



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

HELENISE ALMEIDA DO NASCIMENTO

**PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO DE CELULOSE BACTERIANA ADITIVADO COM
ANTIOXIDANTE NATURAL**

RECIFE
2022

HELENISE ALMEIDA DO NASCIMENTO

**PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO DE CELULOSE BACTERIANA ADITIVADO COM
ANTIOXIDANTE NATURAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadoras: Profa. Dra. Glória Maria Vinhas

Profa. Dra. Daniella Carla Napoleão

Coorientadora: Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo

Recife

2022

Catálogo na fonte
Bibliotecária Maria Luiza de Moura Ferreira, CRB-4 / 1469

- N244p Nascimento, Helenise Almeida do.
Produção de biopolímero de celulose bacteriana aditivado com antioxidante natural / Helenise Almeida do Nascimento. - 2022.
114 folhas, il.; tab.
- Orientadora: Profa. Dra. Glória Maria Vinhas.
Orientadora: Profa. Dra. Daniella Carla Napoleão.
Coorientadora: Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo.
- Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2022.
Inclui Referências.
1. Engenharia Química. 2. Antioxidantes. 3. Celulose bacteriana.
4. Cosméticos. 5. Esterilização gama. 6. Komagataeibacter hansenii. I. Vinhas, Glória Maria (Orientadora). II. Napoleão, Daniella Carla (Orientadora). III. Sarubbo, Leonie Asfora (Coorientadora). IV. Título.

UFPE

660.2 CDD (22. ed.)

BCTG/2022-328

HELENISE ALMEIDA DO NASCIMENTO

**PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO DE CELULOSE BACTERIANA ADITIVADO COM
ANTIOXIDANTE NATURAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Tecnologia e Geociências, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química. Área de concentração: Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovado em: 19 / 08 / 2022.

BANCA EXAMINADORA

Participação por Videoconferência

Profa. Dra. Cristiana Maria Pedroso Yoshida (Examinadora Externa)
Universidade Federal de São Paulo

Participação por Videoconferência

Prof. Dr. Eduardo Henrique Lago Falcão (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Participação por Videoconferência

Prof. Dr. Guilhermino José Macêdo Fachine (Examinador Externo)
Universidade Presbiteriana Mackenzie

Participação por Videoconferência

Profa. Dra. Patrícia Moreira Azoubel (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Participação por Videoconferência

Profa. Dra. Yêda Medeiros Bastos de Almeida (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a Deus por nortear minha vida e me permitir seguir esse caminho e à minha mãe Ana Mariêta Almeida de Freitas Nascimento por todo seu amor incondicional, presença, apoio e incentivo nos momentos de dificuldades.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora por abençoarem toda minha vida e me permitirem ser resiliente para nunca desistir de alcançar meus objetivos.

Aos meus pais Ana Mariêta e José Sérgio que sempre se esforçaram muito para permitir que suas filhas tivessem a oportunidade de estudar. De uma forma toda especial à minha mãe que mesmo diante de muitas dificuldades é meu porto seguro e exemplo de luta e dedicação.

Às minhas irmãs Heloisa Maria e Ana Luisa e aos meus amados sobrinhos Bianca Falcão e Wanderson Filho, que com todo incentivo, amor e carinho foram fundamentais nessa caminhada.

Ao meu melhor amigo Hendryo Bastos por ter sido meu companheiro e um grande suporte ao longo desses anos, compartilhando vários momentos, torcendo, apoiando, incentivando e sempre disposto a ajudar.

Às minhas orientadoras, as professoras Dras. Glória Maria Vinhas e Daniella Carla Napoleão e à minha coorientadora a professora Dra. Leonie Asfora Sarubbo, pela confiança de terem me aceitado como aluna, pela amizade, paciência, disponibilidade e incentivo. Vocês são exemplos de dedicação e comprometimento com a pesquisa. Muito obrigada por todo apoio que foi fundamental para a realização desse trabalho.

À professora Dra. Andréa Fernanda da Santana Costa pelo seu apoio, suporte e conhecimento compartilhado.

Aos amigos da pesquisa, em especial Júlia Didier, Cláudio José, Alexandre D'Lamare, Ivo Diego, Lucas Ferreira, Mariana Alves, pela parceria e troca de experiências no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Laboratório de Biotecnologia da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) e ao Laboratório de Petroquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) por toda a infraestrutura disponibilizada.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Nesse estudo foram desenvolvidas matrizes de celulose bacteriana (CB) aditivadas pelos métodos *in situ* e *ex situ* com a utilização de extratos ricos em substâncias antioxidantes naturais, derivados da casca de uva e do repolho roxo, para emprego em aplicações cosméticas. A produção da CB foi realizada com a bactéria *Komagataeibacter hansenii* em meios com diferentes composições dos extratos produzidos e do meio padrão (Hestrin-Schramm - HS). Verificou-se que, após 7 dias de cultivo, os rendimentos obtidos variaram entre 84 e 155 g.L⁻¹ de CB hidratada. As amostras produzidas exibiram elevadas porosidade e capacidade de retenção de água ($\approx 98\%$). Ademais, foi realizado um processo de esterilização por irradiação gama para garantir a biossegurança das matrizes. As CB antes e após a esterilização foram caracterizadas pelas técnicas de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, difratometria de raios-X, termogravimetria e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados destas análises demonstraram que não houve alterações nas estruturas química e morfológica das CB após a esterilização. Foi também avaliada a atividade antioxidante e os melhores resultados foram encontrados nas CB produzidas com extrato da casca de uva puro pelos métodos *in situ* (U100-G) e *ex situ* (HS-UG“*ex situ*”), com médias de 35,6% e 30,3%, respectivamente. Além disso, foi observado que os materiais produzidos são capazes de liberar os extratos incorporados em meio aquoso. O conjunto de resultados encontrados demonstram que as CB obtidas apresentaram características hidratantes e antioxidantes, além da capacidade de liberação de compostos, propriedades importantes para uso em aplicações cosméticas. Ademais, os meios propostos mostraram-se eficientes, aumentando o rendimento e reduzindo os custos de produção em comparação aos obtidos com o meio padrão HS.

Palavras-chave: antioxidantes; celulose bacteriana; cosméticos; esterilização gama; *Komagataeibacter hansenii*.

ABSTRACT

In this study, bacterial cellulose (BC) matrices were developed with additives by *in situ* and *ex situ* methods, using extracts rich in natural antioxidant substances, derived from grape skins and red cabbage, for use in cosmetic applications. The production of BC was carried out with the bacterium *Komagataeibacter hansenii* in media with different compositions of the extracts produced and the standard medium (Hestrin-Schramm - HS). It was found that after 7 days of cultivation, the yields obtained varied between 84 and 155 g.L⁻¹ of hydrated CB. The samples produced exhibited high porosity and water holding capacity ($\approx 98\%$). In addition, a gamma irradiation sterilization process was carried out to ensure the biosecurity of the matrices. The BC before and after sterilization were characterized by infrared spectroscopy with Fourier transform, X-ray diffractometry, thermogravimetry and scanning electron microscopy. The results of these analyzes showed that there were no changes in the chemical and morphological structures of BC after sterilization. The antioxidant activity was also evaluated and the best results were found in the CB produced with pure grape skin extract by the *in situ* (U100-G) and *ex situ* (HS-UG “ex situ”) methods, with averages of 35.6% and 30.3%, respectively. In addition, it was observed that the materials produced are capable of releasing the extracts incorporated into an aqueous medium. The set of results found demonstrate that the CB obtained showed moisturizing and antioxidant characteristics, in addition to the ability to release compounds, important properties for use in cosmetic applications. Furthermore, the proposed media proved to be efficient, increasing yield and reducing production costs compared to those obtained with the standard HS media.

Keywords: antioxidants; bacterial cellulose; cosmetics; gamma sterilization; *Komagataeibacter hansenii*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura química da celulose.	22
Figura 2 –	Micrografias das fibras de celulose bacteriana (a) e celulose vegetal (b).	23
Figura 3 –	Vantagens estruturais e propriedades da celulose bacteriana.	26
Figura 4 –	Celulose bacteriana produzida pelo método de cultura: estática (a) e agitada (b).	29
Figura 5 –	(a) Biorreator do tipo RBF (Fermentador biológico rotativo), (b) Celulose bacteriana aderida aos discos rotativos do reator, (c) Suporte de plástico composto em um biorreator (PCs), (d) Celulose bacteriana fixada no suporte.	31
Figura 6 –	Esquema da produção <i>in situ</i> da celulose bacteriana.	33
Figura 7 –	Esquema da produção <i>ex situ</i> da celulose bacteriana.	34
Figura 8 –	Estrutura química básica da antocianidinas.	39
Figura 9 –	Algumas das aplicações da celulose bacteriana.	41
Figura 10 –	Fluxograma das etapas experimentais.	51
Figura 11 –	Meios de produção das membranas de celulose bacterianas. U100, U50, U25, R100, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R).	63
Figura 12 –	Aspectos das membranas de celulose bacteriana úmidas para cada meio de cultura utilizado. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) e HS: meio padrão.	65
Figura 13 –	Aspecto da membrana de celulose bacteriana produzida com meio HS antes (a) e após (b) a purificação com hidróxido de sódio.	66
Figura 14 –	Esquema do processo de aditivação <i>ex situ</i> para as membranas de celulose bacteriana. HS: meio padrão. U“ <i>ex situ</i> ”: extrato de uva. R“ <i>ex situ</i> ”: extrato de repolho roxo.	68
Figura 15 –	Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das membranas de celulose bacteriana. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes	

	composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método <i>in situ</i> .	72
Figura 16 –	Difratogramas de raios-X das membranas de celulose bacteriana. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método <i>in situ</i> .	74
Figura 17 –	Curvas termogravimétricas das membranas de celulose bacteriana. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método <i>in situ</i> .	78
Figura 18 –	Imagens de microscopia eletrônica de varredura das membranas de celulose bacteriana. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método <i>in situ</i> .	80
Figura 19 –	Teste de crescimento de micro-organismos com (a) membranas de celulose bacteriana esterilizadas por irradiação gama (G), (b) membranas de celulose bacteriana não esterilizadas. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e de repolho roxo (R) produzidos pelo método <i>in situ</i>	84
Figura 20 –	Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das membranas de celulose bacteriana esterilizadas com irradiação gama. HS-G: meio padrão. U100-G, U50-G, U25-G, R50-G, R25-G: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método <i>in situ</i> .	87
Figura 21 –	Difratogramas de Raios-X das membranas de celulose bacteriana esterilizadas com irradiação gama. HS-G: meio padrão. U100-G, U50-G, U25-G, R50-G, R25-G: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método <i>in situ</i> . HS-UG"ex situ", HS-RG"ex situ": produzidas pelo método <i>ex situ</i> .	88

- Figura 22 – Curvas termogravimétricas das membranas de celulose bacteriana esterilizadas. HS-G: meio padrão. U100-G, U50-G, U25-G, R50-G, R25-G: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método *in situ*. HS-UG“ex situ”, HS-RG“ex situ”: membranas produzidas pelo método *ex situ*. 91
- Figura 23 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura das membranas de celulose bacteriana esterilizadas com irradiação gama. HS-G: meio padrão. U100-G, U50-G, U25-G, R50-G, R25-G: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método *in situ*. 93
- Figura 24 – Varredura espectral de (400-700nm) para os extratos de uva (U) e repolho roxo (R) puros e os sobrenadantes após contato das membranas de celulose bacteriana esterilizadas com irradiação gama. U100-G, U50-G, U25-G, R50-G, R25-G: meios com diferentes composições dos extratos produzidos pelo método *in situ*. HS-UG“ex situ”, HS-RG“ex situ”: produzidas pelo método *ex situ*. 97
- Figura 25 – Gráficos de correlação em 522 e 540 nm para avaliar a capacidade de liberação dos extratos nas membranas de celulose bacteriana esterilizadas com irradiação gama. U100-G, U50-G, U25-G, R50-G, R25-G: meios com diferentes composições dos extratos produzidos pelo método *in situ*. HS-UG“ex situ”, HS-RG“ex situ”: produzidas pelo método *ex situ*. 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Principais propriedades da celulose bacteriana versus a celulose vegetal.	27
Tabela 2 –	Composição e pH dos meios modificados utilizados na produção da celulose bacteriana.	54
Tabela 3 –	Rendimento das membranas de celulose bacteriana (CB) úmida e seca para cada meio de cultura utilizado e o custo médio de produção. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R100, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R).	62
Tabela 4 –	Capacidade de retenção de água (CRA) das membranas de celulose bacteriana. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R).	69
Tabela 5 –	Porosidades das membranas de celulose bacteriana. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R)	70
Tabela 6 –	Índices de cristalinidade das membranas de celulose bacteriana. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método <i>in situ</i> .	76
Tabela 7 –	Dados de decomposição térmica das membranas de celulose bacteriana obtidas por meio das curvas de análise termogravimétrica. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método <i>in situ</i> : T _{onset} , T _{endset} : temperaturas de início e de fim para cada estágio.	77
Tabela 8 –	Índices de cristalinidade das membranas de celulose bacteriana esterilizadas com irradiação gama. HS-G: meio padrão. U100-G, U50-G, U25-G, R50-G, R25-G: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R)	

produzidos pelo método *in situ*. HS-UG“ex situ”, HS-RG“ex situ”: membranas produzidas pelo método *ex situ*.

89

Tabela 9 – Dados de decomposição térmica das membranas de celulose bacteriana esterilizadas obtidas por meio das curvas de análise termogravimétrica. HS-G: meio padrão. U100-G, U50-G, U25-G, R50-G, R25-G: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U-G) e repolho roxo (R-G) produzidos pelo método *in situ*. HS-UG“ex situ”, HS-RG“ex situ”: membranas produzidas pelo método *ex situ*. T_{onset} , T_{endset} : temperaturas de início e fim para cada estágio.

90

Tabela 10 – Atividade antioxidante dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) puros e das membranas de celulose bacteriana esterilizadas com irradiação gama. U100-G, U50-G, U25-G, R50-G, R25-G: meios com diferentes composições dos extratos produzidos pelo método *in situ*. HS-UG“ex situ”, HS-RG“ex situ” produzidos pelo método *ex situ*.

95

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1	BIOMATERIAIS	20
2.2	CELULOSE	21
2.3	CELULOSE BACTERIANA	24
2.3.1	Propriedades da celulose bacteriana	25
2.3.2	Métodos de produção da celulose bacteriana	28
2.3.3	Fabricação de biomateriais baseados em celulose bacteriana	32
2.3.4	Modificações <i>in situ</i> e <i>ex situ</i> da celulose bacteriana	32
2.3.5	Meios de fermentação para produção da celulose bacteriana	34
2.4	ANTIOXIDANTES NATURAIS	36
2.4.1	Antocianinas	37
2.5	APLICAÇÕES DA CELULOSE BACTERIANA	41
2.6	INDÚSTRIA DE COSMÉTICOS E A CELULOSE BACTERIANA	43
2.7	ESTERILIZAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS	47
2.7.1	Esterilização por irradiação gama	49
3	METODOLOGIA	51
3.1	MICRO-ORGANISMO	52
3.2	MEIO DE MANUTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO, PRÉ-INÓCULO E INÓCULO	52
3.3	PRODUÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA COM MEIO PADRÃO HESTRIN E SCHRAMM	52
3.4	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS NATURAIS	53
3.5	MEIOS DE PRODUÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA PELO MÉTODO <i>IN SITU</i>	53
3.6	PURIFICAÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA	55
3.7	PRODUÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA PELO MÉTODO <i>EX SITU</i>	55
3.8	ESTERILIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA	56
3.8.1	Teste de eficiência da esterilização	56

3.9	CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA	56
3.9.1	Capacidade de retenção de água	57
3.9.2	Porosidade	57
3.9.3	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	57
3.9.4	Difratometria de raios-X	58
3.9.5	Análise termogravimétrica	58
3.9.6	Microscopia eletrônica de varredura	58
3.9.7	Avaliação da atividade antioxidante	59
3.9.8	Avaliação da capacidade de liberação dos extratos em água	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1	PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA PELO MÉTODO <i>IN SITU</i>	61
4.2	ADITIVAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES NATURAIS PELO MÉTODO <i>EX SITU</i> NA CELULOSE BACTERIANA	67
4.3	CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA	69
4.4	POROSIDADE	70
4.5	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	72
4.6	DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X	74
4.7	PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA PELO MÉTODO <i>IN SITU</i>	77
4.8	ADITIVAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES NATURAIS PELO MÉTODO <i>EX SITU</i> NA CELULOSE BACTERIANA	80
4.9	ESTERILIZAÇÃO DAS AMOSTRAS VIA IRRADIAÇÃO GAMA	82
4.9.1	Teste de eficiência da esterilização na inativação celular	83
4.9.2	Caracterização das membranas de celulose bacteriana após a esterilização por irradiação gama	86
4.9.2.1	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	86
4.9.2.2	Difratometria de Raios-X	87
4.9.2.3	Termogravimetria	90
4.9.2.4	Microscopia eletrônica de varredura	93

4.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	94
4.11	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE LIBERAÇÃO DOS EXTRATOS EM ÁGUA	96
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
5.1	CONCLUSÃO	100
5.2	SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS	101
	REFERÊNCIAS	102

1 INTRODUÇÃO

A celulose é considerada o polímero natural mais abundante da Terra e tem sido muito utilizada como solução sustentável, visto que se trata de um material biodegradável e biocompatível. Este material, pode ser empregado como uma opção na substituição dos polímeros convencionais derivados do petróleo, que por sua vez, ainda têm extensa aplicação industrial (KARGARZADEH *et al.*, 2017). Nesse sentido, a celulose surge como alternativa para o desenvolvimento de polímeros oriundos de fontes renováveis e biodegradáveis. Isso resulta em uma redução da atual dependência mundial em matérias-primas oriundas de recursos fósseis que são limitados e ocasionam grande impacto ambiental (SHAGHALEH; XU; WANG, 2018).

A maior parte da celulose produzida é de origem vegetal, obtida principalmente da madeira e do algodão, onde a demanda crescente por seus produtos acaba contribuindo com o desmatamento (COSTA *et al.*, 2017). Contudo, ela também pode ser obtida com a utilização de síntese química, da enzimática *in vitro* ou pela biossíntese realizada por micro-organismos, como: algas, fungos e bactérias (CHEN *et al.*, 2022).

A celulose, denominada de celulose bacteriana ou biocelulose (CB), é um produto extracelular oriundo da fermentação oxidativa realizada por alguns tipos de bactérias (GALDINO *et al.*, 2022). Sua fórmula molecular $(C_6H_{10}O_5)_n$ é a mesma encontrada na celulose vegetal (CV). Ambas são classificadas como polissacarídeos compostos por ligações β -1,4-glicosídicas e ricas em grupos hidroxilas ao longo de suas estruturas. No entanto, elas apresentam características físico-químicas e mecânicas distintas (PARTE *et al.*, 2020).

A CB é reconhecida por apresentar maior grau de pureza quando comparada a CV, já que não apresenta em sua constituição lignina, hemicelulose e outros produtos biogênicos encontrados na parede celular das plantas. Além disso, a CB possui alta resistência mecânica, cristalinidade, porosidade, atoxicidade, maior capacidade de retenção da água e elevadas biocompatibilidade e biodegradabilidade (KHAN *et al.*, 2022). Essa superioridade de propriedades é justificada por sua estrutura nanofibrilar em comparação com a estrutura microfibrilar encontrada na CV (GALLEGOS, *et al.*, 2016; INOUE *et al.*, 2020).

Nos últimos anos muitas pesquisas têm sido realizadas com a utilização da CB para a obtenção de novos biomateriais, como no desenvolvimento de curativos, enxertos, dispositivos biomédicos, embalagens, tecidos, produtos cosméticos (CHEN *et al.*, 2022; KHAN *et al.*, 2022; CHOI *et al.*, 2022). O conjunto de propriedades que compõem a CB, juntamente com a possibilidade de modificações no processo produtivo, auxiliam na obtenção de um material multifuncional e altamente versátil para aplicação em diversos ramos de pesquisa, como nas indústrias de alimentos, papel, embalagens, têxtil, tratamento de água, produção de dispositivos eletrônicos (WU *et al.*, 2021). A CB também tem aplicações bem difundidas na medicina e nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (PHRUKSAPHITHAK; KAEWNUN; O-THONG, 2019).

O desenvolvimento de biopolímeros modificados baseados em CB desperta um grande interesse dos pesquisadores, pela possibilidade de introduzir novas propriedades ou melhorar as já existentes. Dentre os diferentes métodos de modificações, destacam-se os processos *in situ*, também chamados de processos biossintéticos, com modificações durante a produção e os *ex situ* com modificações apenas após a CB já ter sido formada (STUMPF *et al.*, 2018).

