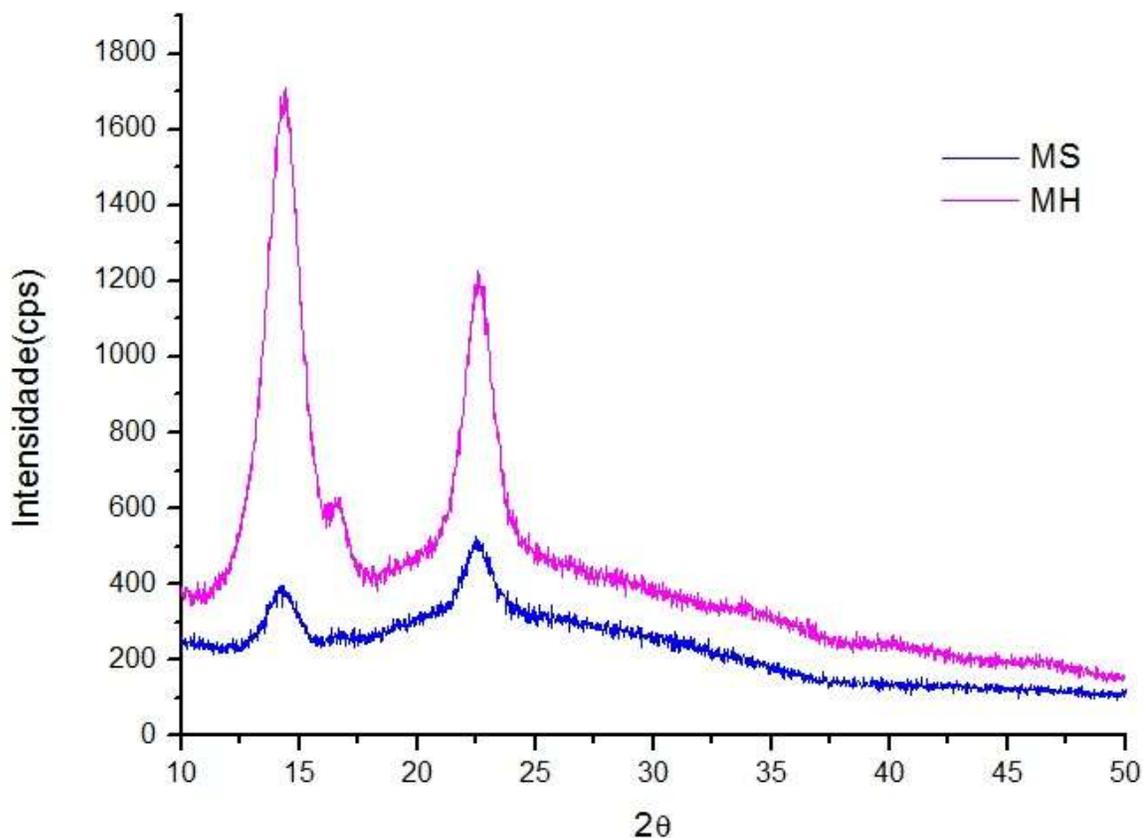


Figura 21: Difratogramas das CB obtidas dos diferentes meios.

Analisando-se os difratogramas obtidos nessa análise, observa-se que ambas as membranas apresentaram picos típicos de celulose bacteriana, picos de difração 2θ em 14,5°, 16,3° e 22,6°, os quais são normalmente atribuídos à distância entre os planos cristalográficos característicos das fases I_α e I_β da estrutura cristalina (VAZQUEZ *et al.*, 2013; SAKSA *et al.*, 2013). A presença das fases I_α e I_β é uma das características próprias da CB (VASQUEZ *et al.*, 2013).

Como a celulose não é um material completamente cristalino, os difratogramas apresentam picos largos e já que as membranas foram produzidas a partir de meios diferentes, há uma diferença do grau de cristalinidade.

As intensidades dos picos, característicos de celulose do tipo I, cujo pico cristalino situa-se em $22^\circ \leq \theta \leq 23^\circ$ e o halo amorfo entre os ângulos de $16^\circ \leq \theta \leq 19^\circ$, foram medidas a partir do gráfico da Figura 21 com auxílio do software ORIGIN para calcular o índice de cristalinidade.

A partir da Equação 4 foi possível calcular o grau de cristalinidade da CB proveniente do meio Hestrin-Schram modificado que foi de 84,64% , e do meio salino que foi de 50%.

Na literatura, relata-se que a CB possui alto grau de cristalinidade com valores entre 70 e 90% (TROVATTI *et al.*, 2011; RUKA *et al.*, 2012; UI-SLAM, 2014). O resultado da análise da membrana formada no meio Hestrin-Schram modificado confirma a alta cristalinidade esperada, com picos mais definidos e mais intensos, provenientes da densa estrutura formada.

Já a análise da CB obtida a partir do meio salino mostrou baixa cristalinidade, demonstrada através de picos mais largos e menos intensos, havendo uma menor organização das cadeias poliméricas. Apesar da baixa cristalinidade da CB obtida a partir do meio salino, Pértile (2007) trabalhando com membranas de CB sintetizadas pela *G.hansenii* , cultivadas em meio Hestrin-Schram por 7 dias a 30°C , obteve um IC estimado de 56 ± 5 %. Nesse caso, películas com baixos índices de cristalinidade tendem a apresentar menor resistência mecânica e capacidade de absorção de água, o que pode ser confirmado nas outras análises descritas nesse trabalho.

Um menor índice de cristalinidade obtido na produção de CB a partir do meio salino não impossibilita sua aplicação, visto que, materiais mais amorfos possuem conformações mais maleáveis e neste caso, aplicações em que a celulose precise ser manuseada

4.3 Estudo cinético da produção de celulose bacteriana

Com base na mesma metodologia utilizada para a produção das membranas produzidas nas seções 3.2.2 e 3.2.3, foi feito um estudo cinético que avaliou a influência do tempo na produção da CB , no crescimento bacteriano de células planctônicas e no consumo do glicerol em ambos os meios.

Os gráficos do consumo do substrato, crescimento celular e produção do biopolímero para cada meio são mostrados nas Figuras 22 e 23 .