Apesar de todo o seu potencial de aplicações, a produção de celulose bacteriana em larga escala ainda é um processo de alto custo, sobretudo devido aos meios tradicionalmente utilizados para a sua síntese. Os meios de cultura são responsáveis por cerca de 30% do custo total de produção, o que limita sua comercialização (FERNANDES *et al.*, 2020). Diante desse cenário, existe atualmente um grande interesse no desenvolvimento de meios que apresentem uma melhor relação custo-benefício, a partir da utilização de subprodutos de baixo valor agregado. Esses podem ser oriundos de resíduos industriais e/ou agrícolas (XU *et al.*, 2022), além de sumos de frutas (AMORIM *et al.*, 2019), apresentando como vantagens o baixo custo e o desenvolvimento de uma produção sustentável (REVIN, *et al.*, 2018).

A celulose bacteriana também se destaca como uma excelente candidata para utilização na forma de suporte, funcionando como um veículo para liberação de compostos ativos. Ela possui estrutura porosa e boa permeabilidade, tornando-a interessante para sua aplicação em processos de adsorção e dessorção de substâncias (MORAIS *et al.*, 2019).

Algumas das substâncias ativas de grande interesse são aquelas oriundas de compostos naturais e que têm propriedades antioxidantes. Essas se caracterizam por

possuir a capacidade de atuar na eliminação dos radicais livres produzidos por vários processos biológicos nos seres humanos, com ações anti-inflamatórias, antibacteriana, antiviral, antitumoral, antienvhecimento (BAIANO; NOBILE, 2016; XU *et al.*, 2017). Dentre os compostos com propriedades antioxidantes, pode-se destacar a utilização de antocianinas em diferentes aplicações biológicas, como em alimentos (TAN *et al.*, 2022), na obtenção de medicamentos (NDIAYE *et al.*, 2011), além do seu emprego na formulação de produtos cosméticos (NUNES *et al.*, 2017).

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo geral produzir um biopolímero de celulose bacteriana aditivada com antioxidantes naturais e avaliar a capacidade de liberação dos extratos em água, para obtenção de um novo biomaterial de alto valor agregado com possíveis aplicações em cosméticos. Tendo como objetivos específicos:

- ✓ Produzir o biopolímero de celulose bacteriana utilizando a bactéria *Komagataeibacter hansenii* cultivada em meio tradicional, Hestrin-Schramm (HS) e em meios HS modificados com a utilização de fontes de carbono de menor custo;
- ✓ Produzir extratos naturais ricos em substâncias com propriedades antioxidantes, a partir do uso de subprodutos, como a casca da uva e o repolho roxo;
- ✓ Realizar a aditivação dos antioxidantes naturais pelos métodos *in situ* e *ex situ*;
- ✓ Avaliar a eficiência da esterilização por irradiação gama das celulosas produzidas e investigar possíveis influências que o uso da esterilização pode ocasionar nas características físico-químicas das membranas de celulose bacterianas produzidas;
- ✓ Determinar a capacidade de retenção de água e a porosidade dos biopolímeros obtidos com os diferentes meios;
- ✓ Caracterizar os biopolímeros obtidos antes e após serem submetidos ao processo de esterilização por irradiação gama através das técnicas de: espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR); difratometria de raios-X (DRX), análise termogravimétrica (TGA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante dos biopolímeros e dos extratos puros pelo método de sequestro de radicais livres;

- ✓ Investigar o potencial da celulose bacteriana como suporte para a administração de substâncias antioxidantes naturais em diferentes formulações de aditivos;
- ✓ Avaliar a liberação dos compostos antioxidantes adicionados nas membranas produzidas em meio aquoso.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A biotecnologia é um ramo da ciência responsável pelo desenvolvimento e oferta de novos biomateriais no mercado. Dentre os biomateriais de grande interesse, a celulose bacteriana assume um papel de destaque, devido propriedades únicas, como elevada resistência mecânica, porosidade, biocompatibilidade. Por este motivo, é um biomaterial ideal para diversas aplicações (COSTA *et al.*, 2019). No entanto, seu custo de produção ainda é elevado, o que limita sua comercialização em larga escala, devido sobretudo aos meios de cultura tradicionalmente empregados no processo fermentativo. Por este motivo, tem sido cada vez mais estudadas e utilizadas alternativas fontes de carbono e nutrientes que apresentam um menor custo, ao mesmo tempo que levam a formação de novos materiais bioativos (GAO *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2022).

2.1 BIOMATERIAIS

Os biomateriais são geralmente definidos como uma classe de substâncias naturais, sintéticas ou uma combinação de ambas, destinadas a interagir com qualquer tecido ou órgão, sem que haja a ocorrência de efeitos nocivos. Tal classe surgiu com o intuito de melhorar ou até mesmo substituir sistemas vivos, agindo com o mínimo de intervenção das funções normais do corpo (GALLETTI, BORETOS, 1983; ELIAZ, 2019; SHARIP, ARIFFIN, 2019).

Vários tipos de compostos podem ser utilizados como biomateriais e sua classificação e emprego normalmente decorrem do conjunto de suas propriedades. Dentre os compostos mais comuns, podem-se destacar os metais e as ligas metálicas, os polímeros, os biopolímeros, os materiais cerâmicos e os compósitos. Os biomateriais produzidos, antes de serem comercializados, precisam apresentar propriedades físicas, químicas, mecânicas e biológicas específicas, a depender do uso (BALAJI *et al.*, 2015).

É crescente o interesse pelo uso de biomateriais, sobretudo na área da saúde. Isto pode ser justificado pela disponibilidade de vários compostos com propriedades biológicas adequadas. Elas estão associadas a aspectos de biocompatibilidade, biodegradabilidade e natureza renovável (SHARMA; BHARDWAJ, 2019). Dentre essas propriedades, a biocompatibilidade é reconhecida como um dos parâmetros

essenciais para avaliar a eficiência de um biomaterial, visto que ela corresponde a propriedade associada à sua capacidade de não causar nenhum tipo de resposta com características inflamatória, alérgica ou tóxica aos indivíduos (ELIAZ, 2019; HAN *et al.*, 2022).

Nos últimos anos, os avanços no campo dos biomateriais com aplicações biomédicas despertaram o interesse de pesquisadores e indústrias na busca pelo desenvolvimento de novos materiais mais seguros e ecológicos. Dentre esses materiais, pode-se destacar os polímeros com potencial para utilização de vários polissacarídeos, como, por exemplo, a celulose (INOUE *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2022). Essa vem ocupando um papel de destaque devido a uma junção de propriedades que impulsionam seu uso extensivo no ramo biomédico, como sua ampla capacidade de absorção de líquidos, atoxicidade e biocompatibilidade (KHAN *et al.*, 2022).

2.2 CELULOSE

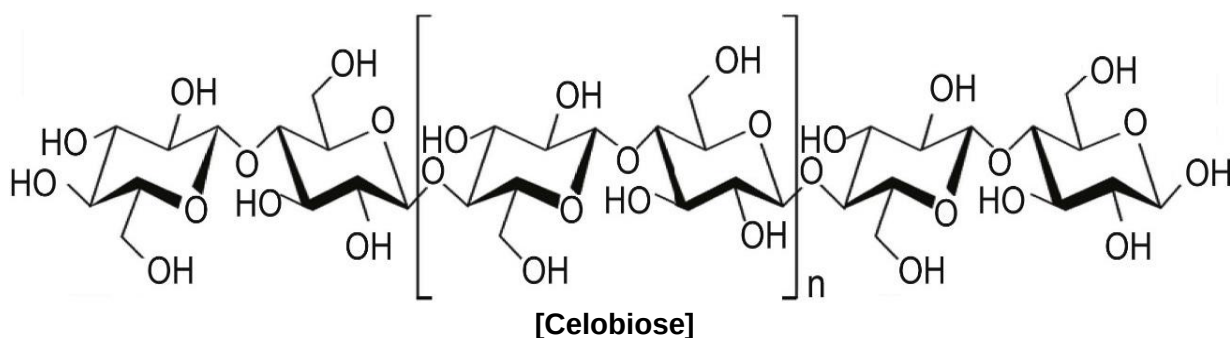
O termo celulose foi utilizado pela primeira vez no ano de 1838 pelo químico francês Anselme Payen (KHALIL *et al.*, 2017; PENG *et al.*, 2020). Desde então, a celulose passou a ser reconhecida como um material inovador, sendo amplamente utilizada em uma gama de aplicações biotecnológicas, devido a sua abundância e excelentes propriedades, como elevada resistência à tração, alta capacidade de absorção de água, biocompatibilidade e não toxicidade (TROVATTI *et al.*, 2012; MISHRA, SABU, TIWARI, 2018; GALDINO JÚNIOR. *et al.*, 2019).

A celulose consiste em um biopolímero homogêneo, insolúvel em água e considerado como o de maior abundância na natureza. Trata-se de um dos principais constituintes das plantas, atuando como um importante componente das paredes celulares, sendo tradicionalmente extraída de diferentes tipos de vegetais (SILVA *et al.*, 2022). No entanto, também pode ser encontrada em algas, ou sintetizada por meio de micro-organismos, como os fungos e as bactérias (VIANNA JÚNIOR; COSTA; GIANNINI, 2016; SHAGHALEH; XU; WANG, 2018).

Classificada como um carboidrato estrutural, a celulose é constituída basicamente por carbono, hidrogênio e oxigênio, com fórmula molecular geral $(C_6H_{10}O_5)_n$. Suas moléculas são formadas por cadeias lineares longas e não ramificadas de β -D-glicose, unidas por ligações do tipo β -1,4-glicosídicas. O

abundante número de grupos hidroxilas (O-H) presentes em sua estrutura resultam na formação de ligações de hidrogênio dos tipos intra e intermoleculares, as quais são responsáveis pela forte associação linear do polímero de celulose. Essa conformação estrutural tem como consequência a formação de fibras em escalas nano e micrométricas que estão dispostas em uma rede tridimensional. O agrupamento dessas fibras, por sua vez, forma fitas de celulose entrelaçadas aleatoriamente que são ligadas por uma grande quantidade de ligações de hidrogênio, resultando em um polímero rígido, insolúvel em água e, na maioria dos solventes orgânicos (KLEMM, *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2015). Na Figura 1, é ilustrado um esquema da estrutura química da molécula de celulose.

Figura 1 – Estrutura química da celulose.



Fonte: adaptado de Peng *et al.* (2020).

Conforme destacado na Figura 1, é possível observar que a estrutura química da celulose apresenta uma unidade de repetição fundamental, que é um dímero de glicose, denominado celobiose. Além disso, o grande número de grupos hidroxilas em destaque, que estão presentes nos anéis de glicose, facilita a realização de processos de modificações químicas. Esses processos podem resultar na obtenção de vários derivados de celulose com diferentes propriedades (SHAGHALEH; XU; WANG, 2018).

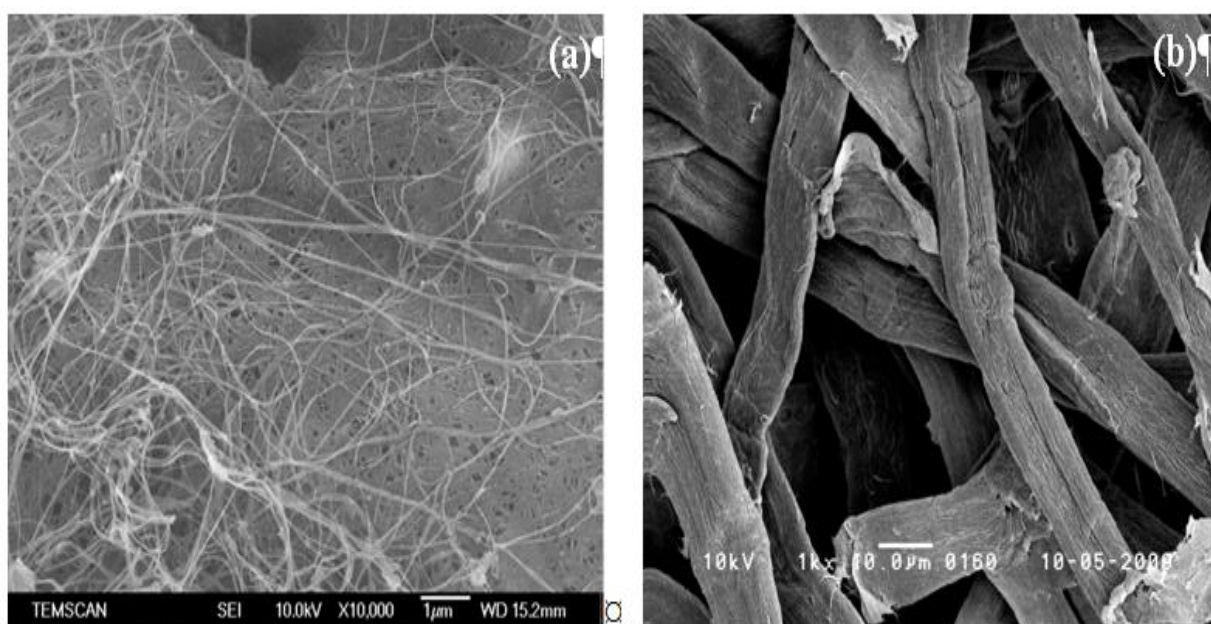
Do ponto de vista da demanda industrial, a celulose está sempre em ascensão. Tal fato é justificado principalmente por sua abundância, baixo custo e aplicabilidade significativa em diferentes ramos. O lugar de destaque na comercialização é ocupado pela celulose extraída das plantas, a qual recebe o nome de celulose vegetal (CV). Ela consiste em um composto orgânico obtido da biomassa e trata-se do principal constituinte da parede celular das plantas. Estima-se que, no mundo, a cada ano, seja sintetizada naturalmente algo em torno de 100-150 bilhões de toneladas de CV (SINGHANIA *et al.*, 2022). Materiais como madeira e algodão são considerados as

maiores fontes comerciais para sua obtenção. Além delas várias plantas, como linho e cânhamo, também são reconhecidas por apresentar uma grande quantidade de celulose (MALIK; JAIN; YADAV, 2017; SWINGLER *et al.*, 2021).

Com o aumento da demanda mundial por seus derivados, houve também um elevado consumo de madeira, contribuindo para o desmatamento e tornando-se um fator preocupante em relação à questão ambiental. Além disso, a CV produzida consiste em um composto associado a outros biopolímeros, como lignina, hemiceluloses, pectina e cera, sendo necessário purificá-la antes de sua utilização (PENG *et al.*, 2020). Embora as plantas ainda sejam as maiores fontes de obtenção da celulose, é possível a sua aquisição de forma alternativa, a partir, por exemplo, de vários tipos de bactérias, originando a chamada celulose bacteriana (CB) (COSTA *et al.*, 2017).

As CV e CB, apesar de serem biopolímeros de origem natural e possuírem fórmula química idênticas, apresentam diferenças significativas em relação às suas propriedades químicas, físicas e mecânicas. Essas mudanças podem ser justificadas pela configuração espacial de sua rede fibrosa (WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019). Na Figura 2 são apresentadas as diferentes estruturas fibrilares dos dois tipos de celulose (CB e CV), a partir de imagens obtidas por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Figura 2 – Micrografias das fibras de celulose bacteriana (a) e celulose vegetal (b).



Fonte: adaptado de Donini *et al.* (2010).

Donini e colaboradores (2010) demonstraram através das imagens dispostas na Figura 2, as diferenças de dimensões encontradas nas fibras que compõem a estrutura dos dois tipos de celulose. A CB (Figura 2(a)) possui uma estrutura fibrilar em escala nanométrica e micrométrica, em contrapartida a CV (Figura 2(b)) possui uma estrutura de microfibras cuja dimensão é cerca de cem vezes maior do que as microfibrilas encontradas na CB. A diferença estrutural entre a CV e a CB pode ser verificada também em relação ao seu aspecto visual, enquanto a CV possui forma fibrosa, a CB assemelha-se a um filme de hidrogel com uma grande massa espessa que se apresenta com uma coloração branca ou incolor (GROMOVYKH *et al.*, 2017; PICHETH *et al.*, 2017).

2.3 CELULOSE BACTERIANA

Foi no ano de 1886 que ocorreu o primeiro relato de síntese da celulose produzida por bactérias na forma de um produto metabólico extracelular (PARTE *et al.*, 2020). O pesquisador Adrian J. Brown, enquanto estudava o processo de fermentações acéticas, observou a formação de uma película gelatinosa na superfície do meio de cultura líquido analisado, o qual consistia em um caldo de fermentação do vinagre, na presença de oxigênio e de glicose como fonte de carbono. Através da análise do filme formado, observou-se uma estrutura química similar a encontrada na celulose de origem vegetal, por este motivo tal película foi denominada de celulose bacteriana (BROWN, 1886). O micro-organismo utilizado no processo foi o *Acetobacter xylinum*, que é pertencente ao gênero *Komagataeibacter xylinus* (BARUD *et al.*, 2016).

A CB pode ser produzida a partir de várias espécies de bactérias, seja na forma de consórcios ou isoladamente. Como exemplos, tem-se as pertencentes aos gêneros *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Komagataeibacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Dickeya* e *Rhodobacter*. As principais produtoras são as do gênero *Komagataeibacter* (anteriormente conhecida como *Gluconacetobacter*), como, por exemplo, os tipos *K. xylinus* e *K. hansenii* (YAMADA *et al.*, 2012; SINGHANIA *et al.*, 2022). Por este motivo, são muito utilizadas em várias pesquisas, sendo justificado pelo maior rendimento e pureza, pela facilidade de manutenção, além da capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono e de nitrogênio (AZEREDO *et al.*, 2019; ULLAH; SANTOS; KHAN, 2016).

As bactérias pertencentes ao gênero *Komagataeibacter* são GRAM-negativas, tolerantes a condições ácidas, estritamente aeróbias e não patogênicas, sendo comumente encontradas em frutas cultivadas naturalmente e em produtos de frutas ácidas, seus resíduos e sucos (KLEMM *et al.*, 2005). O processo de biossíntese da CB é bastante complexo e envolve uma série de reações desenvolvidas por quatro enzimas distintas para que seja possível a síntese das suas fibras no citoplasma das células bacterianas (SINGHANIA *et al.*, 2022). Após o processo fermentativo a CB formada pode ser encontrada em quatro formas alomórficas (I-IV), das quais as classificadas como I e II são as mais amplamente estudadas. O mecanismo de produção extracelular da CB ainda não é completamente compreendido, mas o seu papel no processo de crescimento das células já é amplamente aceito (SWINGLER *et al.*, 2021).

A formação da celulose pelas bactérias desempenha um papel fisiológico fundamental no ciclo de vida desses micro-organismos. As células que sintetizam a celulose são imobilizadas em uma rede polimérica e a celulose formada funciona como um mecanismo de flotação. Através dessa rede, permite-se que as bactérias permaneçam apoiadas na superfície da interface ar-líquido, aumentando a disponibilidade de oxigênio e promovendo uma melhora no transporte de nutrientes pelo mecanismo de difusão, facilitando assim o seu processo de crescimento (MEDEIROS *et al.*, 2021). Além disso, o polímero formado também funciona como um mecanismo físico sob a forma de uma barreira protetora contra a radiação ultravioleta (UV) e íons metálicos. Ademais, devido a sua característica higroscópica, ela também é capaz de permitir a retenção da umidade na película, evitando assim o processo de secagem do substrato (GROMOVYKH *et al.*, 2017). Diante do exposto é imprescindível conhecer bem as propriedades desse tipo de celulose para que a sua aplicação se dê de forma eficiente.

2.3.1 Propriedades da celulose bacteriana

A CB é um composto que apresenta propriedades físicas superiores em relação a CV, por exemplo, maior flexibilidade, elasticidade e resistência à tração. Isso se deve à sua estrutura 3D única, constituída por conjuntos de 10 a 15 cadeias poliméricas que estão organizadas em redes agregadas e estendidas. Essas redes resultam em nanofibras com dimensões 100 vezes menores que as encontradas nas celulosas de

origem vegetal. O agrupamento dessas fibras forma fitas de celulose entrelaçadas de forma aleatória, originando uma matriz densa que se mantém unida por uma grande quantidade de ligações de hidrogênio. A presença dessas ligações é também a responsável pela formação de cavidades em sua estrutura e pela presença de carga iônica na superfície, a qual permite a incorporação de materiais e a consequente obtenção de novos produtos (SWINGLER *et al.*, 2021).

Com relação as propriedades químicas, a CB possui a mesma estrutura encontrada na CV. No entanto, a celulose bacteriana é considerada um biopolímero com elevado grau de pureza por ser produzida livre de subprodutos, como hemicelulose e lignina (PENG *et al.*, 2020). Além disso, ela reúne um conjunto de características que permitem sua elevada performance biológica (CHEN *et al.*, 2022). Esse conjunto de propriedades e vantagens estruturais da CB estão descritos na Figura 3.

Figura 3 – Vantagens estruturais e propriedades da celulose bacteriana.

PROPRIEDADES FÍSICAS	CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS	PERFORMANCE BIOLÓGICA
• Flexibilidade • Alta porosidade • Formas variadas • Alta capacidade de retenção de água	• Modificações • Moldável • Alta pureza • Maior cristalinidade • Alto grau de polimerização	• Não-tóxico • Biocompatível • Biodegradável • Excelente afinidade biológica • Alta resistência à degradação

Fonte: adaptado de Chen *et al.* (2022).

De acordo com as características destacadas na Figura 3, é possível perceber que a CB é um material altamente versátil e que pode ser utilizada em diferentes tipos de aplicações. Dentre as propriedades que a difere da CV merecem destaque seu elevado grau de pureza, permeabilidade (com conteúdo de água correspondente a cerca de 99% em peso de sua massa total), baixa densidade, maior cristalinidade, estabilidade e alta resistência mecânica, grande área superficial, alto grau de

polimerização, estrutura fibrilar em escala nanométrica (GAO *et al.*, 2019; WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019). Na Tabela 1 são mostrados os dados comparativos de algumas das principais propriedades da CB e CV.

Tabela 1 – Principais propriedades da celulose bacteriana versus a celulose vegetal.

Propriedades	Celulose bacteriana (CB)	Celulose vegetal (CV)
Resistência à tração (MPa)	20 – 300	25 - 200
Módulo de Young (MPa)	camada: 20.000 única fibra:130.000	25 - 0,170
Capacidade de armazenamento de água (%)	> 95	25 - 35
Tamanho das fibras (nm)	20 – 100	escala (µm)
Cristalinidade (%)	74 – 96	40 - 85
Hidrofilicidade relativa (%)	40 – 50	20 – 30
Pureza (%)	> 99	< 80
Grau de polimerização	14000 – 16000	300 - 10000
Porosidade (%)	> 85	< 75
Área superficial (m ² .g ⁻¹)	> 150	< 10

Fonte: adaptado de Wang; Tavakoli; Tang (2019).

A partir dos dados apresentados na Tabela 1, é possível observar diferenças significativas, tanto no que diz respeito às propriedades, como as características micro e macromoleculares entre as celulosas vegetal e bacteriana. As várias vantagens estruturais destacadas conferem a CB um aspecto multifuncional, que a torna muito superior em relação a capacidade de ser submetida a procedimentos de modificações químicas durante ou após o processo de biossíntese (GAO *et al.*, 2019).

Nesse sentido, o elevado grau de polimerização apresentado pela CB permite inclusive sua inserção no processo de obtenção de materiais compósitos. Além disso, seu conjunto de características possibilita investigações para sua utilização em

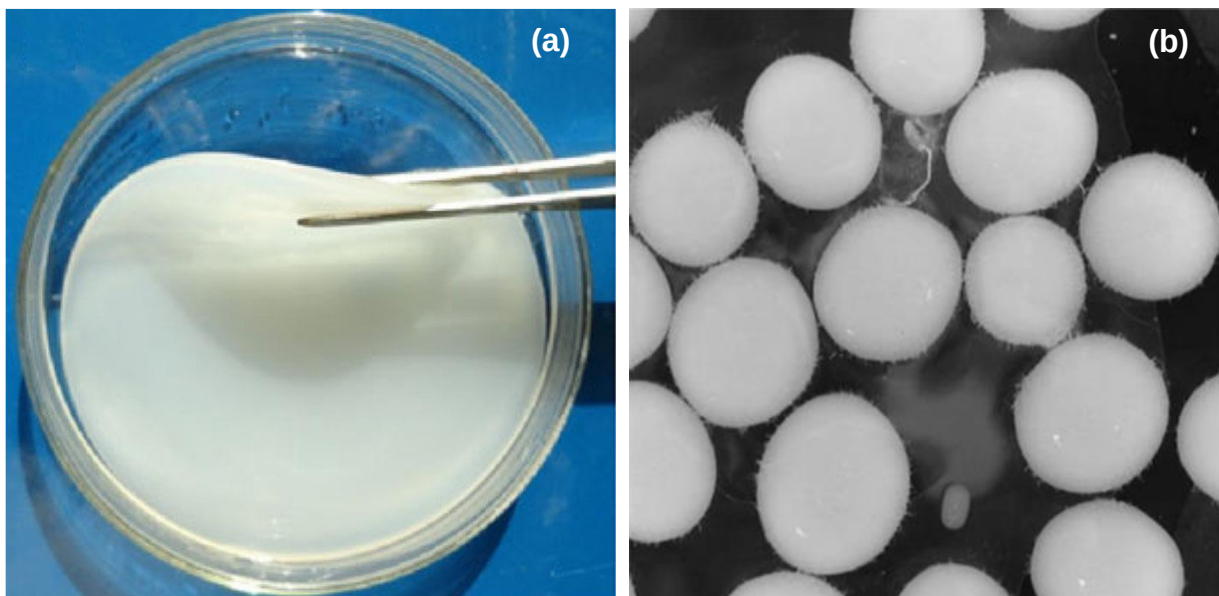
diferentes setores que compreendem desde a biotecnologia industrial até a área biomédica (SILVA *et al.*, 2022). Por estes motivos, é grande o interesse no estudo e desenvolvimento de diferentes métodos de produção da CB a depender da aplicação a que ela vai ser destinada.

2.3.2 Métodos de produção da celulose bacteriana

Independentemente do método empregado, o processo de biossíntese da CB ocorre em várias etapas. Contudo, para uma melhor compreensão, essas podem ser agrupadas em basicamente duas: (1) a polimerização com a formação intracelular das cadeias de β -1,4-glucano; (2) a montagem e cristalização das cadeias de celulose excretadas do citoplasma da célula pela membrana plasmática para o ambiente externo, sob a forma de fibrilas. Na segunda etapa, as fibrilas, depois de formadas, se agregam por meio do processo de cristalização, levando a formação da membrana. Tal etapa é definida como limitante do processo de biossíntese (AZEREDO *et al.*, 2019; RENIATI; HRYMAK; MARGARITIS, 2017).

Os métodos utilizados para a produção de CB incluem cultura estática, agitada ou o uso de biorreatores, cuja seleção depende da aplicação final. Isso porque cada um deles resulta em membranas com aspectos físicos, características morfológicas (Figura 4) e mecânicas distintas. Um outro fator primordial que necessita ser considerado durante o processo de produção, se refere às condições estabelecidas no ambiente de cultura, que incluem parâmetros como pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio, estirpe da bactéria utilizada, composição do meio de cultura e tempo de fermentação (WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019).

Figura 4 – Celulose bacteriana produzida pelo método de cultura: estática (a) e agitada (b).



Fonte: adaptado de Campano *et al.* (2015).

Campano *et al.* (2015) demonstraram as características morfológicas da CB obtida pelo método de cultura estática (Figura 4(a)), que se trata de uma película gelatinosa, e, pelo de cultura agitada (Figura 4(b)) que resulta em CB com aspecto semelhante a esferas ou pellets irregulares. No caso da cultura agitada, essa condição estrutural está diretamente associada à velocidade de rotação empregada no processo.

O método mais tradicional e amplamente utilizado em escala laboratorial para o cultivo da CB é o de cultura estática. Nela a celulose é produzida sob a forma de uma película gelatinosa na interface ar-líquido com espessura que aumenta ao longo do tempo de cultivo. A cultura estática trata-se de uma técnica simples, com a obtenção de membranas de excelente qualidade com relação às suas propriedades características, como alto grau de polimerização e propriedades mecânicas superiores. No entanto, ela geralmente requer um tempo elevado de cultivo (incubação em torno de 7-20 dias), além de grande área superficial, resultando em baixa taxa de produção, alto custo e distribuição desigual de nutrientes, oxigênio e células. A junção desses fatores pode resultar na produção de um material com espessura não uniforme (HSIEH *et al.*, 2016; MARESTONI *et al.*, 2020).

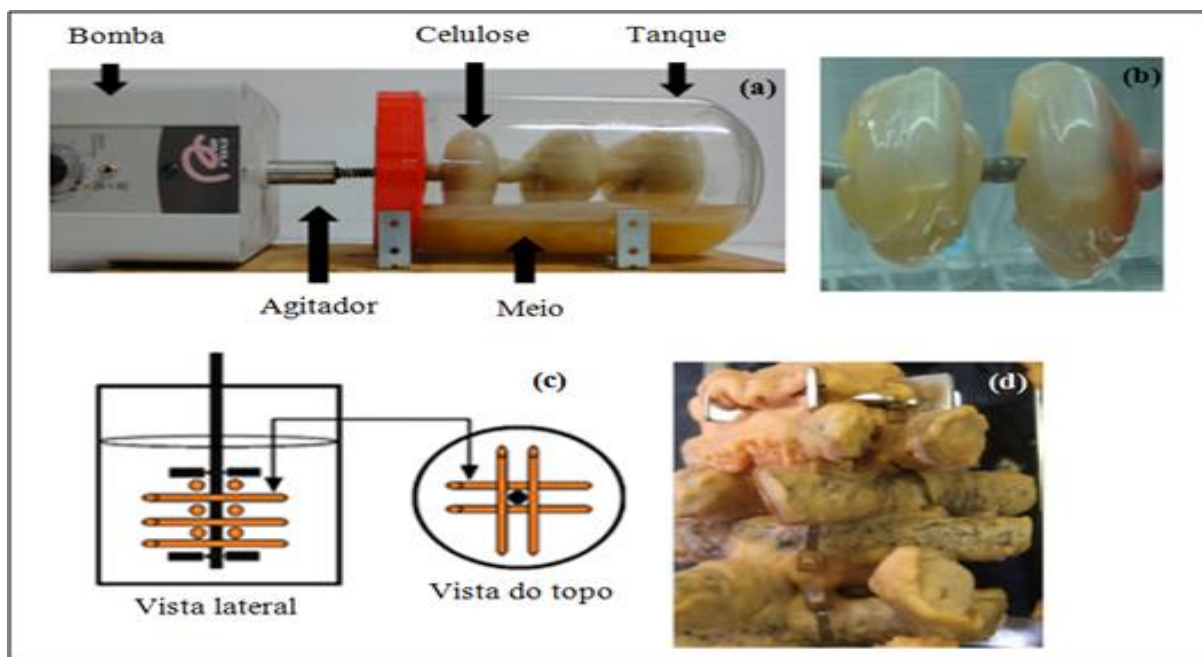
Como um método alternativo para melhorar os problemas de rendimento da cultura estática é sugerido a utilização de agitação. Esta proporciona melhor transferência de oxigênio e de nutrientes aos micro-organismos, além de reduzir o

tempo de produção (≈ 5 dias), resultando em um aumento da produtividade (BLANCO *et al.*, 2018). Apesar disso, é importante salientar que existem relatos de ocorrência de instabilidade genética, com a formação de células mutantes que gradativamente perdem sua produtividade, bem como o surgimento de células não formadoras de celulose (MARESTONI *et al.*, 2020). Outro aspecto importante se refere à morfologia obtida, que é muito diferente da alcançada pela cultura estática. Normalmente, é observado um baixo grau de polimerização, baixo índice de cristalinidade e propriedades mecânicas inferiores (HSIEH *et al.*, 2016; WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019).

Outro método que também pode ser utilizado para a produção de CB faz uso de biorreatores. Tal processo surgiu como uma tentativa de aumentar a taxa de produção através de um cultivo contínuo com elevadas taxas de transferência de oxigênio e de nutrientes. Esses biorreatores se caracterizam pela forma com que operam, como por exemplo, através do uso de discos rotativos, suporte de biofilmes ou sob ar enriquecido com oxigênio (WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019).

Uma grande desvantagem da utilização de biorreatores para a produção de CB está relacionada à redução de suas propriedades mecânicas e a adesão da membrana em paredes ou outras estruturas internas do reator, que dificulta o processo de homogeneização (CAMPANO *et al.*, 2015). Na Figura 5 é ilustrado um esquema de dois exemplos de reatores utilizados para a produção de CB.

Figura 5 – (a) Biorreator do tipo RBF (Fermentador biológico rotativo), (b) Celulose bacteriana aderida aos discos rotativos do reator, (c) Suporte de plástico composto em um biorreator (PCs), (d) Celulose bacteriana fixada no suporte.



Fonte: adaptado de Campano *et al.* (2015).

O biorreator denominado de fermentador biológico rotativo com discos compostos de plástico (RBF), conforme mostrado na Figura 5 (a, b), é um dos mais utilizados. Ele opera no modo semicontínuo, com discos dispostos de forma que metade esteja em contato com o meio e a outra metade exposta à atmosfera. Seu principal objetivo é obter uma CB homogênea, aumentando o rendimento e reduzindo o custo. Em contrapartida, a CB produzida normalmente possui características mecânicas e cristalinidade inferiores quando comparada com as obtidas pelo método estático. Além disso, o uso de agitação facilita o surgimento de células mutantes que reduzem a produção. Outro exemplo de reator também empregado é o de biofilme agitado, Figura 5 (c, d), no qual é realizada a adição de suportes de plástico (PC). Essa composição resulta em uma alta densidade de biomassa, promovendo a imobilização celular de forma natural. Como resultado, a CB obtida com o uso de reatores apresenta características similares aquela produzida pelo método estático, com exceção de uma menor capacidade de retenção da água (CAMPANO *et al.*, 2015; WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019).

Todos os métodos de produção da CB utilizados ainda possuem altos custos operacionais, devido à falta de processos fermentativos com sistemas eficientes que levem a uma maior produção em um menor tempo de cultivo. Por este motivo, a sua

utilização a nível comercial ainda é um grande desafio para os pesquisadores (BEKATOROU *et al.*, 2019; ABDELRAOF; HASANIN; EL-SAIED, 2019; KHAN; KADAM; DUTT, 2020). Como uma alternativa de melhoria de desempenho e/ou redução do custo de produção, são muito discutidas as modificações no processo de obtenção da CB para a fabricação de novos biomateriais.

2.3.3 Fabricação de biomateriais baseados em celulose bacteriana

A obtenção de novos biomateriais baseados em CB despertou grande interesse de muitos estudos realizados nos mais diferentes campos de aplicações. Normalmente, o intuito é a adição ou aprimoramento das propriedades da CB, o que permite sua utilização de forma direta como uma matriz para carregamento de outros compostos ou como um reforço para a obtenção de diferentes tipos de nanocompósitos (CHEN *et al.*, 2022).

Diferentes estratégias podem ser utilizadas para a modificação da CB. De uma forma geral, esse processo envolve a utilização de métodos *in situ* e *ex situ* (STUMPF *et al.*, 2018). No método *in situ* a modificação ocorre à medida que a CB vai sendo produzida. Em contrapartida, no método *ex situ* a modificação é realizada apenas após sua produção (SILVA *et al.*, 2022).

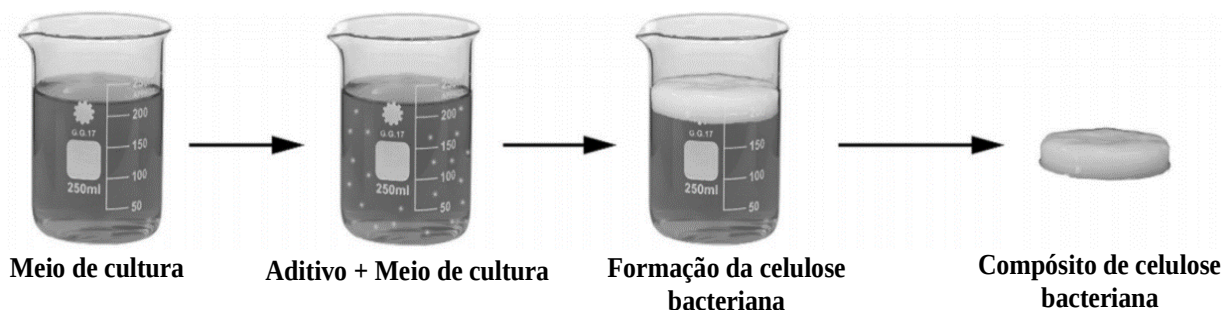
2.3.4 Modificações *in situ* e *ex situ* da celulose bacteriana

Diferentes métodos de modificação podem ser utilizados com o intuito de melhorar características específicas da CB, resultando na obtenção de novos biomateriais à base de celulose. Essa melhora amplia ainda mais suas possíveis aplicações em múltiplas áreas (WU *et al.*, 2021).

Os métodos de obtenção de novos biomateriais baseados em CB compreendem basicamente três grupos que incluem os físicos (como misturas, dopagens e revestimento da estrutura), os químicos (como a adição de aditivos) e os biossintéticos (como a engenharia genética e as modificações *in situ*). Com relação as modificações *in situ* e *ex situ*, a grande distinção entre elas se dá no momento que ocorrem. Enquanto na *in situ* as mudanças são realizadas durante a formação da película de CB, ou seja, ao mesmo tempo em que ocorre o processo fermentativo. Na *ex situ* tais modificações são realizadas após sua formação (CHEN *et al.*, 2022;

CAZÓN, VÁZQUEZ, 2021). Nas Figuras 6 e 7 são mostrados esquemas dos processos, em escala laboratorial, *in situ* e *ex situ*, respectivamente.

Figura 6 – Esquema da produção *in situ* da celulose bacteriana.



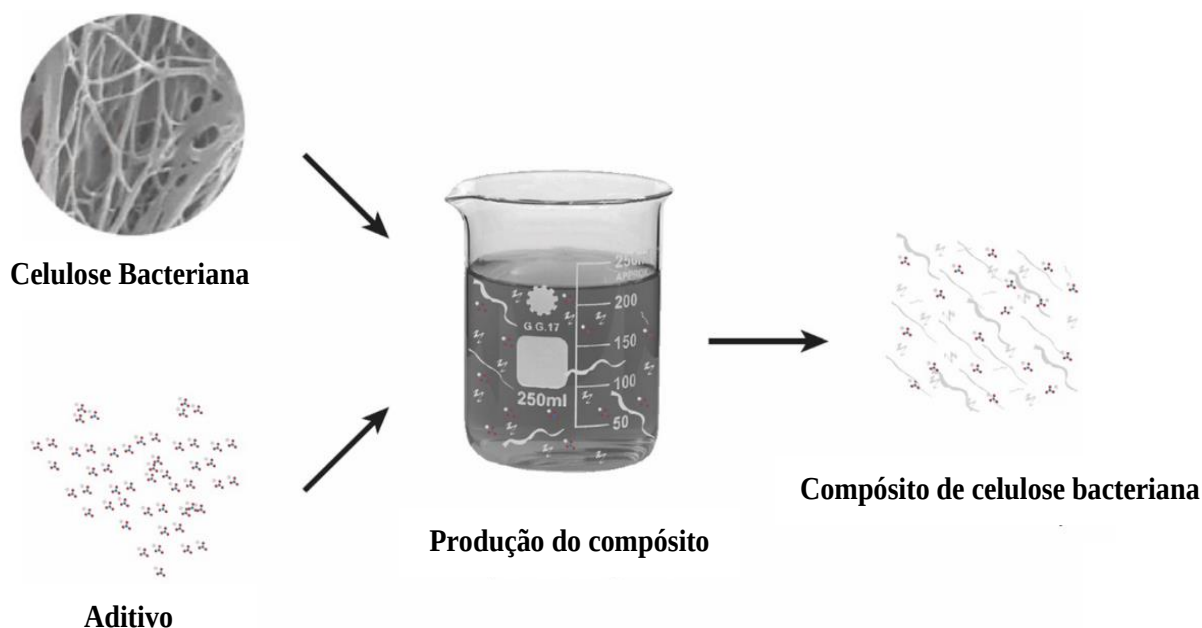
Fonte: adaptado de Amorim *et al.* (2020).

Pelo esquema do processo *in situ* mostrado na Figura 6, percebe-se que este caracteriza-se por variações das condições de cultivo, ou seja, ainda durante o processo fermentativo. Nele ocorre o emprego de aditivos com propriedades de interesse e/ou alteração da fonte de carbono utilizada. Tal processo pode resultar na formação de blendas poliméricas ou de compósitos de CB que podem apresentar mudanças físico-químicas, mecânicas e/ou morfológicas (AMORIM *et al.*, 2020; STUMPF *et al.*, 2018).