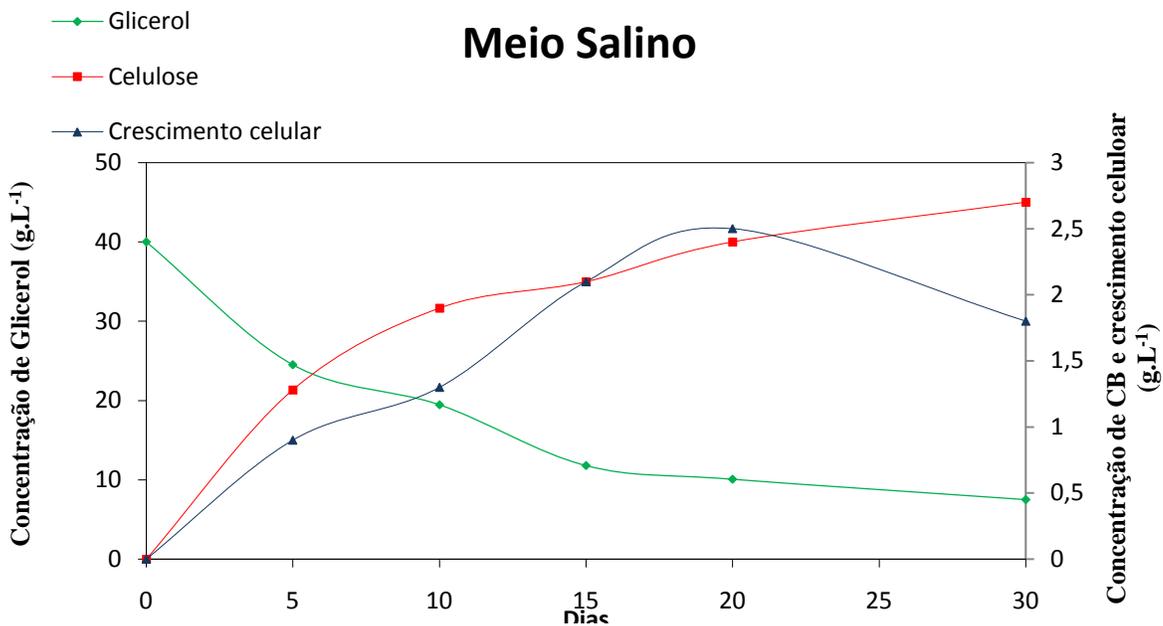


Figura 22: Gráfico da cinética de consumo de substrato e produção de CB produzida a partir do meio salino.

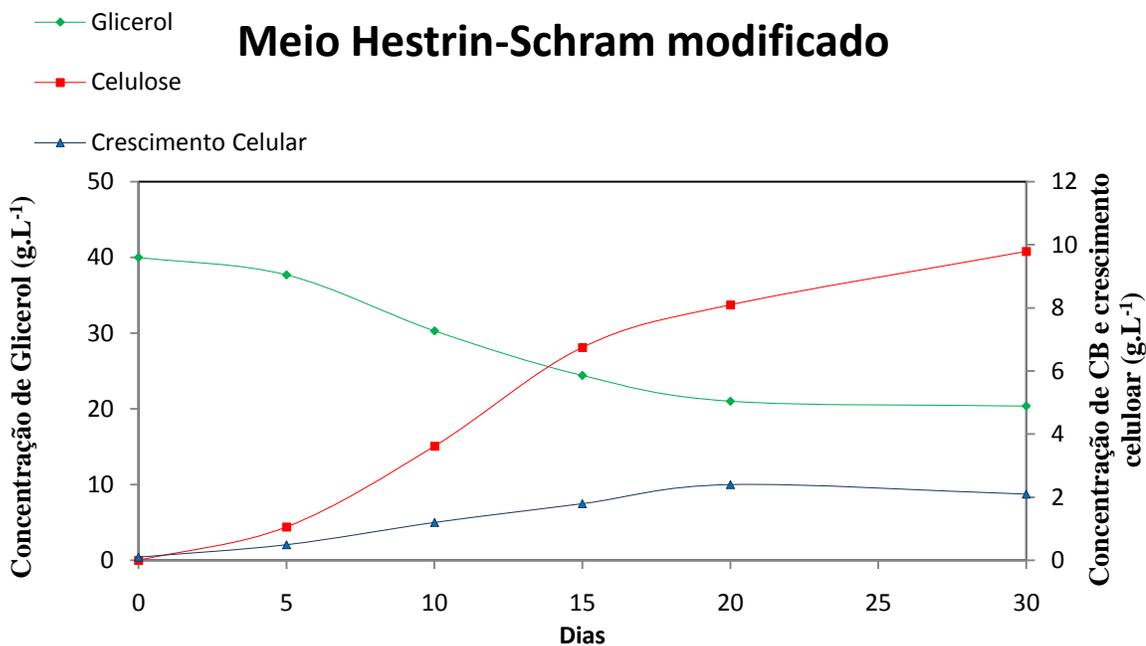


Figura 23: Gráfico da cinética de consumo de substrato e produção de CB produzida a partir do meio Hestrin-Schram modificado.

É possível observar através da visualização dos gráficos, que os meios estudados apresentaram um aumento da produção de CB com o passar do tempo, e a taxa de maior formação foi entre 0 e 5 dias para o meio salino, e 5 a 10 dias para o meio Hestrin. Nesse mesmo período, observou-se um maior crescimento de células, caracterizando assim, a fase log do crescimento celular. Além disso, a partir do 20º dia houve diminuição do crescimento celular no meio, fato característico da associação do micro-organismo à biomembrana e à morte celular.

A concentração do glicerol, também acompanhada durante o tempo, foi reduzida, confirmando o indicativo da relação consumo de substrato e formação de produto. As duas informações relacionam-se com o fato de que a celulose produzida pode ser sintetizada a partir do consumo do glicerol na formação da estrutura polimérica.

A partir das Figuras 22 e 23, observa-se que o consumo do glicerol é maior no meio salino, fato este que corrobora com os resultados das seções anteriores, em que a maior formação da membrana do meio Hestrin-Schram modificado, ocorre devido a maior quantidade e disponibilidade de outros nutrientes do meio, que são outras fontes de carbono, além do glicerol, sendo o glicerol residual do meio Hestrin-Schram modificado maior que o do meio salino. Mikkelsen *et al.* (2009) verificou que há o consumo de 57% do glicerol no meio para a formação de CB a partir do meio Hestrin-Schram modificado, e os dados encontrados apontam que 51% do glicerol no meio foi consumido.