Durante a modificação *in situ*, o aditivo utilizado não é necessariamente essencial para o crescimento da bactéria e pode ser capaz de alterar a estrutura da rede dos filmes formados. Além disso, requer um maior cuidado na composição e concentração dos componentes utilizados, pois eles não devem limitar ou inibir o crescimento celular (CAZÓN, VÁZQUEZ, 2021).

Diferentes estudos também são realizados com o intuito principal da utilização da técnica de modificação *in situ* para reduzir o custo de produção da CB. Neles são relatados a utilização de meios de fermentação alternativos com custo inferior ao meio tradicionalmente empregado, além de aliar novas propriedades às membranas de CB formadas (XU *et al.*, 2022; WU *et al.*, 2021; COSTA *et al.*, 2017).

Figura 7 – Esquema da produção *ex situ* da celulose bacteriana.



Fonte: adaptado de Amorim *et al.* (2020).

Na Figura 7 foi mostrado um esquema do processo *ex situ* em que se pode observar que a etapa de modificação ocorre por meio da impregnação com diferentes aditivos após a biossíntese da CB, geralmente depois da realização de algum processo de purificação (FERNANDES *et al.*, 2020). Neste caso, a impregnação pode ser realizada de forma química com reações de copolimerização ou de reticulação, por exemplo, ou ainda, de forma física, como por exemplo com a absorção. Neste processo, a estrutura da CB praticamente não sofre nenhuma alteração, pois o que normalmente ocorre é uma interação entre a substância usada como aditivo e a matriz polimérica (STUMPF *et al.*, 2018).

Além dos processos de modificação, os meios de fermentação que podem ser utilizados para produção da CB são objetos de interesse. Tal destaque tem o intuito de otimizar ainda mais o processo, bem como de desenvolver matrizes com diferentes características (FERNANDES *et al.*, 2020).

2.3.5 Meios de fermentação para produção da celulose bacteriana

Vários são os fatores que podem afetar o rendimento das membranas de CB, como: tipo de micro-organismo e as condições da cepa, pH, temperatura, tipo de cultivo, composição do meio de cultura (SILVA *et al.*, 2022). Com relação aos meios

de fermentação utilizados, geralmente ocorre uma divisão em dois grandes grupos, os meios quimicamente definidos ou sintéticos e os meios indefinidos ou complexos. O primeiro grupo, como o próprio nome sugere, compreende os meios constituídos com espécies químicas em concentrações bem definidas, enquanto o segundo grupo corresponde aos meios produzidos pela utilização de compostos naturais e com composição, na maioria dos casos, totalmente ou parcialmente desconhecida (HUSSAIN *et al.*, 2019).

Independentemente do tipo de meio de fermentação utilizado, um bom rendimento da CB necessita da presença de uma fonte de carbono, de nitrogênio, além de fósforo e vitaminas. Tradicionalmente, o meio quimicamente definido que é comumente empregado é o Hestrin-Schramm (HS), descrito desde 1954. Sua utilização foi difundida por usar fontes de alimentos para os micro-organismos que são facilmente encontradas na maioria dos laboratórios microbiológicos. Por outro lado, o meio HS é de elevado custo, visto que exige uma grande quantidade desses nutrientes para sua obtenção (BLANCO *et al.*, 2018).

Outro fator de destaque que justifica o interesse pelo estudo dos meios de fermentação utilizados na produção de CB refere-se ao custo. Durante a produção de CB, cerca de 30% do custo total do processo corresponde ao meio de cultura utilizado. Esse é um dos fatores que limita sua produção e comercialização em larga escala (XU *et al.*, 2022). Por este motivo, várias tentativas para encontrar meios de fermentação que possuam uma melhor relação custo/benefício vêm sendo extensivamente realizadas com a finalidade de que seja viável a produção de CB em escala industrial (MARESTONI *et al.*, 2020).

Os esforços na obtenção de meios para a produção da CB ocorrem, principalmente, no sentido de encontrar fontes alternativas de carbono. Estas têm o objetivo de substituir os constituintes sintéticos tradicionalmente empregados que fazem uso de açúcares puros, como a glicose, a frutose, o glicerol, a sacarose, o manitol e o sorbitol (AMORIM *et al.*, 2019).

Vários trabalhos sugerem a obtenção de CB com a utilização de meios obtidos a partir de subprodutos de baixo valor agregado, fazendo uso de resíduos industriais e/ou agrícolas, além de sumos de frutas, como resíduos de levedura da produção de cerveja, soro de queijo, bagaço de frutas, glicerol e resíduos de indústrias têxteis. Esses materiais ricos em açúcares e outros nutrientes vêm se mostrando adequados para serem utilizados como meio fermentativo (MARESTONI *et al.*, 2020). Uma

grande vantagem da utilização desses tipos de subprodutos é que além do baixo custo, também contribuem para uma produção sustentável com a redução da poluição ambiental (TSOUKO *et al.*, 2015; REVIN, *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2020)

Normalmente, os subprodutos são empregados como parte da composição dos meios de produção tradicionais. É possível também sua utilização *in natura* ou a suplementação com outros nutrientes, como a peptona e o extrato de levedura. Essa suplementação, quando realizada, decorre da necessidade de empregar um meio rico não somente em fontes de carbono, mas também em outros tipos de substâncias necessárias para a manutenção dos micro-organismos. Tal prática é realizada na tentativa de melhorar ou pelo menos manter a produtividade e o rendimento da CB obtida, ao mesmo tempo que possibilita uma redução do custo total do processo, com o objetivo de expandir a produção industrial e consequentemente o emprego em outras aplicações (PHRUKSAPHITHAK; KAEWNUN; O-THONG, 2019).

Por este motivo, subprodutos oriundos principalmente de compostos naturais despertam interesse na produção de CB. Além de menor custo, eles possuem grandes quantidades de nutrientes, que incluem substâncias antioxidantes. Essas, por sua vez, reúnem excelentes propriedades para obtenção de produtos de maior valor agregado com aplicações sobretudo nas áreas biomédicas (AMORIM *et al.*, 2019; MORAIS *et al.*, 2019).

2.4 ANTIOXIDANTES NATURAIS

O emprego de substâncias abundantes de menor custo e de subprodutos agrícolas e/ou industriais que sejam ricos em compostos bioativos, têm despertado um grande interesse. Um exemplo desses compostos são as substâncias antioxidantes empregadas para obtenção de materiais de alto valor agregado. Tal prática também está diretamente associada ao conceito de sustentabilidade, visando o desenvolvimento de soluções com menor impacto ambiental (NUNES; RODRIGUES; OLIVEIRA, 2017).

O termo antioxidante é utilizado para classificar compostos que têm como característica a capacidade de atrasar ou inibir a oxidação de algumas moléculas, atuando nas reações da cadeia oxidativa. Esses compostos são capazes de eliminar os radicais livres que podem ser produzidos naturalmente por processos biológicos nos seres humanos, além de possuir a capacidade de diminuir os efeitos deletérios

de várias substâncias oxidativas presentes nos mais diferentes tipos de condições patológicas (BAIANO; NOBILE, 2016; RAMANA *et al.*, 2018).

Uma grande parcela de produtos com características antioxidantes é derivada das plantas, sobretudo as medicinais (BUJAK *et al.*, 2022). Esses são denominados antioxidantes naturais, que incluem compostos como vitaminas (E e C), polifenóis (ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas) e carotenoides (carotenos, xantofilas). Além das plantas, essas substâncias são amplamente encontradas em flores, folhas, bebidas e alimentos, como frutas, vegetais e grãos. Elas possuem muitos efeitos biológicos benéficos, que incluem ações anti-inflamatória, antienvelhecimento, antibacteriana, antiviral e anticancerígenas (XU *et al.*, 2017).

Dentre os mais variados tipos de substâncias antioxidantes naturais existentes, podem-se destacar, como as mais eficientes, aquelas que apresentam compostos fenólicos. O anel aromático presente em suas estruturas é responsável pela doação de um átomo de hidrogênio aos radicais livres que são formados durante o processo de oxidação, estabilizando-os (BAIANO; NOBILE, 2016). Os polifenóis são compostos metabólitos secundários das plantas e podem ser classificados, como: flavonóis, estilbenos, ácidos fenólicos, antocianinas e taninos (VO *et al.*, 2022). Dentre os polifenóis de interesse, por apresentarem propriedades antioxidantes, pode-se destacar as antocianinas. Elas comprovadamente apresentam potenciais benefícios para a saúde (TAN *et al.*, 2022).

2.4.1 Antocianinas

As antocianinas são consideradas compostos fenólicos pertencentes à família dos flavonoides, solúveis em água, facilmente extraídas e responsáveis pelos tons vermelho, roxo e azul, existentes nas folhas, flores, frutos, caules, raízes e sementes de diferentes tipos de plantas, como amora, repolho roxo, morango e uva (POURJAVAHER *et al.*, 2017; BUJAK *et al.*, 2022). São substâncias naturais que nas plantas apresentam a função principal de proteção contra os ataques microbianos. Ao mesmo tempo, elas vêm sendo amplamente estudadas em relação a várias de suas propriedades benéficas para a saúde do homem (WRIGHT *et al.*, 2021).

Características estruturais e químicas das antocianinas resultam em um conjunto de propriedades medicinais de grande potencial. Essas substâncias apresentam capacidades antioxidantes, atóxicas, anti-inflamatórias, anti-hipertensiva,

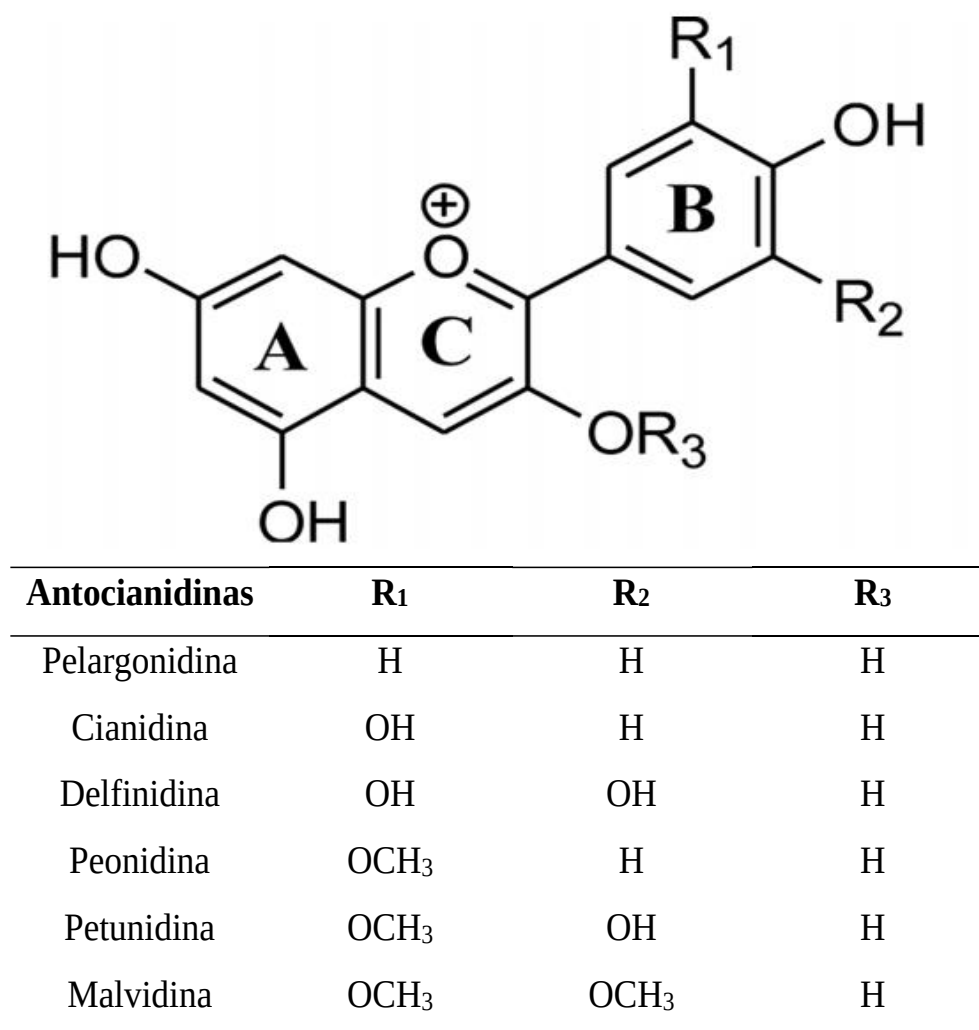
anticarcinogênica, antimicrobiana, antiobesidade. Além disso, estudos realizados *in vivo* e *in vitro* já foram capazes de atestar sua baixa toxicidade e elevada segurança (TAN *et al.*, 2022).

Em contrapartida, as antocianinas sob a forma isolada são muito instáveis e facilmente degradadas quando submetidas a mudanças de condições ambientais. O ambiente externo pode rapidamente degradar essas substâncias. Tais transformações estão associadas a modificações estruturais, devido fatores como variações de pH, temperaturas, exposição a luz, presença de oxigênio, enzimas, proteínas, ácido ascórbico e íons metálicos (TARONE, CAZARIN, MORATISCA JUNIOR, 2020).

O conjunto de características promissoras das antocianinas, com destaque para as propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antienvelhecimento, ocasionaram em sua ampla utilização em diferentes campos, como em alimentos, medicamentos e cosméticos (TAN *et al.*, 2022). Além disso, elas também podem ser empregadas como corantes naturais bioativos em diferentes produtos comerciais de forma alternativa aos corantes sintéticos tradicionalmente utilizados. Tal substituição é interessante devido ao fato de os produtos de origem natural serem normalmente mais seguros para a saúde humana e para o meio ambiente (BUJAK *et al.*, 2022).

Com relação a estrutura química básica das antocianinas, tem-se que as antocianinas derivam das antocianidinas que apresentam em sua composição grupos glicosados (ligados a uma porção de açúcares, como a glicose e a galactose). Seu esqueleto básico consiste em uma junção de dois anéis aromáticos (A, B) conjugado por um anel heterocíclico que contém oxigênio (C), conforme representado na Figura 8 (CASTAÑEDA-OVANDO *et al.*, 2009).

Figura 8 – Estrutura química básica da antocianidinas.



Fonte: adaptado de Young; Liu (2020).

Na Figura 8 estão representados a estrutura molecular básica das antocianinas, bem como alguns dos seus tipos mais comuns. A diferença entre as diversas moléculas de antocianinas existentes refere-se à quantidade de grupos hidroxilas (-OH) ligados à sua estrutura básica, além da posição dessas ligações e da fonte obtida (CASTAÑEDA-OVANDO *et al.*, 2009; YONG; LIU, 2020).

Uma diversidade considerável de antocianinas pode ser encontrada na natureza, das quais cerca de 500 tipos já foram identificados (YONG, LIU, 2020). No entanto, apenas um número limitado de padrões é obtido comercialmente, isto se deve principalmente à sua instabilidade química. A produção da antocianina requer as etapas de extração, purificação e isolamento que podem ocorrer de forma independente ou conjunta. Normalmente, sua obtenção é realizada da extração de frutas, vegetais, grãos sólidos ou subprodutos do processamento desses materiais.

Vários são os tipos de extração que podem ser empregados, sendo o mais comum a extração sólido-líquido com a utilização de água ou solventes solúveis em água (ZHAO *et al.*, 2020).

Alguns estudos relatam o aumento na eficiência do processo de extração das antocianinas, a partir do emprego de solventes orgânicos como etanol ou metanol em soluções com diferentes proporções de água, ou ainda, com o uso de soluções acidificadas para sua obtenção em diferentes tipos de matrizes de amostras (HONG; NETZEL; O'HARE, 2020; WRIGHT *et al.*, 2021). No entanto, por serem facilmente extraídas e normalmente encontradas em concentrações elevadas nas matrizes, é possível optar pela utilização de métodos verdes na sua obtenção com bons rendimentos, como, por exemplo, o uso da extração aquosa. Nesses métodos não há a necessidade do emprego de solventes orgânicos associados ao processo, o que resulta na eliminação de preocupações ambientais, toxicológicas e de segurança (KALANTARI *et al.*, 2020).

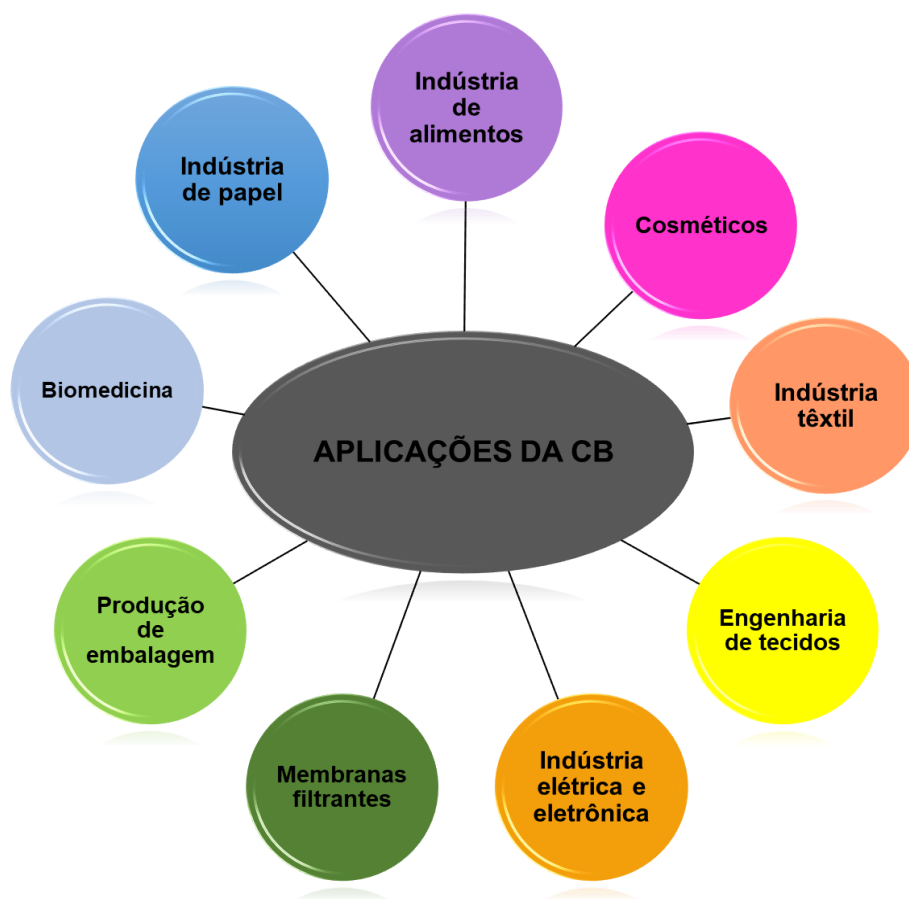
Dentre as várias matrizes disponíveis para extração da antocianina, pode-se destacar a utilização da casca de uva e do repolho roxo. Estudos anteriores mostram que as cascas de diferentes espécies de uvas possuem altos teores de antocianinas permitindo sua utilização como uma fonte inovadora na obtenção de antioxidantes naturais (REGULES *et al.*, 2006; FAN *et al.*, 2019; YORGHANLU *et al.*, 2021; VO *et al.*, 2022). Além disso, o repolho roxo que é um material naturalmente abundante e com um custo de produção relativamente baixo quando comparado a outros, é também considerado uma excelente fonte de antocianinas (POURJAVAHER *et al.*, 2017; YOUNG, LIU, 2020).

Estudos recentes destacam ainda o potencial da utilização industrial da antocianina em diferentes ramos. Na indústria de alimentos pode-se destacar seu emprego como aditivo ou suplemento (MONTEIRO *et al.*, 2021), além da obtenção de embalagens ativas e inteligentes (YONG; LIU, 2020). Em relação às indústrias de cosméticos e farmacêutica, compostos ativos estão sendo explorados como, por exemplo, no tratamento da pele (MORAIS *et al.*, 2019; BUJAK *et al.*, 2022). Além disso, é possível destacar ainda algumas aplicações clínicas, com a utilização de enxertos e peles artificiais (WRIGHT *et al.*, 2021). Essas aplicações decorrem normalmente da adição dos extratos ricos em antocianinas em diferentes matrizes que resultam na fabricação de biomateriais ricos em compostos ativos.

2.5 APLICAÇÕES DA CELULOSE BACTERIANA

Cada vez se torna maior o interesse em estudar a aplicabilidade da CB nos mais variados setores, devido à sua versatilidade e às excelentes propriedades que a destacam como um material multifuncional (GALLEGOS *et al.*, 2016). São muitos os exemplos de possíveis aplicações da CB em escala industrial e até no desenvolvimento de materiais aplicados na área médica, conforme ilustrado na Figura 9.