Durante a produção de CB ao longo de 30 dias foi possível observar as mudanças no aspecto macroscópico da biomembrana, como é mostrado na Figura 24.

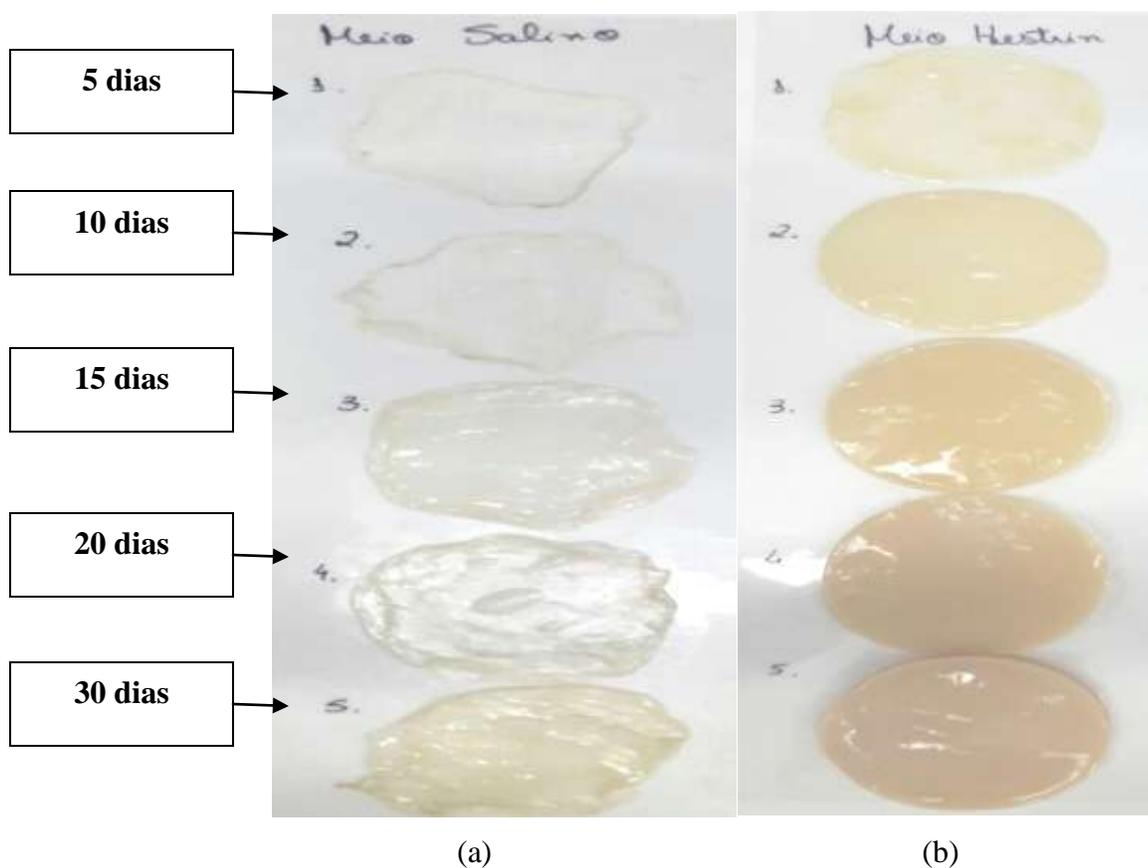


Figura 24: Imagens das membranas úmidas produzidas com o passar do tempo a) produção a partir do meio salino b) produção a partir do meio Hestrin-Schram modificado.

A Figura 24 mostra as diferenças na formação e espessura das membranas. As membranas do meio salino, visivelmente, não apresentam grandes diferenças em relação à espessura, além de não haver uma mudança significativa de cor. Já as membranas produzidas a partir do meio Hestrin-Schram modificado apresentaram-se cada vez mais grossas e a coloração foi sendo modificada gradativamente até uma estabilidade a partir do vigésimo dia.

Com as membranas secas, foi possível calcular a variação da espessura, como é mostrada na Figura 25.

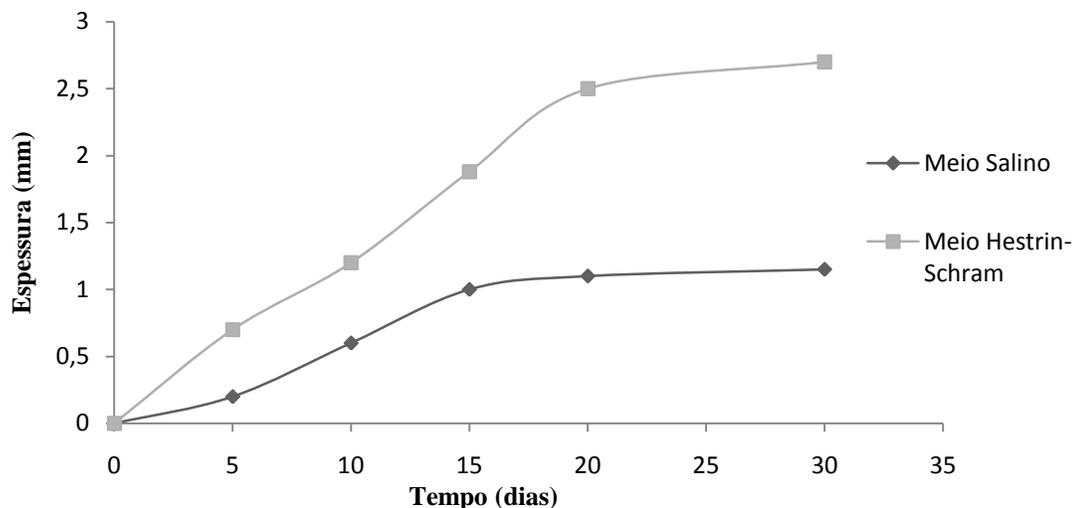


Figura 25: Variação da espessura em função do tempo das membranas de CB secas.

Uma tendência observada em relação à variação na espessura da biomembrana, em condições estáticas, é que, assim como a produção da CB, ela aumenta após um período de indução (Figura 25).

No caso do meio salino, houve uma espessura máxima de 1.1 mm, que ocorreu em 20 dias de cultivo, e em seguida, permaneceu praticamente constante. Já no meio Hestrin-Schram modificado, o aumento foi praticamente constante, com uma espessura máxima de 2,7 mm no tempo de 30 dias (Figura 25).

O pH do meio também foi avaliado, como mostra a Figura 26.

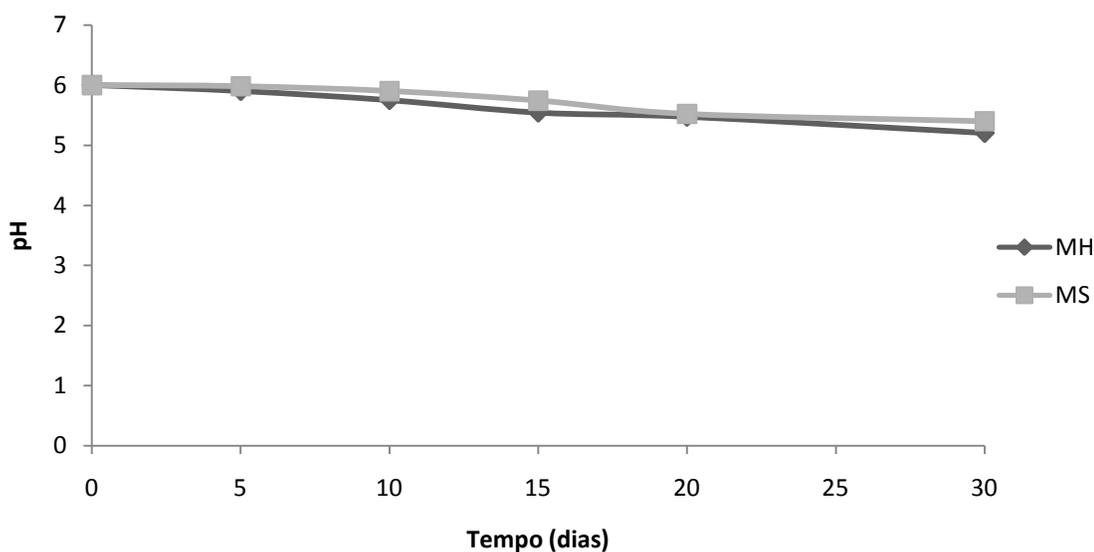


Figura 26: Variação de pH dos meios.

A partir da Figura 26, é possível observar que em ambos os meios o pH manteve-se praticamente constante, com uma pequena diminuição que resultou num pH final de 5,2 no meio Hestrin-Schram modificado e 5,4 no meio salino. Essa diminuição já era esperada, devido à formação de ácidos no meio (CHAWLA *et al.*, 2009).

4.3.1 Modelagem matemática

Para avaliar o consumo de substrato, o crescimento celular e a formação de produto foi proposto o modelo de Monod que descreve o comportamento cinético durante o processo em condições otimizadas. Partindo-se das equações apresentadas nas seções 3.4.1 e 3.4.2 foram determinados parâmetros cinéticos para ambos os meios mostrados na Tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros cinéticos calculados para cada meio estudado.

	Hestrin-Schram modificado	Salino
$Y_{X/S}$ $\frac{\text{(g de biomassa)}}{\text{(g de substrato)}}$	0,15	0,055
$Y_{P/S}$ $\frac{\text{(g de produto)}}{\text{(g de biomassa)}}$	0,45	0,083
$PR_p(\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1})$	0,327	0,09
$PR_x(\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1})$	0,09	0,06
Φ (%)	0,49	0,813
$\mu_{\text{máx}}(\text{dia}^{-1})$	0,12	0,099
$K_s(\text{g.L}^{-1})$	0,001	-

A partir dos parâmetros calculados e mostrados na tabela acima, é possível identificar algumas diferenças significativas na produção de celulose em cada meio.

O meio Hestrin-Schram modificado apresentou uma maior produtividade em relação ao produto, tendo em vista que houve uma maior produção de CB, comparado ao meio salino.

Em relação ao fator de conversão do substrato (Φ), o meio salino apresentou um valor mais alto, pois o cálculo leva em consideração a variação da concentração do glicerol, e como foi possível verificar no gráfico da Figura 19, o glicerol do meio salino reduziu bem mais, visto que, era a única fonte de carbono no meio, sendo o único a ser utilizado na formação da membrana.

Os parâmetros cinéticos foram calculados experimentalmente, assim como a constante de Monod, a qual foi calculada a partir da linearização da Equação 8 (Anexo 1), e além das considerações descritas, os dados da Tabela 10 serviram para auxiliar na modelagem do processo.

Para se realizar a análise matemática, algumas considerações foram feitas para simplificar o equacionamento das etapas do processo, pois a consideração de um modelo complexo exige um conhecimento bem amplo do mecanismo celular e de adaptação do micro-organismo.

Levou-se em consideração que:

- o processo ocorreu a volume constante, uniforme e homogêneo;
- formação da membrana na fase líquida;
- sistema isotérmico;
- a agregação do micro-organismo a CB será desprezada;
- a cinética do crescimento celular é linear à concentração da concentração de células planctônicas;
- a morte celular durante o processo será desprezada;
- a cinética de consumo do glicerol é linear em relação à formação da CB;
- a cinética da produção da CB é linear em relação à concentração de células planctônicas.

4.3.1.1 Balanço de materiais

Considerando como substrato limitante o glicerol e como produto de interesse a CB, a cinética fornecerá expressões para velocidade de crescimento ou de consumo para o substrato, o produto e a biomassa (células planctônicas). Para um sistema descontínuo, tem-se que:

$$[\cancel{Entrada}] = [\cancel{Saída}] + [Reação] + [Acúmulo] \quad (11)$$

Inicialmente, deve-se considerar as seguintes equações (SCHMIDELL *et al*; 2001) para um sistema descontínuo:

- a velocidade de crescimento celular é definida por:

$$r_x = \mu X \quad (12)$$

E considerando que o crescimento celular em relação ao substrato, segue o modelo de Monod, a velocidade específica de crescimento, pode ser expressa por:

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_S + S} \quad (13)$$

Na qual $\mu_{m\acute{a}x}$ e K_S , ambas constantes cinéticas do processo.