Figura 9 – Algumas das aplicações da celulose bacteriana.



Fonte: a autora (2022).

Dentre as possíveis aplicações da CB descritas na Figura 9 pode-se destacar sua utilização no desenvolvimento de embalagens ativas e inteligentes para alimentos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020; YOUNG; LIU, 2020), como aditivos ou na obtenção de alimentos multifuncionais (AZEREDO *et al.*, 2019), dispositivos eletrônicos (GUAN *et al.*, 2019), produtos para indústrias têxteis com a obtenção de couro vegano e fibras

para a confecção de utensílios como roupa, sapatos e bolsas (FERNANDES *et al.*, 2021; GALDINO *et al.*, 2022), na engenharia de tecidos com a produção, por exemplo, implantes de vasos sanguíneos artificiais, compósitos para regeneração de tecidos ósseos (STUMPF *et al.*, 2018; LEE, PARK, 2017), no desenvolvimento de membranas filtrantes para o tratamento de água (GALDINO *et al.*, 2020; DONG *et al.*, 2021; MEDEIROS *et al.*, 2021), na produção de papeis especiais de alta resistência (CHOI *et al.*, 2022; XU *et al.*, 2022), além de aplicação na indústria farmacêutica como sistema de administração e liberação de medicamentos (ULLAH *et al.*, 2019; ADEPU, KHANDELWAL, 2020) e no desenvolvimento de cosméticos (PERUGINI *et al.*, 2018; BIANCHET *et al.*, 2020).

Há muitos anos a CB já estava disponível comercialmente na indústria de alimentos (OKIYARNA, MOTOKI, YAMANAKA, 1992). A “nata de coco” é um alimento fermentado tradicional, semelhante a uma gelatina, derivado da celulose bacteriana e consumido como sobremesa. A sua produção industrial surgiu desde 1819 nas Filipinas e sua popularidade vem aumentando desde então, sobretudo nos países asiáticos, como Indonésia, Japão, Taiwan, Vietnã (PIADOZO, 2016; DUARTE *et al.*, 2019). Além disso, a CB é utilizada como aditivos alimentares na forma de emulsificante, melhorando a textura dos alimentos e/ou incorporando sabores (CHOI *et al.*, 2022).

No setor de eletrônicos, a CB é normalmente empregada na forma de nanocompósitos para a fabricação, sobretudo, de capacitores e biossensores. A flexibilidade obtida para os materiais produzidos com CB amplia as possibilidades de aplicações (CHOI *et al.*, 2022). Esses biossensores produzidos podem ainda ser integrados a dispositivos médicos (AMORIM *et al.*, 2020).

Uma das áreas mais difundidas e estudadas de aplicação da CB nos últimos anos é a biomédica com o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e na medicina regenerativa (INOUE *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2022). Nesse contexto, a engenharia de tecidos apresenta um papel de destaque. A CB é amplamente empregada no tratamento de ferimentos e queimaduras como uma segunda pele ou na forma de curativos facilitando a absorção de exsudatos da ferida, além de manter um ambiente com condições ideais de umidade, que previnem a infiltração de bactérias (CIECHOLEWSKA-JUŚKO *et al.*, 2021). Ademais, em muitos sistemas a CB também atua como um veículo para a liberação controlada de medicamentos (SILVA *et al.*, 2014).

A CB quando utilizada como curativo possui a capacidade de absorver as secreções das feridas, aliviando as dores por meio da liberação de medicamentos encapsulados em sua estrutura e auxiliando no processo de recuperação da pele. Além disso, tem a vantagem de também permitir uma ação antimicrobiana por funcionar como uma barreira física evitando a ocorrência de infecções (MISHRA, SABU, TIWARI, 2018). Outros exemplos de aplicações biomédicas se referem à utilização da CB como enxertos vasculares, implantes, cartilagem e pele artificial (BARUD *et al.*, 2016).

Com relação às áreas de aplicações dermatológicas e cosméticas, a CB vem ocupando um papel de destaque em pesquisas recentes, as quais buscam por inovação em abordagens tecnológicas resultando no surgimento de novos materiais (BIANCHET *et al.*, 2020; PERUGINI *et al.*, 2020).

2.6 INDÚSTRIA DE COSMÉTICOS E A CELULOSE BACTERIANA

Os cosméticos podem ser definidos como sistemas complexos, nos quais cada um dos constituintes são responsáveis por desempenhar várias funções de interesse no produto final (FREITAS, ALVES, REIS, 2015). Tais produtos atuam em qualquer parte externa do corpo humano proporcionando, por exemplo, alteração de odores, mudança de aparência, limpeza e/ou proteção (MITURA, SIONKOWSKA, JAISWAL, 2020).

No último século, a indústria cosmética foi impulsionada pelo aumento da demanda no mercado global. Esse crescimento ocorreu de forma conjunta com a busca estética e apelo dos consumidores por produtos de cuidados pessoais inovadores (SOUTO *et al.*, 2020). Tal cenário foi responsável pelo interesse dos fabricantes em desenvolver novas formulações de produtos que combinassem diferentes características desejáveis com maior eficiência e sem perda de estabilidade, sendo capaz de atender às diferentes demandas dos usuários (OLEJNIK *et al.*, 2022).

Atualmente, um elevado número de composições cosméticas ainda é formulado com o uso de derivados de petróleo. O emprego dessas fontes não-renováveis resulta na produção de resíduos de difícil degradação, que podem levar à bioacumulação de compostos tóxicos nos seres vivos. Além disso, eles contribuem com o agravamento dos problemas ambientais, por meio da contaminação de solos,

águas e elevadas emissões de gases poluentes (AMORIM *et al.*, 2022). Nesse cenário, surge uma preocupação com consumo sustentável, que considere a utilização de matérias-primas, que possam, após sua utilização, ser facilmente degradadas na natureza gerando um baixo impacto ambiental (BIANCHET *et al.*, 2020).

Os cosméticos ecologicamente amigáveis (*eco-friendly*) são reconhecidos como produtos que utilizam ingredientes de origem natural em sua composição, substituindo constituintes sintéticos. Além disso, são projetados para reduzir os danos causados ao meio ambiente quando comparados aos cosméticos convencionais. Tal preocupação compreende diferentes estágios do ciclo de vida do produto, aliando pesquisa e tecnologia para garantir sua eficácia (SADIQ, ADIL; PAUL, 2021).

Com relação a indústria de cosméticos *eco-friendly*, seu mercado global ainda está em crescimento. No entanto, acredita-se que este segmento tende a se fortalecer devido à forte tendência do comportamento dos produtores e consumidores em relação a uma maior consciência ambiental e sanitária. Essas características têm sido impulsionadas pela inovação com o desenvolvimento de produtos mais eficazes e menos tóxicos obtidos de fontes renováveis e com a utilização de tecnologias sustentáveis (AMBERG, FOGARASSY, 2019).

Dentro desse contexto, ao longo do século XX, várias formulações de produtos para cuidados pessoais e cosmecêuticos surgiram como propostas para uma abordagem de regeneração tecidual (SOUTO *et al.*, 2020). O termo cosmecêutico (combinação de cosméticos e farmacêuticos) podem representar o surgimento de uma nova categoria de produtos tópicos (AMBERG; FOGARASSY, 2019). Esse termo foi criado em 1962 por Raymond Reed, que os caracterizou como produtos que são capazes de potencializar a beleza e saúde dos seres humanos atendendo a rígidos padrões físico-químicos e médicos. Isto possibilita entrega dos benefícios sem risco a saúde do usuário (MORGANTI *et al.*, 2021).

Os produtos cosmecêuticos são definidos como uma classe de cosméticos que apresentam a adição de princípios ativos, como, por exemplo, antioxidantes, vitaminas, ácidos, hidratantes, esfoliantes e despigmentadores. Estes produtos são aplicados de forma tópica e possibilitam algum tipo de alteração do estado fisiológico da pele, não sendo classificados como medicamento. Tais materiais surgiram principalmente devido ao desejo sociocultural de manutenção de uma aparência

jovem retardando o efeito do envelhecimento cutâneo, a partir de cuidados com a saúde da pele (NGUYEN; MASUB; JAGDEO, 2020).

A pele é o maior órgão do corpo humano, por este motivo desempenha um papel importante na saúde, visto que serve como uma barreira protetora para impedir ou dificultar a entrada de micro-organismos patogênicos (NILFOROUSHZADEH *et al.*, 2018). Muitas são as causas que acarretam alterações cutâneas e contribuem com o processo de envelhecimento precoce da pele, bem como com o surgimento de doenças tópicas associadas. Estas causas compreendem fatores extrínsecos, como hábitos alimentares, exposição exagerada a radiação ultravioleta (UV), falta de cuidados com a pele, e, fatores intrínsecos, como aspectos fisiológicos, que conduzem a diminuição da produção de colágeno (BIANCHET *et al.*, 2020).

As preparações cosméticas são normalmente utilizadas como tratamento para a pele, sendo responsáveis pela melhora da aparência externa (MITURA, SIONKOWSKA, JAISWAL, 2020). Além dos constituintes que compõem as formulações, uma outra preocupação é com o veículo utilizado para entrega dessas substâncias. Esse veículo precisa ter uma estrutura que facilite a incorporação dos agentes bioativos, bem como permitir uma entrega transdérmica de forma controlada para que o produto obtido seja classificado como eficiente e seguro (MORGANTI *et al.*, 2021).

Dentre as substâncias empregadas como veículos em cosméticos, a classe de polímeros sintéticos e os biopolímeros assumem um papel de destaque (MEFTAH *et al.*, 2022). Os materiais poliméricos apresentam vantagens estruturais que permitem o encapsulamento de compostos ativos. Fator importante, já que tais compostos são geralmente substâncias instáveis e sensíveis a alterações externas, como temperatura, pH e luz. O encapsulamento permite um aumento da estabilidade dos produtos cosméticos e protege-os da degradação (MITURA, SIONKOWSKA, JAISWAL, 2020).

Muitos biopolímeros desempenham um importante papel na formulação de produtos cosméticos. Dentre eles, a CB tem sido amplamente investigada no desenvolvimento de produtos inovadores, que não afetam a saúde humana, além de serem biodegradáveis (BIANCHET *et al.*, 2020; MITURA, SIONKOWSKA, JAISWAL, 2020). Ela tem como vantagem ser biocompatível, biodegradável, possuir uma estrutura de rede muito fina que garante uma elevada área superficial, propriedades mecânicas com comportamento de tensão que se assemelha a tecidos moles, além

de conseguir formar emulsões estáveis com água e óleo que, em muitos casos, não necessita da utilização de outros aditivos (SONG, KIN, 2019; PICHETH, *et al.*, 2017).

Normalmente a CB é utilizada na formação de emulsões e hidrogéis estabilizantes com a intenção principal de diminuir a utilização de surfactantes comumente empregados (PICHETH *et al.*, 2017). Dessa forma, ela é usada como ingrediente em cremes hidratantes, no tratamento de unhas e dos lábios, usos capilares, design de perfumes duradouros, cuidados com a pele, esfoliantes, produtos com proteção solar, adesivos para o tratamento de olheiras (FREITAS; ALVES; REIS, 2015).

Ainda existem desafios a serem superados para aplicações que permitam explorar todo o potencial da CB com o aproveitamento de suas propriedades multifuncionais. Os principais referem-se à diminuição do custo de produção, ao desenvolvimento de técnicas que permitam sua obtenção em larga escala, à determinação de proporções eficientes para aplicação nas formulações desenvolvidas e as condições de armazenamento, sobretudo quando sua utilização é sob a forma úmida (MEFTHAH *et al.*, 2022).

Ainda é pequeno o número de pesquisas relacionadas à utilização da CB no desenvolvimento de máscaras faciais, adesivos faciais ou como suporte para ativos cosméticos quando se compara com os estudos relacionados ao seu uso sob a forma de veículo para liberação controlada de medicamentos (PACHECO *et al.*, 2017; BIANCHET *et al.*, 2020). Nas composições cosméticas, a utilização de CB melhora a absorção e transmissão transdérmica das substâncias ativas, além de proporcionar funções de hidratação, esfoliação da pele e absorção do sebo (LIN *et al.*, 2015).

Um dos primeiros relatos da utilização de CB como máscara facial e que incluiu também estudos de avaliação dos usuários aconteceu em 2011 com a pesquisa realizada por Amnuait e colaboradores. Os participantes do estudo descreveram a CB como um material confortável, que possibilitou um aumento considerável da umidade da pele após o uso, além de proporcionar boa aderência (BIANCHET *et al.*, 2020).

As máscaras faciais são cosméticos acessíveis, facilmente aplicados sobre a pele e comumente carregadas com ingredientes bioativos para adição de novas propriedades. Elas estão disponíveis de diversas formas, como gel, emulsão, folhas e pasta, e, sua aplicação está diretamente relacionada ao tipo de formulação empregada em sua composição (NILFOROUSHZADEH *et al.*, 2018).

Géis de CB já se encontram disponíveis comercialmente como máscaras e adesivos faciais no Japão. Estes géis possuem características como elasticidade, transparência e a capacidade de manter o ambiente úmido para os ingredientes bioativos. A CB é um material com grande potencial para confecção dessas máscaras faciais, por ter uma boa maleabilidade, devido a sua forma de membrana, o que facilita o processo de manipulação e a aderência ao rosto (NUMATA; MAZZARINO; BORSALI, 2015).

2.7 ESTERILIZAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS

A depender do tipo de aplicação que será submetido e da fonte de obtenção do biopolímero, aumenta-se a preocupação com o método de descontaminação empregado antes do seu uso final. Biopolímeros contaminados que sejam utilizados, por exemplo, nos campos biomédico e de cosméticos, podem resultar em graves infecções ao ser humano (BEH *et al.*, 2019).

A descontaminação consiste em um processo de limpeza e desinfecção ou de limpeza e esterilização do material. Na limpeza ocorre uma remoção física dos contaminantes, enquanto na desinfecção há uma inativação ou destruição de grande parte dos micro-organismos presentes, incluindo alguns patogênicos (WILSON, NAYAK, 2019). Já com relação ao processo de esterilização, há uma eliminação dos micro-organismos viáveis mais resistentes, incluindo bactérias, fungos, vírus e até esporos bacterianos (SONI *et al.*, 2020).

A inativação dos micro-organismos na esterilização pode ocorrer por meios físicos ou químicos e deve acontecer de forma irreversível (WILSON; NAYAK, 2019). O termo estéril pode ser definido como a ausência de micro-organismos. Entretanto quando um determinado material é submetido a algum processo de esterilização, na prática não se consegue eliminar toda a população microbiana. O que ocorre realmente é uma redução da quantidade dos micro-organismos presentes nesse material. A população remanescente dos micro-organismos sobreviventes é expressa em termos de probabilidade e o ideal é que ela se mantenha em níveis muito baixos (GALANTE *et al.*, 2018).

Os métodos de esterilização constituem uma etapa fundamental no processo de produção de biopolímeros. Por esse motivo, é importante avaliar os parâmetros

utilizados no método escolhido para que as propriedades e funcionalidades do material submetido a este tratamento sejam preservadas (ROGERS, 2012).

A determinação do método de esterilização adequado para cada biopolímero depende de uma avaliação que compreenda suas vantagens e limitações com relação aos impactos ocasionados no material após a técnica empregada. É necessário avaliar as propriedades físico-químicas e mecânicas do material antes e após o processo de esterilização. Um outro fator importante que deve ser levado em consideração refere-se à eficiência desse processo, a qual está diretamente relacionada com a aplicação final do biopolímero esterilizado (LORSON *et al.*, 2020). Os métodos de esterilização utilizados não devem ser capazes de comprometer o desempenho e a qualidade dos biopolímeros e/ou ocasionarem sua deterioração (PARK *et al.*, 2017).

Vários são os processos de esterilização disponíveis para aplicação neste tipo de material, os quais incluem a utilização de produtos químicos ou meios físicos. Além disso, é grande o interesse no desenvolvimento de pesquisas que resultem no emprego de técnicas inovadoras em comparação aos métodos convencionais amplamente utilizados industrialmente (SONI *et al.*, 2020).

Os métodos químicos de esterilização incluem processos como a exposição prolongada dos biopolímeros em substâncias que possuem um alto poder desinfetante. Dentre elas, as que possuem maior destaque são: o óxido de etileno, o formaldeído e o plasma do peróxido de hidrogênio (WILSON; NAYAK, 2019).

Ainda segundo estes autores, entre os métodos físicos pode-se destacar a utilização de calor ou radiações. A esterilização térmica, por exemplo, pode ser subdividida em processos via calor seco e calor úmido. O emprego de calor seco é difícil de ser controlado, entretanto permite o uso por períodos longos. Em contrapartida, o processo de calor úmido (autoclavagem) destaca-se por ser um dos primeiros métodos testados de esterilização (WILSON; NAYAK, 2019).

Dentre os métodos radioativos, merece destaque a utilização da irradiação gama. Ela é normalmente empregada quando o material a ser esterilizado é sensível ao calor, além disso é reconhecida por garantir uma esterilização de forma homogênea (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

2.7.1 Esterilização por irradiação gama

A escolha de qual método será utilizado depende da viabilidade, aplicação e das características do material que será submetido ao processo. Tudo isso, com o cuidado para que não haja alterações indesejadas em relação às propriedades físico-químicas do produto (HODDER *et al.*, 2019).

A irradiação gama consiste em um processo iônico sem uso de aquecimento, que se destaca por ser um procedimento simples e eficaz, além de possuir um alto poder de penetração (JIPA *et al.*, 2012). De forma resumida, este tipo de irradiação pode ser definido como uma radiação eletromagnética decorrente da presença de um núcleo atômico instável que perde energia. As ondas eletromagnéticas geradas são usualmente oriundas da desintegração radioativa de fontes de cobalto 60 (^{60}Co) ou de cério 137 (^{137}Cs). A interação da irradiação gama com a matéria ocorre por meio de colisões da radiação com os elétrons presentes nos átomos que compõem o material. Em decorrência dessa interação, há a perda desses elétrons e a consequente formação de íons (SILVA *et al.*, 2014; NAIKWADI *et al.*, 2022).

O uso da irradiação gama como método de esterilização pode resultar na reticulação e/ou degradação da cadeia polimérica com a sua cisão (ROGERS, 2012). Isso pode ocasionar modificações de várias propriedades funcionais do polímero, com possíveis alterações em seus aspectos físicos, propriedades químicas, térmicas, estruturais e de superfície (SALARI *et al.*, 2021; PAULA *et al.*, 2019; HODDER *et al.*, 2019). Por isso, deve-se verificar o grau de modificação do material, levando em consideração parâmetros como dose de irradiação, tempo de duração e fonte de irradiação empregada. Além disso, deve ser considerado o tipo de estrutura polimérica e morfologia de fase encontradas no material submetido à irradiação, assim como o tamanho e o tipo da embalagem utilizada para seu acondicionamento (NAIKWADI *et al.*, 2022).

Alguns benefícios podem ser destacados ao aplicar irradiação gama nos processos de esterilização, como: não ocorrência de reação térmica que permite sua utilização em materiais termolábeis; a liberdade de escolha no acondicionamento dos materiais com a possibilidade do produto irradiado se manter estéril até remoção da embalagem; compatibilidade com diferentes tipos de materiais, além da facilidade de controle na dose empregada no processo e do tempo de exposição. A junção dessas

características contribui para a ampla aceitação da esterilização via irradiação gama nos campos comercial e industrial (SILVA *et al.*, 2014).