- A velocidade de consumo de substrato pela reação química é relacionada à velocidade de crescimento das células pela expressão:

$$r_s = \frac{r_x}{Y_{x/s}} \quad (14)$$

E também pode ser relacionada à velocidade de formação do produto:

$$r_s' = \frac{r_p}{Y_{p/s}} \quad (15)$$

- a velocidade de formação do produto pode ser relacionada à velocidade de crescimento celular pela expressão abaixo:

$$r_p = \frac{r_x}{Y_{p/s}} \quad (16)$$

Com as equações descritas acima, tem-se os seguintes balanços de massa:

- Para o crescimento celular (biomassa):

$$\left[\begin{array}{c} \text{Taxa Média} \\ \text{de densidade} \\ \text{de crescimento} \end{array} \right] \quad (17)$$

$$\mathcal{V} \frac{dX}{dt} = (r_x) \mathcal{V} \quad (18)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (19)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S \cdot X}{K_S + S} \quad (20)$$

- Para o substrato:

Considera-se que todos os componentes estão em excesso e que apenas um substrato (glicerol) é limitante do processo. De acordo com o balanço de massa, e sabendo-se que todo o substrato consumido foi utilizado para o crescimento do micro-organismo e para a formação da CB e considerando que não houve desvio de substrato para a manutenção celular, tem-se:

$$\left[\begin{array}{c} \text{Taxa Média} \\ \text{de consumo} \\ \text{de substrato} \end{array} \right] \quad (21)$$

$$\mathcal{V} \frac{dS}{dt} = -r_s \cdot \mathcal{V} - r_s' \cdot \mathcal{V} \quad (22)$$

Em que o sinal negativo indica que o substrato foi consumido ao longo do tempo.

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{r_x}{Y_{x/s}} - \frac{r_p}{Y_{p/s}} \quad (23)$$

- Para o produto (CB):

$$\mathcal{N} \cdot \frac{dP}{dt} = r_p \cdot \mathcal{N} \quad (24)$$

$$\mathcal{N} \cdot \frac{dP}{dt} = r_p \cdot \mathcal{N} \quad (25)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{r_x}{Y_{p/s}} \quad (26)$$

A partir dos parâmetros calculados na Tabela 10 e do sistema formado pelas equações diferenciais 20, 23 e 26 foi possível fazer a modelagem da produção de CB (Figura 27), a partir do meio Hestrin-Schram modificado, utilizando-se a ferramenta computacional Maple 17.

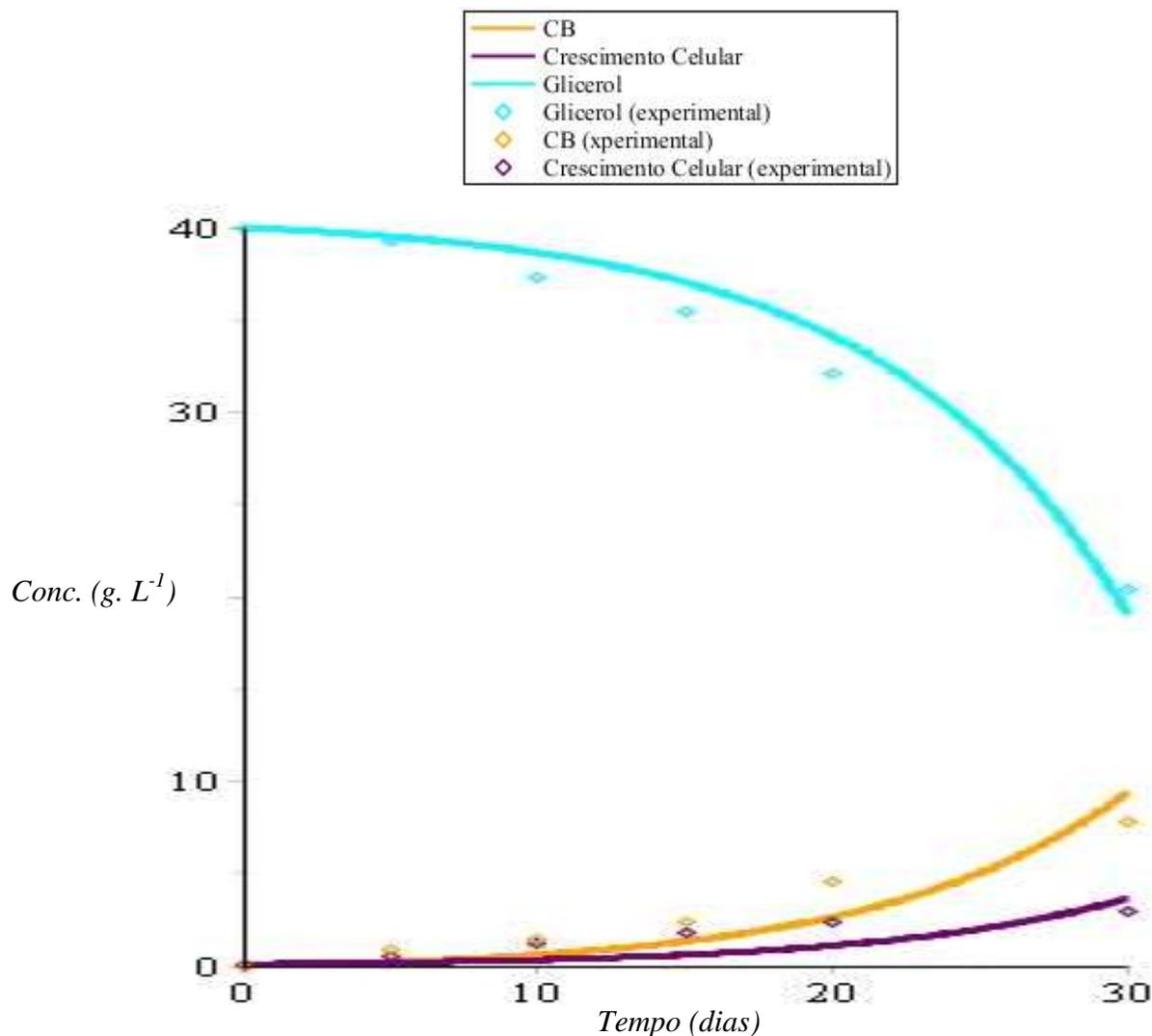


Figura 27 : Gráfico da modelagem do processo com meio Hestrin-Schram modificado.

A Figura 27 mostra a correlação dos pontos experimentais com os dados modelados, representados pelas linhas.

É possível verificar que há uma boa aproximação, com erro do ajuste do modelo de 9%, dos dados experimentais com os dados da modelagem. Apenas os valores do crescimento celular e da formação da CB se distanciam um pouco em alguns pontos, e isso pode ter ocorrido devido a consideração de apenas células planctônicas, algum erro experimental na leitura das amostras, secagem incompleta das membranas ou no preparo da curva analítica para as análises. De um modo geral, pode-se afirmar que o experimento ajusta-se ao modelo de Monod.

Os dados da produção de CB a partir do meio salino não se ajustaram ao modelo e não foi possível calcular a constante K_s , devido ao gráfico da linearização da equação de Monod não ter ficado bem ajustado.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foram avaliadas as produções de celulose bacteriana, um material polimérico biodegradável e biocompatível, produzido biotecnologicamente por micro-organismo, a partir de dois meios diferentes, um salino e outro sintético. Ambos os meios continham como principal fonte de carbono um resíduo industrial, o glicerol, viabilizando o custo total da produção.

A produção da biomembrana a partir do meio salino foi iniciada através de um planejamento fatorial, com a avaliação de três fatores: concentração de glicerol, de CaCl_2 e pH. O planejamento mostrou que todos os fatores estudados possuem significância estatística quando avaliados separadamente. A partir do melhor resultado do planejamento fatorial, em que o meio continha maior concentração de glicerol (40 g.L^{-1}) e CaCl_2 (3 g.L^{-1}), e maior pH (6), reproduziu-se o experimento com o meio salino e com o meio Hestrin-Schram modificado para fazer as caracterização físico-químicas da CB e cálculos de produção.

As biomembranas secas produzidas a partir do meio Hestrin-Schram modificado apresentaram uma massa 103% maior, e úmidas apresentaram 346% a mais comparadas às produzidas a partir do meio salino. O meio Hestrin-Schram modificado apresentou uma maior produção, valores maiores de capacidade de absorção de água e semelhante perda de água.

As películas de CB produzidas foram caracterizadas e foi possível verificar as características esperadas, como: grupos funcionais pertencentes à estrutura química da biomembrana; propriedades mecânicas coerentes com dados obtidos na literatura; películas termicamente estáveis; nanofibras observadas microscopicamente com padrões em escala nanométrica; alto grau de cristalinidade, com exceção do meio salino, que apresentou uma menor cristalinidade, mas fato parecido também havia sido observado em outro estudo.

Também foi feito um estudo cinético, no qual as películas de CB foram produzidas nas condições otimizadas durante trinta dias de cultivo, avaliando-se a diminuição da concentração de glicerol, o crescimento de células planctônicas e o aumento da formação da CB. Ambos os meios mostraram os fatos esperados na cinética. No meio salino houve um maior consumo de glicerol comparado ao meio Hestrin-Schram modificado, visto que, era a única fonte de carbono disponível. Além disso, a produção de CB deu-se em maior quantidade no meio Hestrin-Schram. Foram calculados os parâmetros cinéticos em ambos os meios, e com os dados obtidos do meio Hestrin-Schram foi possível fazer a modelagem matemática da produção, de acordo com o modelo de Monod.

Pode-se concluir que foi possível produzir a CB a partir de meio contendo glicerol. O meio tradicional já estudado na literatura produziu resultados satisfatórios em todas as análises, e a alternativa de um meio contendo apenas sais não foi tão satisfatória em questão de produção, podendo ser reformulado a fim de se obter uma maior produção. Mas de qualquer forma, houve produção da membrana com todas as características da CB.

A partir das conclusões obtidas nesta dissertação, algumas sugestões para trabalhos futuros podem ser apresentadas:

- Avaliar outras fontes de carbono, como sorbitol, quitosana, melão, frutose a partir de resíduos, no meio salino, a fim de avaliar um aumento da produção;
- Estudar a produção a partir do glicerol cru;
- Investigar a influência de outros parâmetros no meio como fontes de nitrogênio, oxigênio dissolvido e presença de etanol, com o objetivo de otimizar o processo;
- Utilizar outros modelos cinéticos para avaliar a modelagem;
- Estudar a degradação da biomembrana em meio que simule fluidos corporais, a fim de se utilizar o material para fins medicinais.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Boletim mensal do biodiesel**. Rio de Janeiro, abr. 2016. 13 p. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/producao-de-biocombustiveis/biodiesel/informacoes-de-mercado>>. Acesso em: 21 de agosto 2017.

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

ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. Glycerol: a brief history and their application in stereoselective synthesis. **Química Nova**, v. 34, n. 2, São Paulo, 2011.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e Otimização de experimentos**, Campinas-SP; editora da UNICAMP, 2007.

BARUD, H. S.; RIBEIRO, C. A.; CRESPI, M.S.; MARTINES, M.A.U; DEXPERTGHYS, J.; MARQUES, R.F.C; MESSADDEQ, Y. RIBEIRO, S.J.L. Thermalcharacterizationofbacterialcellulose-phosphatecompositemembranes. **J.Therm. Anal. Calorim.** v. 87, n. 3, p. 815-818, 2007.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2 ed. The Proteobacteria, ed. G.M. Garrity.Vol. 2. 2005, **East Lansing, MI: Springer**.

BIONEXT. Disponível em: <<http://bionext.com.br/tecnologia/celulosebacteriana.php>>. Acesso em: 14 de outubro de 2017.

BROWN, A.J., XLIII.-On an acetic ferment which forms cellulose. **Journal of the Chemical Society**, Transactions, 1986. 49: p. 432-439.

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 agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. **Bioresource Technology**, v. 102 , n. 15, p. 7354-7360, 2011.

CASTRO, C.; ZULUAGA, R.; PUTAUX, J. L.; GAÑÁN, P. F. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacterswingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 96–102, 2011.

CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Microbial cellulose: Fermentative production and applications (Review). **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107–124, 2009.

CZAJA, W. et al. Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145–151, 2006.