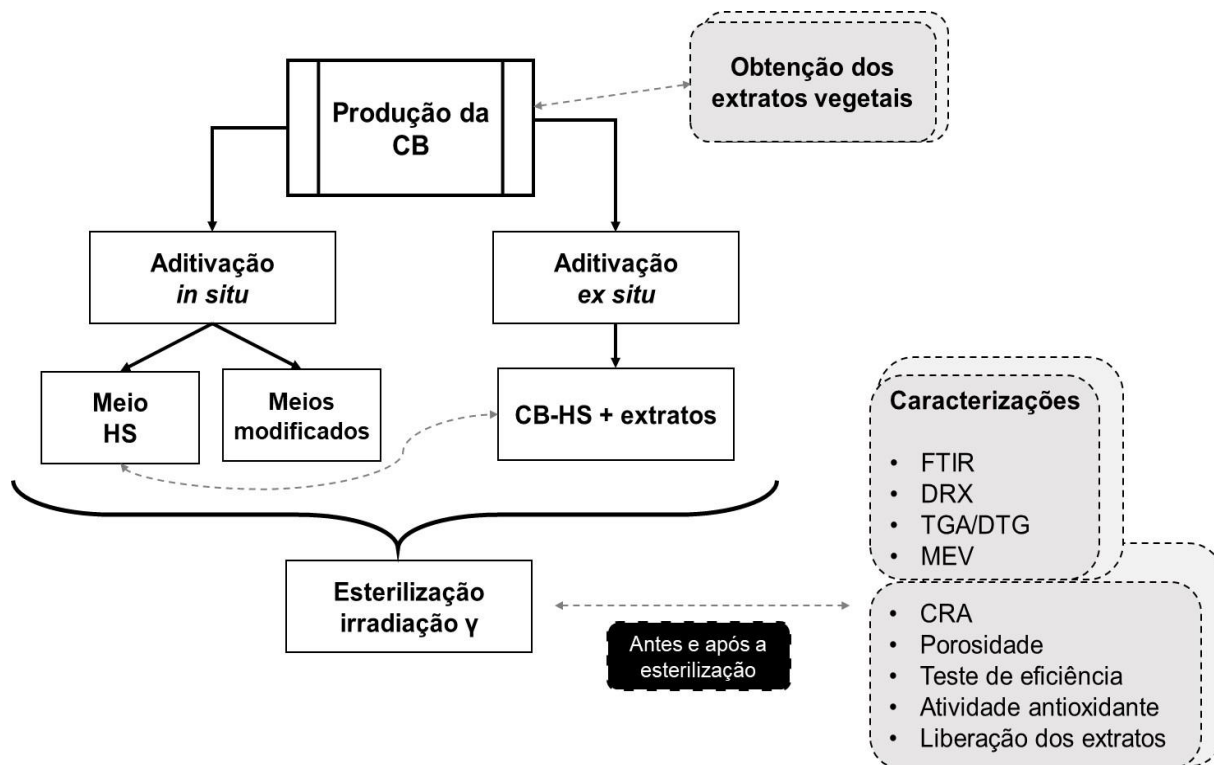
Diferentes setores industriais já fazem uso da esterilização por irradiação gama. Dentre eles tem-se a utilização em produtos farmacêuticos e dispositivos biomédicos (GALANTE *et al.*, 2018), na conservação de alimentos (JIPA *et al.*, 2012) e na esterilização de cosméticos (AMORIM *et al.*, 2022). As doses de irradiação normalmente utilizadas variam de 25 a 40 kGy, sendo a de 25 kGy a mais utilizada para a esterilização da maioria dos biopolímeros. Esta dosagem é comprovadamente eficaz, visto que muitos materiais conseguem resistir a ela, sem acarretar efeitos adversos, como reticulação e cisão da cadeia polimérica (HODDER *et al.*, 2019; PAULA *et al.*, 2019).

3 METODOLOGIA

Os experimentos foram desenvolvidos em etapas que incluem os processos de preparação do meio, inoculação e conservação do micro-organismo, produção do biopolímero de celulose bacteriana em meio padrão Hestrin e Schramm (HS) e em meios HS modificados. Além disso, foram realizadas as etapas de obtenção dos extratos vegetais da uva Isabel (*Vitis labrusca*) e do repolho roxo (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) ricos em substâncias com propriedades antioxidantes e aditivação dos antioxidantes naturais pelos métodos *in situ* e *ex situ*.

Em seguida, propôs-se um método analítico para acompanhamento da antocianina e estudo da liberação do extrato em meio aquoso. Por fim, foi realizado um teste para avaliar a eficiência da utilização da esterilização com irradiação gama para as membranas de CB produzidas e a influência exercida por essa técnica nas propriedades físico-químicas das amostras. Na Figura 10 é mostrado um fluxograma que ilustra um resumo das etapas anteriormente descritas.

Figura 10 – Fluxograma das etapas experimentais.



Fonte: a autora (2022).

3.1 MICRO-ORGANISMO

Para a produção da celulose bacteriana (CB) foi utilizada a bactéria do gênero *Komagataeibacter hansenii* (anteriormente conhecida como *Gluconacetobacter hansenii*) UCP1619. A cepa utilizada foi obtida do banco de cultura do Centro de Pesquisa em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Brasil (UNICAP).

3.2 MEIO DE MANUTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO, PRÉ-INÓCULO E INÓCULO

Para a manutenção da viabilidade do micro-organismo e seu cultivo foi utilizado um meio padrão baseado em estudos desenvolvidos por Hestrin e Schramm (HS), descrito desde 1954, e adaptado por Hungund; Gupta (2010) e Gomes *et al.* (2013). O meio HS foi composto por 20,00 g.L⁻¹ de glicose, 5,00 g.L⁻¹ de peptona, 5,00 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 2,70 g.L⁻¹ de fosfato de sódio (Na₂HPO₄), 1,15 g.L⁻¹ de ácido cítrico, em pH 5. Com relação à preservação do micro-organismo, foi adicionado ao meio 15,00 g.L⁻¹ de ágar. Todos os meios obtidos foram esterilizados em autoclave a 121 ± 1 °C por 15 min.

Para o pré-inóculo foram utilizados 100 mL do meio HS a 30 °C por 48 h sob condições estáticas em um frasco de Erlenmeyer com capacidade para 250 mL. O inóculo foi obtido utilizando-se 3% (v/v) do pré-inóculo anteriormente preparado. Ele foi adicionado em 100 mL de meio líquido de produção em um frasco Schott (500 mL), nas mesmas condições descritas para o pré-inóculo.

3.3 PRODUÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA COM MEIO PADRÃO HESTRIN E SCHRAMM

Foram produzidas membranas de CB com o meio padrão HS adaptado com composição descrita no item 3.2 na realização dos meios de manutenção do micro-organismo, pré-inóculo e inóculo. Tais membranas serviram como parâmetro comparativo para as demais produzidas com os meios modificados pelo método *in situ*, bem como para serem empregadas na aditivação *ex situ*.

3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS NATURAIS

Foram preparados dois extratos para aditivação *in situ* e *ex situ* do biopolímero de CB. As matérias-primas empregadas, casca de uva e repolho roxo, foram adquiridas em mercados encontrados na cidade do Recife, no estado de Pernambuco. O método utilizado no processo de obtenção dos extratos foi o de infusão em solução aquosa, também denominado de método de diluição em água.

A obtenção do extrato da casca de uva Isabel (*Vitis labrusca*) foi realizada pelo método de infusão, na concentração de 375 g.L^{-1} . Inicialmente, as cascas de uva úmidas foram pesadas e adicionadas em um recipiente de vidro com água destilada previamente aquecida ($90 \pm 1^\circ\text{C}$). Em seguida, os recipientes foram tampados e deixados em repouso durante 10 min. A solução resultante foi separada por filtração comum e armazenada sob refrigeração ($4 \pm 1^\circ\text{C}$), em frasco Schott (500 mL) âmbar até posterior utilização.

Para o extrato de repolho roxo (*Brassica oleracea var. capitata f. rubra*), inicialmente as folhas foram lavadas com água destilada, picadas e cortadas antes de serem submetidas ao método de infusão. As condições experimentais e concentração obtidas foram as mesmas descritas para o extrato da casca de uva.

3.5 MEIOS DE PRODUÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA PELO MÉTODO *IN SITU*

Para a produção *in situ* foram utilizados o meio HS padrão, os extratos das cascas de uva e do repolho roxo puros e meios compostos por diferentes proporções entre o padrão e os respectivos extratos. Inicialmente, com auxílio de um pHmetro (Tecnal) foram determinados os pH dos meios de produção. Essa medição foi efetuada com o intuito de verificar se os valores encontrados variavam entre 4-6, visto que essa é a faixa considerada ótima para a obtenção da CB, conforme já descrito por Keshk (2014). Por esse motivo, não houve nenhum ajuste de pH antes da utilização dos meios de produção.

Todos os meios obtidos foram previamente esterilizados em autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 min. A suspensão celular foi incubada em 100 mL de cada um dos meios produzidos a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 dias em frascos Schott (500 mL) sob condições estáticas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Na Tabela 2 é

mostrada a composição e o pH de cada um dos meios de produção empregados para a obtenção das CB.

Tabela 2 - Composição e pH dos meios modificados utilizados na produção da celulose bacteriana.

Composição dos meios	Extrato (% v/v)	Meio Hestrin e Schramm (HS) (% v/v)	pH	Denominação
Meio padrão	0	100	5,0	HS
	100	0	4,0	U100
Casca de uva	50	50	4,4	U50
	25	75	4,9	U25
	100	0	6,0	R100
Repolho roxo	50	50	5,3	R50
	25	75	5,8	R25

Fonte: a autora (2022).

Conforme descrito na Tabela 2, os dois extratos obtidos foram empregados em diferentes proporções como meios modificados para a obtenção da CB (processo *in situ*). Além disso, o meio HS padrão puro também foi usado como meio de produção. A CB obtida a partir desse meio tradicional serviu de parâmetro comparativo em relação as propriedades das membranas oriundas dos meios modificados, além de ter sido utilizada no método de aditivação *ex situ*.

Após a produção das membranas, elas foram armazenadas sob refrigeração (4 ± 1 °C), em recipientes contendo água deionizada. Os recipientes utilizados eram opacos para que as membranas ficassem sob abrigo da ação da luz. Além disso, foram calculados os rendimentos de celulose úmida e seca, a partir da pesagem das amostras depois dos 7 dias de cultivo com a utilização de 100 mL de meio de fermentação. Os valores obtidos foram expressos em g.L⁻¹.

3.6 PURIFICAÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA

As membranas de CB produzidas com o meio HS padrão que seriam empregadas no método de aditivação *ex situ*, inicialmente foram submetidas a um processo de purificação com hidróxido de sódio (NaOH). Tal procedimento não foi empregado nas demais amostras produzidas com meios modificados pelos extratos *in situ*, pois os constituintes que compõem as membranas produzidas são sensíveis a variações de pH.

As CB obtidas depois do processo de crescimento foram coletadas, lavadas em água destilada e purificadas, com o intuito de eliminar as células bacterianas retidas nas membranas. O processo de purificação foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Amorim *et al.* (2020), em que se utilizou a imersão das membranas produzidas em solução de NaOH ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) a $90 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min. Em seguida, as membranas foram lavadas com água deionizada até a obtenção de pH 7.

3.7 PRODUÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA PELO MÉTODO *EX SITU*

O processo de aditivação *ex situ* dos antioxidantes naturais obtidos foi realizado seguindo a metodologia adaptada de Pacheco *et al.* (2017). As membranas de CB produzidas pelo meio HS padrão, ainda úmidas, foram pesadas e 50% de sua massa total, composta por água retida nas fibras celulósicas, foi removida por pressão manual. Em seguida, cada membrana foi colocada em uma placa de Petri e recebeu a adição superficial e de forma homogênea do extrato. As placas foram agitadas em mesa agitadora (marca) por 35 min, a 150 rpm e $25 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Durante a agitação, as membranas foram reviradas a cada 5 min com o auxílio de uma pinça. Todo procedimento foi realizado para cada um dos extratos obtidos.

Após o processo de aditivação com os diferentes extratos, as membranas de CB obtidas pelos métodos *in situ* e *ex situ* foram acondicionadas separadamente em sacos plásticos do tipo Zip Lock, com fecho hermético, fabricado em polietileno de alta densidade (PEAD) e submetidas ao processo de esterilização por irradiação gama.

3.8 ESTERILIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA

Após a aditivação das membranas de CB *in situ* e *ex situ*, elas foram irradiadas na dose de 25 kGy, à temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, por um período de 15 h e 35 min (PAULA *et al.*, 2019). As irradiações foram executadas com o auxílio de um irradiador de Co^{60} (taxa de $1,604 \text{ kGy}\cdot\text{h}^{-1}$), em equipamento Gammacell 220 Excel MDS Nordion, localizado no Laboratório de Metrologia das Radiações Ionizantes do Departamento de Energia Nuclear da UFPE (LMRI-DEN/UFPE). De posse das membranas de CB, estas foram submetidas as técnicas de caracterização, descritas no item 3.9, antes e após serem expostas ao processo de esterilização com a finalidade de avaliar a viabilidade celular e as propriedades físico-químicas, além da eficiência desse processo de radiação ionizante como meio de esterilização para o material obtido.

3.8.1 Teste de eficiência da esterilização

O teste para determinar a eficiência do processo de esterilização por irradiação gama foi realizado por meio da inoculação das membranas de CB estéreis em meios que continham a mesma composição dos utilizados no procedimento de produção. As condições de inoculação também foram idênticas as utilizadas para a produção da CB (100 mL de meio a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 dias). Após o período de teste, a avaliação foi feita por meio da comparação entre cada uma das membranas obtidas sem esterilização e as esterilizadas por irradiação gama. Tal comparação foi realizada a partir da avaliação de aspectos referentes a indícios de contaminação com a presença de bolores, além da avaliação de turvação de meio e de crescimento celular.

3.9 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA

Para determinar as características das membranas de CB produzidas ao longo do trabalho foram realizados testes com a utilização de algumas técnicas de caracterização, de modo a determinar suas propriedades químicas e estruturais. Essas foram realizadas antes e após as amostras serem submetidas ao processo de esterilização por irradiação gama.

3.9.1 Capacidade de retenção de água

As membranas úmidas de CB obtidas após 7 dias de cultivo foram pesadas em balança analítica (Shimadzu) e secas em estufa (Tecnal) a $50 \pm 2^\circ\text{C}$ para remoção da água, até a obtenção de peso constante. Em seguida, o percentual da capacidade de retenção de água (CRA) foi determinado utilizando a Equação 1.

$$CRA (\%) = \frac{(\text{Média dos pesos úmidos} - \text{Média dos pesos secos})}{(\text{Média dos pesos úmidos})} \quad (1)$$

3.9.2 Porosidade

A determinação da porosidade da superfície das membranas de CB obtidas após 7 dias de cultivo foi realizada com a utilização da Equação 2 (DING *et al.*, 2016). Nesta equação, W_w e W_d são os pesos das membranas úmidas e secas, respectivamente, d é a densidade da água (1 g.cm^{-3}), D é a espessura da membrana (cm), e, A é a área da membrana (cm^2).

$$\text{Porosidade} = \left(\frac{W_w - W_d}{d \times D \times A} \right) \times 100\% \quad (2)$$

3.9.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

A técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi empregada para avaliação das mudanças estruturais da cadeia polimérica das membranas de CB obtidas. Antes da análise, as amostras foram secas em estufa e mantidas em dessecador com sílica gel à temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$.

As membranas foram analisadas utilizando um espectrômetro Bucker FTIR (Equinox 55 Model, Bruker Co., Ettlingen, Alemanha) e medidos em um dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) horizontal através de uma placa de células cristalinas (45° ZnSe ; $80 \times 10 \text{ mm}$; espessura: 4 mm) (PIKE Technology Inc., Madison, WI, USA). A faixa de varredura utilizada foi de $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$, após 32 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} . Os dados espectrais obtidos foram processados com correção das linhas de base e normalização.

3.9.4 Difratometria de raios-X

Os índices de cristalinidade das membranas de CB (CI) foram calculados pela Equação 3, conforme descrito por Segal *et al.* (1959). Esta equação baseia-se na diferença de intensidade entre os picos maior e menor, os quais correspondem às fases cristalina (I_c) e amorfa (I_a), respectivamente.

$$IC = \left[\frac{(I_c - I_a)}{I_c} \right] \times 100\% \quad (3)$$

Os padrões de difratometria de raios-X (DRX) das membranas de CB foram obtidos com a utilização de um difratômetro Rigaku com um tubo de cobre ($\lambda = 0,154$ nm), voltagem de 40 kV e corrente de 20 mA, em uma faixa angular (escala 2θ) de 10° a 30° e velocidade de varredura de $0,5^\circ \cdot \text{min}^{-1}$.

3.9.5 Análise termogravimétrica

A avaliação da estabilidade térmica das membranas de CB obtidas foi realizada através da técnica de análise termogravimétrica (TGA). Inicialmente, pesou-se aproximadamente 8 mg de cada amostra, em seguida, elas foram digitalizadas de 30°C até 600°C , sob uma atmosfera de nitrogênio com uma taxa de fluxo de $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ para evitar a degradação termo oxidativa das amostras (taxa de aquecimento: $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$). O analisador utilizado foi da Mettler Toledo, localizado no Laboratório de Petroquímica (LPQ) da UFPE.

3.9.6 Microscopia eletrônica de varredura

Para a determinação das morfologias das membranas de CB após os 7 dias de cultivo foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Inicialmente, as membranas obtidas foram secas e recobertas por um filme condutor. O microscópio eletrônico utilizado foi o da marca VEGA3 Tescan, operando com tensões de 5 ou 10 kV e aumento de 10 kx, esse equipamento encontra-se localizado no Centro Multiusuário de Pesquisa e Caracterização de Materiais (CEMUPEC) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE-UACSA).

3.9.7 Avaliação da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante das membranas de CB e dos extratos brutos foi realizada pelo método de sequestro de radicais livres com uso do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), conforme a metodologia descrita por Brand-Williams e colaboradores (1995). O DPPH na forma de um radical estável (DPPH*), em solução de metanol, tem sido amplamente empregado na determinação da atividade antioxidante de compostos ou extratos específicos. Esta solução foi avaliada no comprimento de onda de característico (515 nm).

Para realização desta análise, inicialmente foi preparada a solução de DPPH* em metanol 80% na concentração de 2,5 mg.L⁻¹. Em seguida, 0,1 mL de cada amostra foi pipetado e colocado em contato com 3,9 mL da solução metanólica de DPPH*. A solução resultante foi deixada em repouso por 30 min ao abrigo da luz.

As leituras de absorbância foram realizadas em um espectrofotômetro de ultravioleta-visível (UV-Vis) Edutech, localizado no Laboratório de Petroquímica (LPQ) da UFPE. Todas as leituras foram realizadas em triplicata e a capacidade de sequestrar radicais livres (DPPH*) foi determinada com base no decaimento da absorbância observada (Equação 4). Nesta equação, Abs_b é a absorbância do branco (solução de DPPH) e Abs_a é a absorbância da amostra em solução. O resultado foi expresso em termos de % de inibição da atividade antioxidante.

$$\% \text{ Inibição DPPH}^* = \frac{(Abs_b - Abs_a)}{Abs_b} \times 100 \quad (4)$$

3.9.8 Avaliação da capacidade de liberação dos extratos em água

Para estimar a capacidade de liberação do extrato em água por cada uma das amostras foi definido um tempo de 24 h de contato entre cada uma das membranas em 20 mL de água deionizada. Para a aditivação dos extratos nas amostras foi utilizada a metodologia empregada na produção das amostras *ex situ* (adaptação de Pacheco *et al.*, 2017), conforme descrito no item 3.7. O procedimento foi realizado para todas as amostras obtidas.

Após o processo de aditivação, as membranas foram colocadas em recipientes fechados contendo 20 mL de água deionizada durante 24 h. Em seguida, foi realizada

uma varredura espectral (400-700 nm) dos sobrenadantes e de cada um dos extratos utilizados via espectrofotometria de UV-Vis, utilizando um equipamento da Thermoscientific (Modelo Genesys), localizado no Laboratório de Engenharia Ambiental e da Qualidade do Departamento de Engenharia Química (DEQ-UFPE).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao longo do trabalho, todas as amostras de CB produzidas com os diferentes meios de fermentação foram preparadas em triplicata. Para avaliar a confiabilidade dos resultados obtidos, os valores de rendimento foram expressos em média (μ) e desvio padrão (σ).

Os resultados dos experimentos referentes à obtenção das amostras de CB, o emprego delas nas diferentes técnicas de caracterizações, a avaliação do processo de esterilização com irradiação gama e seus efeitos nas propriedades físico-químicas, como também a avaliação da capacidade de liberação dos extratos em água estão os apresentados em cada uma das etapas descritas nesta seção.

4.1 PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA PELO MÉTODO *IN SITU*

Os rendimentos médios de produção para os diferentes meios de cultura empregados em termos de peso da membrana hidratada e da membrana seca, após os 7 dias de cultivo, foram determinados. Além disso, foram estimados os custos médios de produção da CB por litro de meio empregado e por massa de CB seca em gramas. É importante destacar que tais custos correspondem a cerca de 30% do valor de custo total de produção das membranas, pois eles foram estimados considerando apenas valores necessários para a aquisição dos diferentes meios de fermentação empregados nas produções da CB. Os valores utilizados foram baseados em preços médios de mercado encontrados na cidade do Recife, no estado de Pernambuco, calculados em maio de 2022. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Rendimento das membranas de celulose bacteriana (CB) úmida e seca para cada meio de cultura utilizado e o custo médio de produção. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R100, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R).