- CHO, S.; ALMEIDA, N. Dietary fiber and health. **CRC Press** Taylor and Francis Group (2012).
- DAS, S.; LACHENAL, D.; MARLIN, N. Production of pure cellulose from Kraft pulp by a totally chlorine-free process using catalyzed hydrogen peroxyde. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 844-850, 2013.
- DAYAL, M. S.; GOSWAMI, N; SAHAI, A.; JAIN, V; MATHUR, G.; MATHUR, A. Effect of media components on cell growth and bacterial cellulose production from *Acetobacteraceti* MTCC 2623. **Carbohydratepolymers**, v. 94, n.1, p. 12-16, 2013.
- 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 avanos na produo de celulose bacteriana. **Eclat.Qu m** v. 35, n. 4, p. 165-178, 2010.
- ERBAS, K. E.; KIZILTAS, A.; GARDNER, D. J. Synthesis of bacterial cellulose using hot water extracted wood sugars. **Carbohydrates polymers**, v. 8, p. 124-131, 2015.
- FREITAS, F., V.D. ALVES, J. PAIS, M. CARVALHEIRA, N. COSTA, R. OLIVEIRA, AND M.A.M. REIS, Production of a new exopolysaccharide (EPS) by *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 grown on glycerol. **Process Biochemistry**, 2010. 45(3): p. 297-305.
- GAMA, M.; GATENHOLM, P.; DIETER K. **Bacterial Nano Cellulose: A Sophisticated Multifunctional Material**, Ed. CRC Press, 13 denov de 2012 - 304 p ginas.
- GEA, S.; REYNOLDS, C. T.; ROOHPUR, N.; WIRJOSENTONO, B.; SOYKEABKAEW, N.; BILOTTI, E.; PEIJS, T. Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behavior of bacterial cellulose after a two-step purification process. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9105-9110 , 2011.
- HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacterxylinum*. II. Preparation of freeze- dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochem J.**, v. 58, n. 2, p. 345-352, 1954.
- HIRAI, A.; TSUJI, M.; HORII, F. Culture conditions producing structure entities composed of Cellulose I and II in bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 4, p. 239-245, 1997.
- HSIEH, J. T.; WANG, M. J.; LAI, J. T.; LIU, H. S. A novel static cultivation of bacterial cellulose production by intermittent feeding strategy. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 63, p. 46-51, 2016.
- HUANG, G.H., F. CHEN, D. WEI, X.W. ZHANG, AND G. CHEN, Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, 2010. 87(1): p. 38-46.
- 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 *Gluconacetobacterpersimmonis* GH-2. **J. Micro. Bioch.Tech.** v. 2, p. 127-133, 2013.

JUNG, H.I., O.M. LEE, J.H. JEONG, Y.D. JEON, K.H. PARK, H.S. KIM, W.G. AN, AND H.J. SON, Production and Characterization of Cellulose by *Acetobacter* sp V6 Using a Cost-Effective Molasses-Corn Steep Liquor Medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2010. 162(2): p. 486-497.

KESHK, S. M. Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 04, n. 02, p. 1–10, 2014.

KESHK, S. M., SAMESHIMA, K. Influence of Lignosulfonate on Crystal Structure and Productivity of Bacterial Cellulose in a Static Culture. **Enzyme Microbiology Technology**, 40 (2006), pp. 4-8.

KLEMM, D.H.; FINK, H. P.; BOHN, A.. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International Edition**, 2005. 44(22): p. 3358-3393.

KLEMM, D.H.; KRAMER, F.; MORITZ, S.; LINDSTROM, T.; ANKERFORS, M.; GRAY, D. D. Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. **Angewandte Chemie International**, v. 50, p. 5438-5466, 2011.

KONGRUANG, S., Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* Strains from Agricultural Waste Products. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2008. 148(1): p. 245-256.

KUROSUMI, A., C. SASAKI, Y. YAMASHITA, AND Y. NAKAMURA, Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. **Carbohydrate Polymers**, 2009. 76(2): p. 333- 335.

LEE, K. Y.; BULDUM, G.; MANTALARIS, A.; BISSMARCK, A. More than meets the eye in bacterial cellulose: Biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, n. 1, p. 10–32, 2014.

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

LIN, D., SANCHEZ, P. L.; LI, R.; LI, Z. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 113-119, 2014.

MATHUR, C.; RAJ, S.; SASE, N; KRISH, S.; JAYASRI, M.A. Seaweed liquid fertilizers as prospective biostimulant for *Glycine max*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 6, p. 813-820, 2015.

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.

MOHITE, B. V.; PATIL, S. V. A novel biomaterial: Bacterial cellulose and its new era applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 101–110, 2014.

MULLER, D. Incorporação de polímeros intrinsecamente condutores em nanofibras de celulose bacteriana. Tese. Engenharia de Materiais. Universidade Federal de Santa Catarina. **UFSC**. 2012.

NUNES, A. S. C.; **Bacterial cellulose as a nanostructured functional material for medical applications**. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica). Universidade do Minho, 2012.

OLIVEIRA, R.L.; OLIVEIRA, G.C.; MEIRELES, C.S.; ASSUNCAO, R.M.N.; BARUD, H.S.; RODRIGUES F. G. MESSADEQ, Y.; RIBEIRO, S.J.L. **Síntese e caracterização da celulose micro cristalina a partir da celulose bacteriana**. VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria 25 a 28 de Abril de 2010 – São Paulo, SP.

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

PARK, S. U.; LEE, B. K.; KIM, M. S.; PARK, K. K.; SUNG, W. J.; KIM, H. Y. (2014). **The possibility of microbial cellulose for dressing and scaffold materials**. *Int. Wound J.* 11 35–43. 10.1111/j.1742-481X.2012.01035.x

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

PERTILE, R. A. N. **Estudo *in vitro* da interação da linhagem de fibroblastos L929 com membrana de celulose bacteriana para aplicações em engenharia de tecidos**. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, 2007.

PICHETH, G.F.; PIRICH, C.L.; SIERAKOWSKI, M.R.; WOEHL, M.A.; SAKAKIBARA, C.N.; de SOUZA, C.F.; MARTIN, A.A.; da SILVA, R.; de FREITAS, R.A. Bacterial Cellulose in biomedical applications: A review. **International Journal of biological macromolecules**, 2017, p. 97-106.

QURESHI, O.; SOHAIL, H.; LATOS, A.; STRAP, J. L. The effect of phytohormones on the growth, cellulose production and pellicle properties of *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53582. **Acetic Acid Bacteria**, v. 2, 2013.

RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M.; KUMBHAR, J. V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. ASAP, 2015.

REINIATI, I; HRYMAK, A.N.; MARGARITIS, A. Recent developments in the production and applications of bacterial cellulose fibers and nanocrystals. **Critical reviews in biotechnology**, 2016. 37 (4): p. 510-524.

RIVAS, B., A.B. MOLDES, J.M. DOMINGUEZ, AND J.C. PARAJO, Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid

production with *Lactobacillus rhamnosus*. **International Journal of Food Microbiology**, 2004. 97(1): p. 93-98.

ROSLI, N.A., AHMAD, I. & ABDULLAH, I. Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from *Agave angustifolia* fibre. **BioResources**, 2013. 8: 1893-1908.

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

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.

SAIBUATONG, O. A., PHISALAPHONG, M. Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis. **Carbohydr Polym** 79(2): 455–460 (2010).

SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; SYDNEY, E. B.; LE BIHAN, Y.; BUELNA, G.; SOCCOL, C. R. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: a review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 8, p. 6473-6490, Apr. 2012.

SASKA, S.; BARUD, H. S.; GASPAR, A. M. M.; MARCHETTO, R.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. **Internation Journal of Biomaterials**, v. 2011, 2011.

SHI, Q.S. , FENG, J. , LI, W.R. , ZHOU, G. , CHEN, A.M. , OUYANG , Y.S. , CHEN Y.B. Effect of Different Conditions on the Average Degree of Polymerization of Bacterial Cellulose Produced by *Gluconacetobacter Intermedius* BC-41. **Cellulose Chemical Technology**, 47 (7-8) (2013), pp. 503-508.

SCHMIDELL, W., BORZANI, W., AQUARONE, E., LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial V. 3**. Editora Blucher, 2001.

SILVA, T. R. S. S. Desenvolvimento de hidrogéis de celulose bacteriana para cultura de células e permeação de biomoléculas. **Dissertação** (mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

SON, C.; CHUNG, S.; LEE, J.; KIM, S. Isolation and cultivation characteristics of *Acetobacter xylinum* KJ-1 producing bacterial cellulose in shaking cultures. **J. Microbiol. Biotechnol.** 12 722–728 (2002).

SON, H., KIM, H., KIM, K., KIM, H. S., KIM, Y., LEE, S. Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter sp.* V6 in synthetic media under shaking culture conditions. **Bioresource Technology**, v. 86, n. 3, p. 215-219, 2003.

SUNAGAWA, N.; FUJIWARA, T.; YODA, T.; KAWANO, S.; SATOH, Y.; YAO, M.; TAJIMA, K; DAIRI, T. Cellulose complementing factor (Ccp) is a new member of the cellulose synthase complex (terminal complex) in *Acetobacter xylinum*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 6, p. 607–612, 2013.

TABUCHI, M. Nanobiotech versus synthetic nanotech? **Nat. Biotechnol.** v. 25, n. 4, p. 389-390, 2007.

TROVATTI, E.; SERAFIM, L. S.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. Gluconacetobactersacchari: An efficient bacterial cellulose cell-factory. **Carbohydr.Polym.**, v. 86, n. 3, p. 1417-1420, 2011.

TSOUKO, E.; KOURMENTZA, C.; LADAKIS, D.; KOPSAHELIS, N.; MANDALA, I.; PAPANIKOLAOU, S.; PALOUKIS, F.; ALVES, V.; KOUTINAS, A. Bacterial Cellulose Production from Industrial Waste and by-Product Streams. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 14832–14849, 2015.

UI-SLAM, M.; KHAN, S.; ULLAH, M. W.; PARK, J. K. Bacterial celluloses composites: Shyntetic strategies and multiple applications in bio-medical and eletro-conductive fields. **Biotechnology Journal**, p. 47-61, 2015.

VALERIO, O.; HORVATH, T.; POND, C.; MISRA, M.; MOHANTY, A. Improved utilization of crude glycerol from biodiesel industries: synthesis and characterization of sustainable biobased polyesters. **Industrial CropsandProducts**, v. 70, p. 141-147, Dec. 2015.

VALOR ECONÔMICO. **Produção brasileira de celulose cresce 8,1% em 2016.** São Paulo, fev. 2017, p. 1. Disponível em: <<http://www.valor.com.br/empresas/4856722/producao-brasileira-de-celulose-cresce-81-em-2016>>. Acesso em: 14 de junho 2017.

VAZQUEZ, A.; FOREST, M.L.; CERRUTI, P.; GALVANO, M. Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by Gluconacetobacter xylinus. **Journal Polymer Environment**, p. 1-10, 2013.

VIANA, M. B. **Produção de biogás a partir de glicerol oriundo de biodiesel.** 2011. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

YAN, Z., CHEN, S., WANG, H., WANG, B., JIANG, J., 2008. Biosynthesis of Bacterial cellulose/Multi-Walled Carbon Nanotubes in Agitated Culture. **Carbohydrate Polymers** 74, 659–665.

YASSINE, F., BASSIL, N., FLOUTY, R., CHOKR, A., SAMRANI, A. E., BOITEUX, G., AND TAHCHI, M. E., Culture medium pH influence on Gluconacetobacter physiology: Cellulose production rate and yield enhancement in presence of multiple carbon sources., **Carbohydrate Polymers** (2016).

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

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

WANG, Z. X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. A.; **Biotechnology Advances**, 2001, 19, 201.

ZENG, W.; SMALL, D.P.; WAN, W. Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup. **Carbohydr Polym** 85:506–513 (2011).

ZIMMERMAN, K. A.; LEBLANC, J. M.; SHEETS, K. T.; FOX, R. W.; GATENHOLM, P. Biomimetic design of a bacterial cellulose/hydroxyapatite nanocomposite for bone healing applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, n. 1, p. 43-49, 2011.

ZHONG, C., ZHANG, G. C., LIU, M., ZHENG, X. T., HAN, P. P., JIA, S. R. Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 13-4908-8, 2013.

ANEXO

1) Linearização da equação de Monod

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_s + S} \quad (21)$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s + S}{\mu_{m\acute{a}x} \cdot S} \quad (22)$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{m\acute{a}x} \cdot S} + \frac{S}{\mu_{m\acute{a}x} \cdot S} \quad (23)$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (24)$$

APÊNDICE

A) Curva analítica para determinar o crescimento planctônico