Meios de cultura	Rendimento CB úmida (g·L ⁻¹) $\mu \pm \sigma$	Rendimento CB seca (g·L ⁻¹) $\mu \pm \sigma$	Custo (R\$.L ⁻¹) μ	Custo (R\$.g ⁻¹) μ
Hestrin-Schramm (HS)	120,55 $\pm$ 2,4	1,90 $\pm$ 0,27	12,70	6,68
Uva 100% (U100)	84,45 $\pm$ 2,3	0,92 $\pm$ 0,13	11,06	12,02
Uva 50% (U50)	122,89 $\pm$ 3,7	1,81 $\pm$ 0,32	11,88	6,56
Uva 25% (U25)	134,45 $\pm$ 1,9	2,68 $\pm$ 0,51	12,29	4,58
Repolho 100% (R100)	-	-	-	-
Repolho 50% (R50)	155,55 $\pm$ 3,9	3,76 $\pm$ 0,38	6,72	1,79
Repolho 25% (R25)	149,15 $\pm$ 3,8	2,94 $\pm$ 0,40	9,71	3,30

μ =média; σ =desvio padrão.

Fonte: a autora (2022).

Com base nos dados apresentados na Tabela 3 é possível observar que, após os 7 dias de fermentação, com exceção apenas do meio de cultura contendo o extrato de repolho roxo puro (R100), em todos os outros meios empregados houve produção de CB. Por este motivo, o extrato puro de repolho roxo (R100) passou a ser utilizado apenas no processo de aditivação *ex situ* (ver item 4.2).

Com relação aos custos de produção obtidos, foi possível perceber que os meios alternativos apresentaram, de uma forma geral, uma redução dos custos quando comparado ao encontrado na produção que fez uso apenas do meio padrão HS. Tal fato demonstra que a utilização dos meios modificados pelos extratos obtidos é de grande interesse, pois são capazes de serem utilizados como fontes alternativas ao meio padrão HS melhorando a relação custo-benefício do processo de obtenção da CB. Isso contribui para reduzir o custo do processo como um todo, favorecendo sua produção e comercialização, que tem como um dos principais fatores limitantes o custo, conforme já relatado por Xu e colaboradores (2022).

Na Figura 11 estão ilustrados os sistemas de produção de cada uma das membranas de CB contendo os meios de fermentação, assim como as membranas já produzidas na superfície deles após os sete dias de cultivo.

Figura 11 - Meios de produção das membranas de celulose bacterianas. U100, U50, U25, R100, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R).



Fonte: a autora (2022).

Com base nas imagens dispostas na Figura 11, bem como nos valores de rendimentos apresentados na Tabela 3 é possível observar que para o extrato do repolho roxo empregado no processo *in situ*, há ausência de produção apenas na sua forma pura (R100). Por este motivo, essa composição passou a ser empregada

apenas no processo de aditivização *ex situ*, conforme já destacado anteriormente. Este resultado pode ser justificado devido a carência de nutrientes, sobretudo quanto a disponibilidade de fonte de carbono, visto que ocorreu a produção das membranas de CB quando o extrato de repolho roxo foi empregado nas diferentes proporções estudadas com o meio HS padrão (R50 e R25).

Ainda de acordo com os dados da Tabela 3 e as imagens apresentadas na Figura 11, têm-se que entre os meios empregados, os constituídos por uma proporção percentual do meio padrão HS e os meios alternativos de uva ou de repolho roxo apresentaram rendimentos superiores ao encontrado para produção com o meio HS puro. Com relação aos extratos puros, apenas o de uva (U100) foi capaz de obter a membrana, resultando em uma produção mínima da CB. Tais resultados confirmam a dependência do rendimento da produção de CB com a disponibilidade e o tipo de fonte de carbono, bem como dos diferentes valores de pH encontrados em cada um dos meios de cultura utilizados, conforme já relatado por Costa *et al.* (2017).

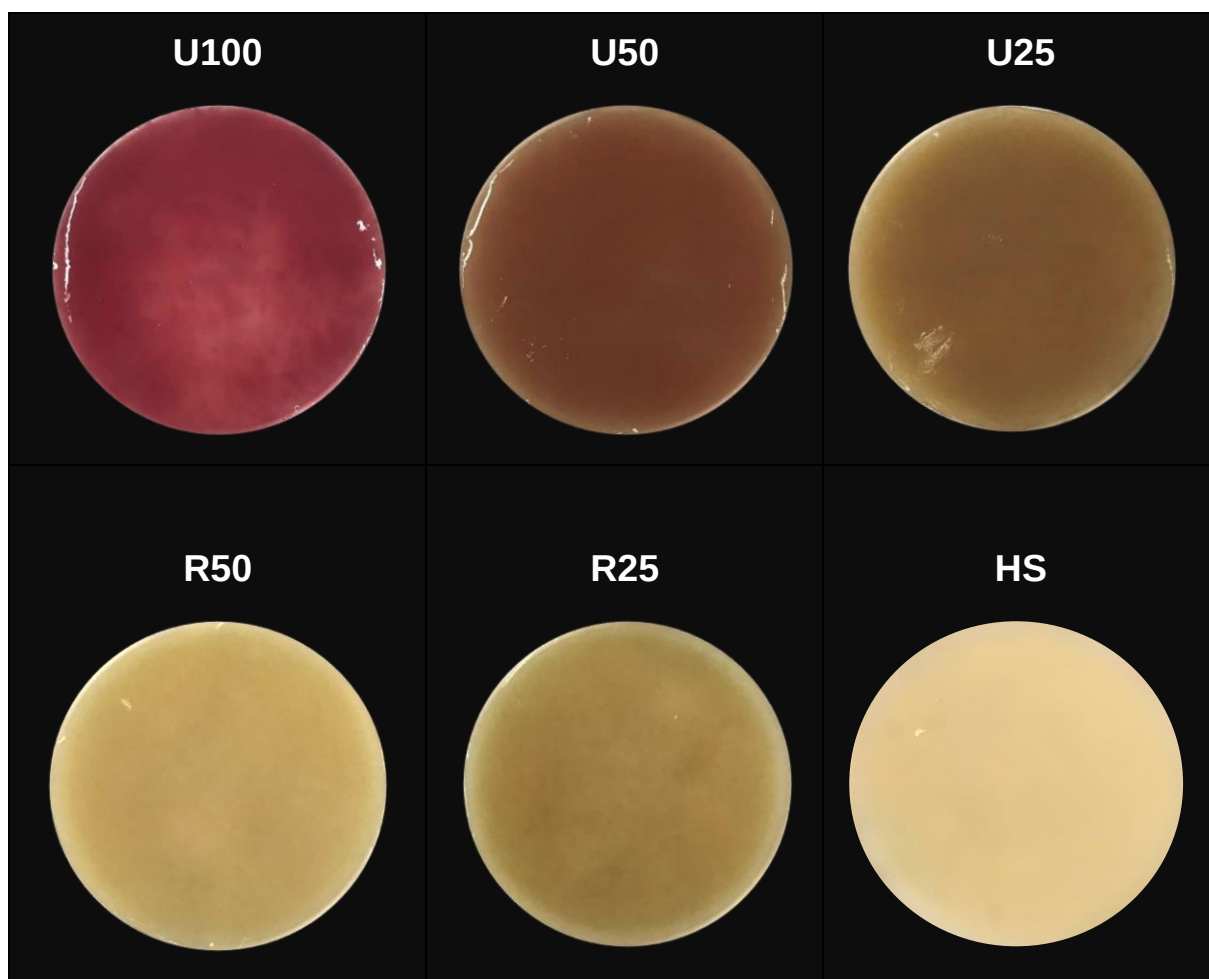
Os meios alternativos que se destacaram com os melhores rendimentos foram os de composições de 50% extrato de repolho roxo e 50% meio HS padrão (R50), e, de 25% extrato de repolho roxo e 75% meio HS padrão (R25). Tais resultados sugerem que a adição de outros compostos ao meio HS padrão pode potencializar a produção da CB, conforme já relatado por Keshk (2014) com a adição de ácido ascórbico. O melhor rendimento foi obtido com o meio R50 com valores médios de $155,55 \pm 3,9 \text{ g.L}^{-1}$ de meio e $3,76 \pm 0,38 \text{ g.L}^{-1}$ de meio para a celulose hidratada e para a celulose seca, respectivamente. Estes valores correspondem a um aumento de rendimento para as membranas de CB hidratada e seca em relação ao meio HS padrão de aproximadamente 29% e 98%, respectivamente. Tais resultados são muito satisfatórios, pois correspondem a um aumento de rendimento de produção aliado ao fato de ser, entre os meios empregados, aquele que apresentou o menor custo médio de produção no valor de R\$ 6,72 para cada litro de meio utilizado.

Os demais rendimentos apresentados são compatíveis com os encontrados em trabalhos anteriores que também fizeram uso de meios alternativos envolvendo a utilização de extratos vegetais para a produção de CB. Como, por exemplo, os resultados relatados por Amorim *et al.* (2019) com o uso do resíduo da fruta acerola (*Malpighia emarginata*), e, por Costa *et al.* (2017) com o uso do melaço da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Os valores de rendimentos obtidos demonstram a

viabilidade da utilização dos extratos da casca de uva e de repolho roxo em diferentes proporções com o meio HS padrão para a obtenção das membranas de CB.

As amostras obtidas em cada meio exibiram mudanças morfológicas relacionadas a espessura e coloração. As diferentes colorações apresentadas estão ilustradas nas imagens mostradas na Figura 12.

Figura 12 – Aspectos das membranas de celulose bacteriana úmidas para cada meio de cultura utilizado. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) e HS: meio padrão.



Fonte: a autora (2022).

Com relação as imagens dispostas na Figura 12, é possível observar aspectos visuais distintos quanto a coloração de cada membrana obtida, a partir dos diferentes meios de fermentação empregados. Além disso, as membranas de CB úmidas resultantes apresentaram espessuras distintas que são proporcionais aos diferentes valores de rendimentos encontrados, visto que todas elas possuem o mesmo diâmetro.

Após a produção das membranas de CB, estas foram submetidas a um processo de purificação, por meio do tratamento com solução de NaOH à quente, com o intuito de inativar a biomassa da bactéria *Komagataeibacter hansenii* retida nas fibras das membranas. Com esse processo de purificação foi possível perceber mudanças na intensidade de coloração das membranas obtidas com os meios alternativos. Tal modificação de cor está associada a variação do pH das membranas após o contato com NaOH, bem como ao aumento de temperatura a que elas foram submetidas. Essas alterações de coloração decorrem da reconhecida sensibilidade a variações de pH e temperatura de substâncias presentes nos extratos utilizados, as antocianinas (MUSSO; SALGADO; MAURI, 2019).

Em decorrência dos efeitos adversos observados nas membranas produzidas com os meios modificados pelos extratos após a purificação com método convencional (NaOH à quente), foi determinado que elas não seriam submetidas a tal método. Para promover a inativação celular da biomassa de bactérias presentes nas fibras das CB formadas foi proposto a técnica de esterilização por irradiação gama. No entanto, para as membranas de CB produzidas apenas com meio padrão HS, o processo de purificação convencional com NaOH à quente foi realizado (Figura 13). Tal uso foi justificado pelo emprego posterior dessas membranas no processo de aditivação *ex situ*. Além disso, as membranas produzidas com meio HS não possuem em sua composição substâncias, como a antocianina, o que permite o emprego da técnica de purificação citada sem ocasionar nenhuma alteração de propriedades nas membranas.

Figura 13 – Aspecto da membrana de celulose bacteriana produzida com meio HS antes (a) e após (b) a purificação com hidróxido de sódio.



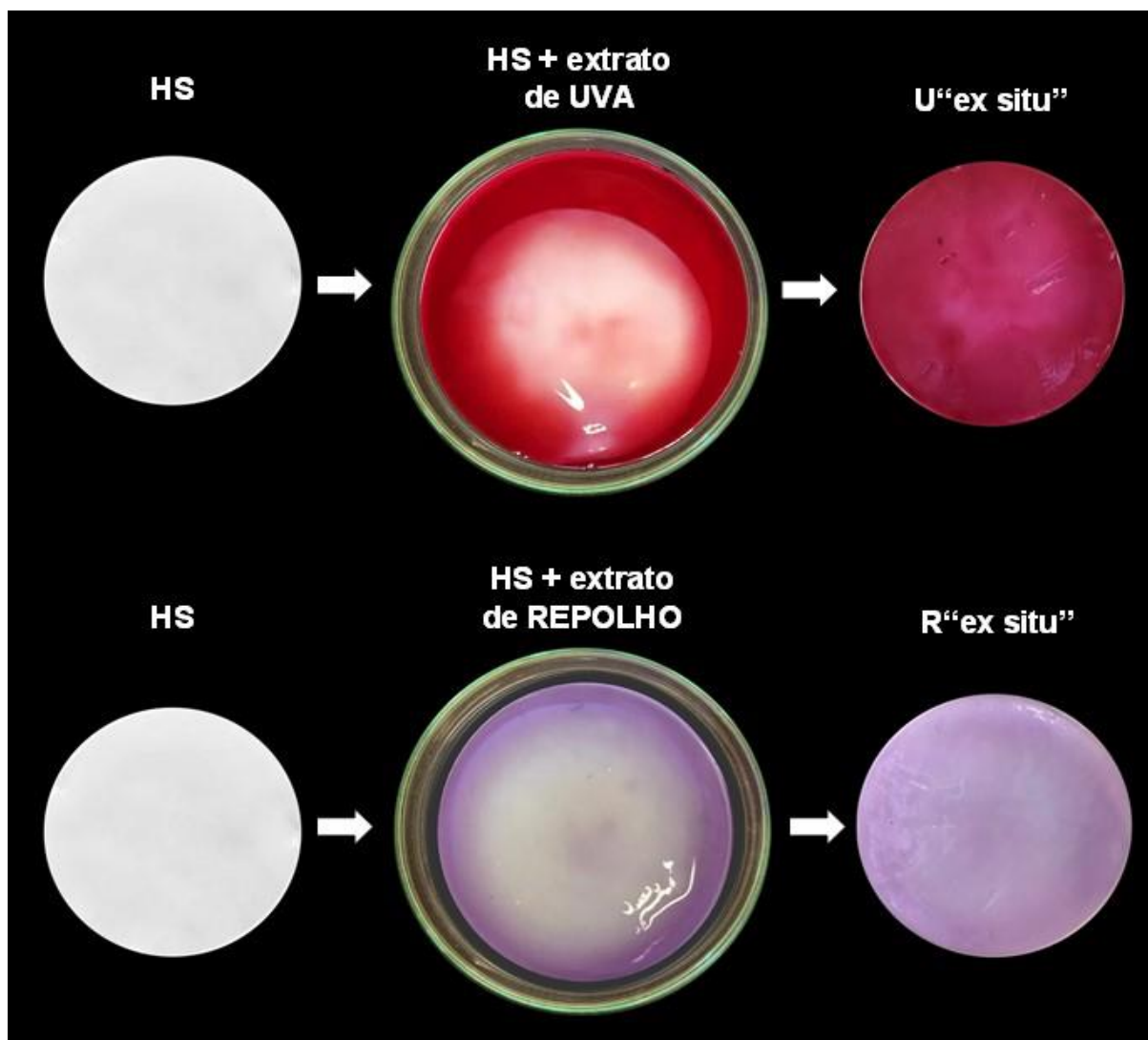
Fonte: a autora (2022).

Na Figura 13 (a) está ilustrado o aspecto da membrana de CB obtida com meio HS padrão antes de passar pelo processo de purificação. Nela é possível observar uma coloração característica que corresponde a mesma encontrada no meio HS padrão. Após passar pelo processo de purificação (Figura 13 (b)), a membrana de CB assume uma coloração branca. As membranas de CB produzidas apenas com meio HS após a purificação foram empregadas no processo de aditivação *ex situ* com os extratos obtidos.

4.2 ADITIVAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES NATURAIS PELO MÉTODO *EX SITU* NA CELULOSE BACTERIANA

Finalizada a etapa de purificação das membranas de CB, procedeu-se com a aditivação *ex situ* do material. Na Figura 14 é mostrado o esquema do processo de modificação das membranas de CB pelo método de aditivação *ex situ* de cada um dos extratos obtidos.

Figura 14 – Esquema do processo de aditivação *ex situ* para as membranas de celulose bacteriana.
 HS: meio padrão. U“*ex situ*”: extrato de uva. R“*ex situ*”: extrato de repolho roxo.



Fonte: a autora (2022).

Observando as imagens dispostas na Figura 14, é possível notar a mudança de coloração característica para cada membrana de CB. Essa coloração resultante corresponde a mesma observada nos respectivos extratos *in natura*. Ela está relacionada a coloração de cada extrato.

Após o procedimento foi possível observar que ocorreu total incorporação do extrato utilizado. Além disso, uma aparente distribuição superficial homogênea, em cada caso, foi observada. Sendo assim, passou-se a etapa de avaliação da capacidade de retenção da água.

4.3 CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA

A CRA foi determinada para as membranas de CB obtidas com os diferentes meios de cultura após os 7 dias de cultivo. Os resultados de CRA (%) estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4 – Capacidade de retenção de água (CRA) das membranas de celulose bacteriana. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R).

Membranas de CB	CRA (%)
Hestrin-Schramm (HS)	98,42 ± 0,34
Uva 100% (U100)	98,94 ± 0,39
Uva 50% (U50)	98,53 ± 0,31
Uva 25% (U25)	98,01 ± 0,17
Repolho 50% (R50)	97,58 ± 0,23
Repolho 25% (R25)	98,03 ± 0,18

μ=média; σ=desvio padrão.

Fonte: a autora (2022).

Para todos os meios de cultura utilizados, os resultados alcançados (Tabela 4) confirmam que as membranas de CB possuem uma elevada capacidade de retenção de água com valores em torno de 98%. Estes valores estão em concordância com o que foi descrito por Galdino Júnior e colaboradores (2020) para celulose bacteriana obtida a partir do meio padrão HS, que conseguiram valor de CRA igual a 98,61 ± 0,55%. Vale ressaltar que, apesar da utilização dos meios de produção alternativos, a capacidade de retenção de água nas membranas se manteve. Esse comportamento também foi observado por Amorim e colaboradores (2019) que fizeram uso de sumos de fruta para obtenção da CB e por Xu e colaboradores (2022) que utilizaram resíduos de batata doce hidrolisada na obtenção da CB. Dentre as amostras produzidas, a membrana que apresentou a maior CRA média foi a obtida com extrato de uva puro (U100) com um valor de 98,94 ± 0,39 %.

O alto conteúdo de água da CB é explicado por sua elevada porosidade, bem como pela presença de muitos grupos hidroxilas em sua estrutura retendo a água por

meio de ligações de hidrogênio (CAMPANO *et al.*, 2015). Esta propriedade é de grande importância, visto que fornece características ideais para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e cosméticos, como curativos para a pele e máscaras faciais, respectivamente (XU *et al.*, 2022). Além disso, é responsável por permitir um aumento de hidratação da pele, bem como facilitar o processo de impregnação de substâncias possibilitando a entrega de compostos ativos (BIANCHET *et al.*, 2020). De posse destes resultados, passou-se então a avaliação da porosidade das membranas de CB.

4.4 POROSIDADE

Como mencionado anteriormente, a porosidade é uma característica importante da CB, sendo necessária a avaliação dos valores deste parâmetro para cada uma das membranas produzidas. Os valores de porosidades das membranas obtidos após 7 dias de cultivo estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5 – Porosidades das membranas de celulose bacteriana. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R).

Membranas de CB	Porosidade (%)
	$\mu \pm \sigma$
Hestrin-Schramm (HS)	76,55 $\pm$ 0,51
Uva 100% (U100)	89,84 $\pm$ 0,53
Uva 50% (U50)	86,80 $\pm$ 0,50
Uva 25% (U25)	85,02 $\pm$ 0,39
Repolho 50% (R50)	61,20 $\pm$ 0,45
Repolho 25% (R25)	77,61 $\pm$ 0,39

μ = média. σ = desvio padrão.

Fonte: a autora (2022).

Conforme os dados apresentados na Tabela 5, têm-se que todas as amostras apresentaram altos valores de porosidade (com valores médios entre 61-89%). A porosidade é uma propriedade de grande importância na melhoria da capacidade dos

materiais incorporarem outros compostos em sua estrutura, por meio de processos de absorção e/ou adsorção (MEFTHAI *et al.*, 2022).

Os valores de porosidade das membranas de CB produzidas variaram de acordo com o meio de fermentação empregado no processo. Além disso, a comparação desses valores foi dependente da espessura obtida para as membranas obtidas. Desse modo, pôde-se constatar que as membranas de CB com maior espessura, ou seja, com maior rendimento de produção levaram a uma consequente diminuição da porosidade. Essa tendência ocorre devido ao incremento na concentração de fibras com a formação de uma rede tridimensional mais densa, comumente encontrada nas membranas mais espessas (ADEPU *et al.*, 2020).

O comportamento da dependência da porosidade com a espessura das membranas é justificado pelo modo que ocorre o processo de crescimento da CB. Com o passar do tempo de fermentação empregado, há uma adesão dos filmes formados em camadas, uns sobre os outros, com o consequente aumento de espessura e do rendimento de produção. Esse incremento na espessura leva a uma diminuição de volume de poro. Tal comportamento também foi observado por Galdino Júnior *et al.* (2020). Neste trabalho os pesquisadores compararam a porosidade das membranas de CB em diferentes tempos de fermentação e observaram que há uma redução da porosidade à medida que aumenta o rendimento de produção das membranas, ou seja, com o incremento da espessura.

Entre as amostras produzidas com diferentes composições do extrato de uva, o valor de porosidade encontrado para todas as amostras foi superior a 85%. Dentre elas o maior valor foi observado para a amostra U100 ($89,84 \pm 0,53$ %). No caso das membranas produzidas com o extrato de repolho, a maior porosidade foi observada para a amostra R25 ($77,61 \pm 0,39$). Tais valores são compatíveis com os rendimentos obtidos para as membranas de CB, conforme descritos anteriormente na Tabela 3 (item 4.1).

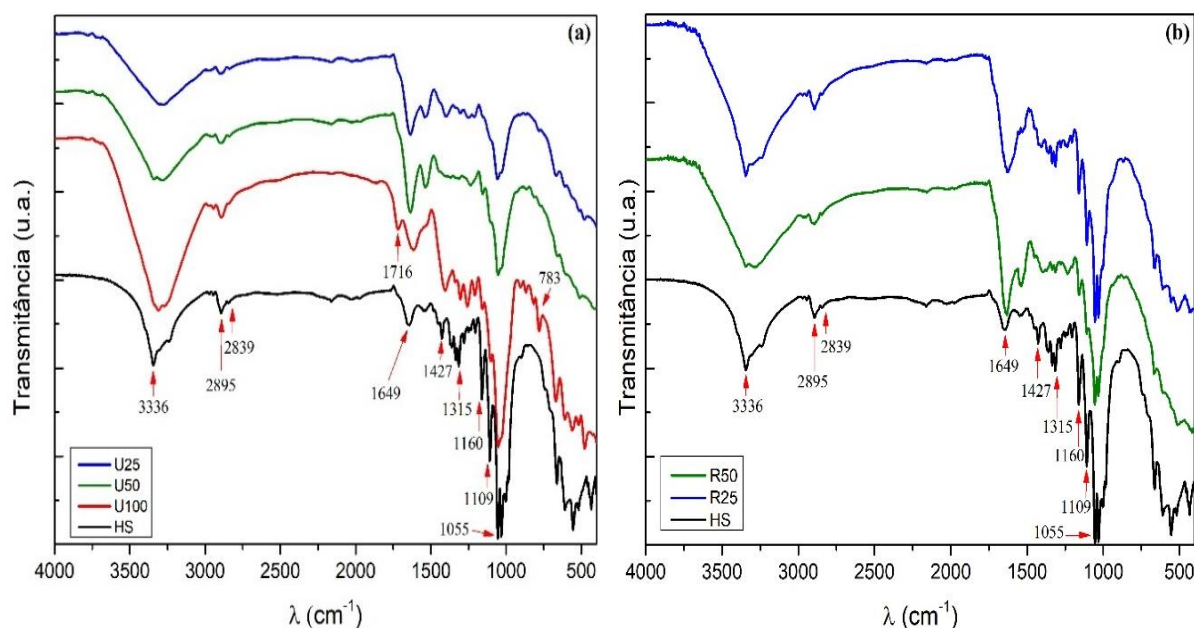
Ainda analisando os dados da Tabela 5, percebe-se que a membrana U100 foi a que apresentou maior porosidade (89,84%). Esse resultado também significa que essa membrana permite a penetração de maior quantidade de moléculas de água, ou seja, que possui uma maior capacidade retenção da água (CRA). Tal resultado está de acordo com o observado na Tabela 4 (item 4.3), em que a membrana que obteve maior CRA também foi a U100 ($98,94 \pm 0,39$ %).

Os altos valores de CRA e porosidade encontrados para todas as amostras de CB são também justificados pela grande quantidade de grupos hidroxilas (^-OH) presentes em sua estrutura (CAMPANO *et al.*, 2015). Tais propriedades são de grande interesse para o desenvolvimento de produtos cosméticos, pois elas permitem um aumento da hidratação da pele, além de possibilitar a entrega de compostos ativos que podem ser mais facilmente impregnados na CB (BIANCHET *et al.*, 2020).

4.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Após a determinação das propriedades de capacidade de retenção de água e porosidade, foram avaliados aspectos qualitativos estruturais das membranas produzidas através da técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Na Figura 15 estão dispostos os espectros de FTIR das membranas de CB obtidas após os 7 dias de cultivo, tanto para o meio padrão HS como para as resultantes da utilização dos extratos da casca de uva e de repolho em diferentes composições.

Figura 15 – Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das membranas de celulose bacteriana. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método *in situ*.



Fonte: a autora (2022).

A partir dos espectros da Figura 15 foi possível observar que, independente da composição do meio empregado no processo de síntese, as principais bandas características da CB para todas as membranas produzidas foram encontradas. Estes resultados indicam que a modificação dos meios com os extratos da casca de uva e o repolho roxo, utilizados no processo fermentativo, não representou influência na estrutura molecular das CB obtidas, resultado semelhante ao relatado anteriormente por Wu e colaboradores (2021) na produção de *in situ* de CB utilizando como meio de fermentação a goma gelana com diferentes teores de acila.

As principais bandas da CB destacadas nos espectros foram: uma banda intensa na região de 3336 cm^{-1} atribuída ao alongamento vibracional dos grupos hidroxilas (O-H), um pico agudo em 2895 cm^{-1} que corresponde ao estiramento vibracional assimétrico das pontes de metileno ($-\text{CH}_2-$), um pico em 2839 cm^{-1} referente ao estiramento vibracional simétrico dos grupos metila ($-\text{CH}_3$), picos nas regiões de 1427 cm^{-1} e 1315 cm^{-1} referentes as ligações C-OH e C-H, e, nas regiões de 1160 cm^{-1} e 1109 cm^{-1} atribuídos aos estiramentos dos grupos C-O e C-OH, além de uma banda em 1055 cm^{-1} atribuída ao alongamento das ligações C-O-C e C-OH em carboidratos (POURJAVAHHER *et al.*, 2017; REVIN *et al.*, 2018; KHAN, KADAN, DUTT, 2020).

Os espectros de FTIR (Figura 15) exibiram ainda uma banda na região de 1649 cm^{-1} que corresponde a vibração da ligação H-O-H referente a água absorvida (KHAN, KADAN, DUTT, 2020). De acordo com os resultados de Pourjavaher e colaboradores (2017), esta banda pode ser atribuída à vibração de estiramento do anel aromático ($\text{C}=\text{C}$) de compostos fenólicos, como a antocianina. Essa substância pertence à família dos flavonoides e é responsável pelos tons de vermelho, roxo e azul de diferentes tipos de plantas, raízes e frutas, como a uva e o repolho roxo.

Ao comparar os espectros dispostos na Figura 15 (b) é possível observar uma clara distinção na intensidade desta banda para as membranas com extrato de repolho roxo (R50 e R25) em relação a obtida com meio padrão (HS). A intensidade da banda mencionada foi maior com o aumento da concentração de antocianinas presentes nas amostras, ou seja, na amostra R50 foi possível observar uma intensidade maior do que na amostra R25.

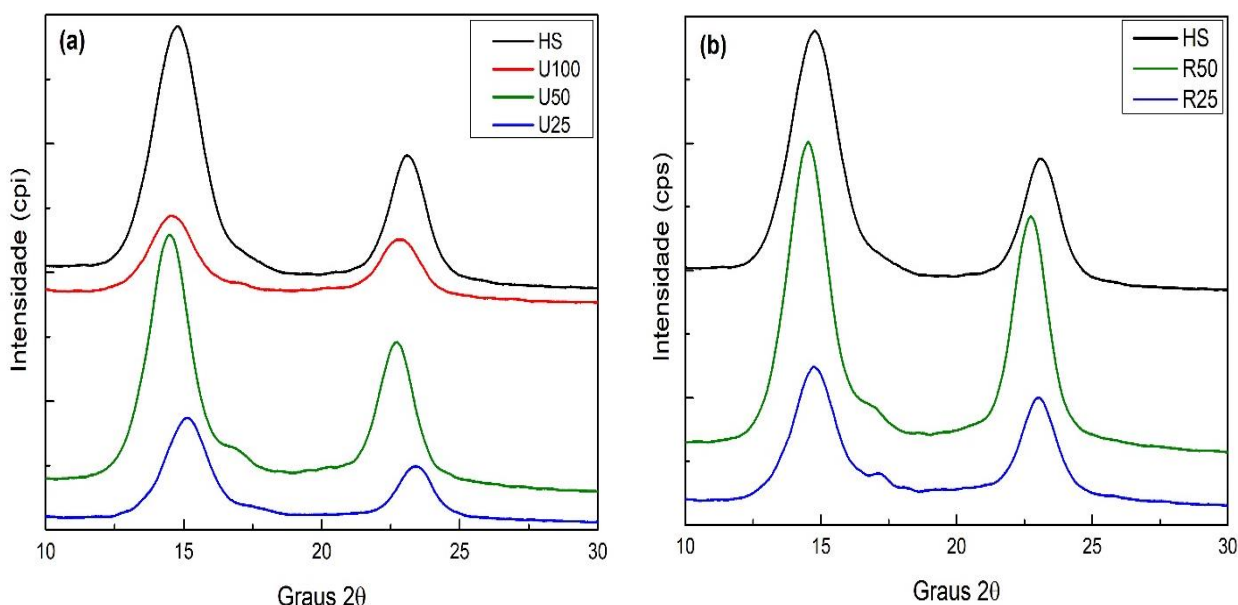
Para a amostra U100 (Figura 15 (a)), obtida a partir do extrato de uva puro, foi possível perceber no espectro de FTIR o aparecimento de uma banda adicional na região de 1716 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$). Isto indica a

presença de polissacarídeos como a pectina, muito encontrada na parede celular de tecidos vegetais, principalmente de frutas, além da presença de alguns ácidos fenólicos (LU, HSIEH, 2012; BUENO *et al.*, 2017).

4.6 DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X

Após a análise estrutural qualitativa das membranas produzidas, foram avaliadas as suas estruturas cristalinas por meio da técnica de difratometria de raios-X (DRX). Nos gráficos dispostos na Figura 16 são mostrados os padrões dos difratogramas para determinação da estrutura cristalina das membranas de CB.

Figura 16 – Difratogramas de raios-X das membranas de celulose bacteriana. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método *in situ*.



Fonte: a autora (2022).

Nos difratogramas de todas as amostras apresentados na Figura 16 foi possível perceber a presença de picos largos característicos de materiais semicristalinos, como é o caso da CB. Em todas elas, foram encontrados ângulos 2θ em torno de $14,5^\circ$ e 23° que correspondem aos planos cristalinos (110) e (200), respectivamente. Além disso, em alguns difratogramas ficou também evidenciado um pico em torno de $16,4^\circ$, o qual corresponde ao plano cristalino (010) comumente encontrado em amostras de CB. Os planos cristalinos encontrados em todas as amostras coincidem com os já

destacados para membranas de CB em estudos anteriores (ABDELRAOF; HASANIN; EL-SAIED, 2019; WU *et al.*, 2021).

Para as amostras produzidas com os meios modificados, utilizando diferentes composições de extratos, foi observado que os ângulos 2θ , em torno de $16,4^\circ$, foram mais pronunciados em comparação com o observado na amostra produzida com o meio HS padrão. Tal comportamento pode ser justificado pelo surgimento de novas regiões de cristalinidade das amostras produzidas com meios contendo os extratos. Além disso, as mudanças na intensidade relativa de todos os picos, comparando com os difratogramas dos diferentes produtos de CB obtidos, podem estar relacionadas a uma pequena diferença na orientação das cadeias para todas as membranas CB, conforme já relatado por Machado e colaboradores (2018).

Todos os padrões de DRX demonstram que as membranas obtidas, independente do meio de cultura utilizado, são de celulose tipo I. Essa se apresenta na forma de dois alomorfos I_α e I_β , cuja proporção difere de acordo com sua origem. A celulose do tipo I_α é a mais comumente encontrada no caso de celuloses derivadas de bactérias. Ela exibe um arranjo estrutural triclinico entre suas cadeias que interagem por meio de ligações de hidrogênio intermoleculares (ABDELRAOF; HASANIN; EL-SAIED, 2019; GAYATHRI, SRINIKETHAN, 2019).

Os resultados apresentados no DRX foram utilizados para avaliar a estrutura cristalina e amorfa dos biopolímeros produzidos, a partir do cálculo dos índices de cristalinidade (IC). Tal parâmetro é importante na determinação das propriedades mecânicas das amostras. Na Tabela 6 é descrito o IC das membranas de CB produzidas com os diferentes métodos de aditivação, os quais foram determinados conforme descrito por Segal *et al.* (1959).

Tabela 6 – Índices de cristalinidade das membranas de celulose bacteriana. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método *in situ*.

Membranas de CB	Índice de cristalinidade (IC)
	$\mu \pm \sigma$
Hestrin-Schramm (HS)	75,61 $\pm$ 0,37
Uva 100% (U100)	56,75 $\pm$ 0,83
Uva 50% (U50)	60,02 $\pm$ 1,50
Uva 25% (U25)	59,08 $\pm$ 0,91
Repolho 50% (R50)	68,70 $\pm$ 0,72
Repolho 25% (R25)	44,22 $\pm$ 0,65

μ = média. σ = desvio padrão.

Fonte: a autora (2022).

De acordo com os valores apresentados na Tabela 6, foi observado que a amostra com o maior IC foi a CB produzida com o meio HS padrão (75,61 $\pm$ 0,37 %). O resultado encontrado foi muito próximo ao comumente relatado por outros pesquisadores para as membranas produzidas com o meio tradicional (GALDINO *et al.*, 2020; CAMPANO *et al.*, 2015). Para as demais amostras produzidas pelo método de aditivação *in situ* com cada um dos extratos nas diferentes proporções, foram observadas reduções no IC quando comparadas a obtida com o meio padrão HS. Dentre as amostras produzidas com o extrato da casca de uva, o menor IC foi encontrado para a U100 (56,75 $\pm$ 0,83 %), enquanto para as obtidas com o extrato de repolho roxo, o menor IC foi observado na R25 (44,22 $\pm$ 0,65 %). Tais resultados confirmam que a utilização do método de aditivação *in situ* pode resultar em alterações das propriedades e estrutura da CB produzida, pois o aditivo empregado pode afetar a etapa de cristalização da CB durante a fermentação, diminuindo o IC, conforme resultados já apresentados por outros pesquisadores (CAZÓN, VÁZQUEZ, 2021; DAYAL, CATCHMARK, 2016).

A cristalinidade tem influência na maioria das propriedades dos polímeros. À medida que os teores de cristalinidade aumentam em um polímero, há também o aumento do módulo elástico, além da diminuição da ductibilidade e flexibilidade. Assim, a redução da cristalinidade é uma propriedade desejada para a aplicação

pretendida, pois na confecção de produtos cosméticos como, por exemplo, máscaras e adesivos faciais para o tratamento da pele e olheiras, uma maior ductilidade permite que as membranas BC sofram deformações sem quebrar, ao mesmo tempo que o aumento da flexibilidade é capaz de proporcionar uma sensação de ajuste e conforto na pele (MEFTAH *et al.*, 2022).

4.7 TERMOGRAVIMETRIA

Para a verificação da estabilidade térmica das amostras de CB secas após os 7 dias de cultivo com os diferentes meios de cultura empregados, foram realizadas análises termogravimétricas (TGA). Os resultados de decomposição térmica obtidos encontram-se dispostos na Tabela 7 e os perfis das curvas estão ilustrados na Figura 17.

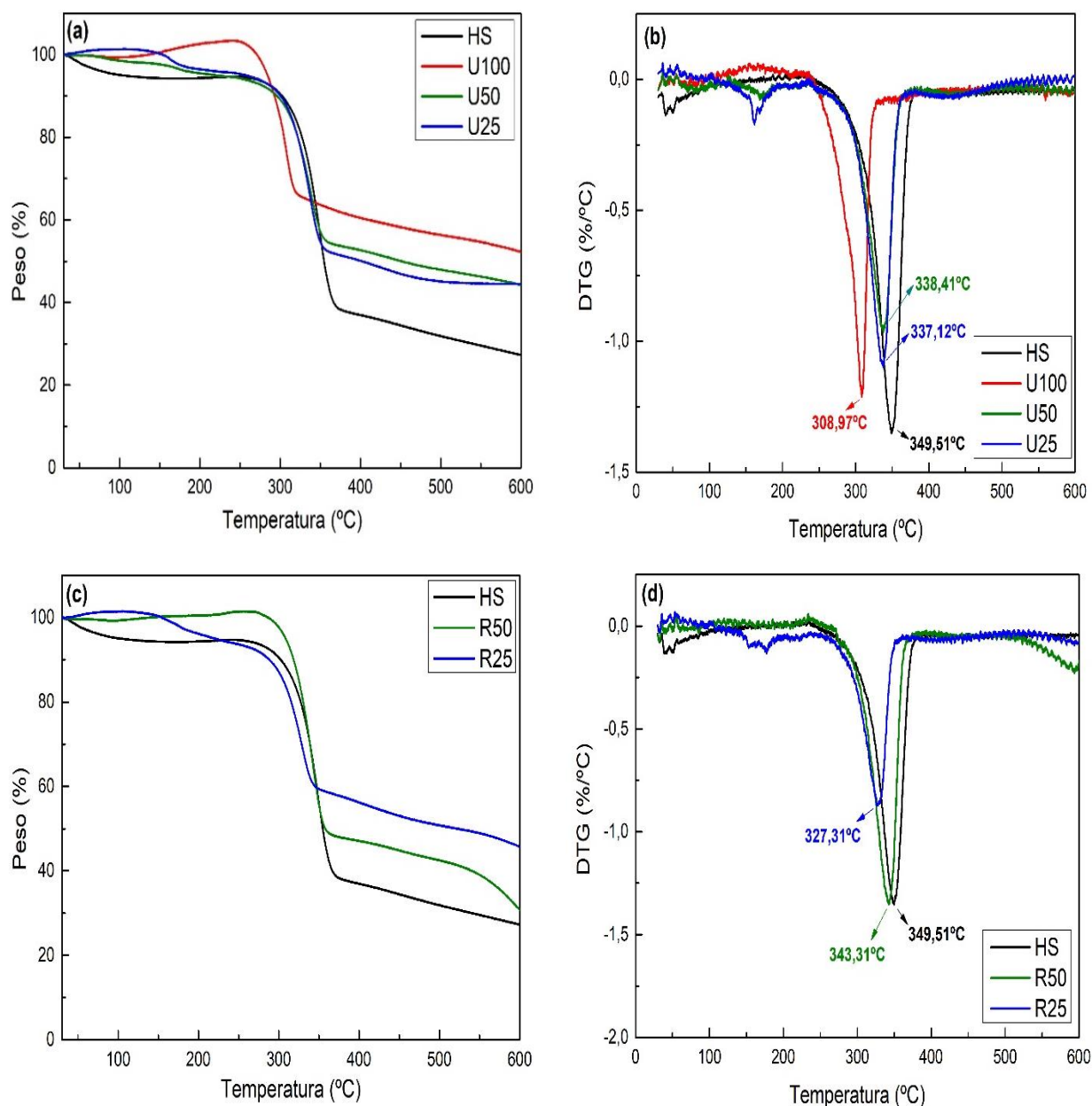
Tabela 7 – Dados de decomposição térmica das membranas de celulose bacteriana obtidas por meio das curvas de análise termogravimétrica. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método *in situ*:

T_{onset} , T_{endset} : temperaturas de início e de fim para cada estágio.

Membranas de CB	1º Estágio		2º Estágio		3º Estágio	
	(°C)		(°C)		(°C)	
	T_{onset}	T_{endset}	T_{onset}	T_{endset}	T_{onset}	T_{endset}
HS	35	104	-	-	238	383
U100	36	140	-	-	236	328
U50	52	105	127	192	239	370
U25	53	104	130	188	245	368
R50	56	110	128	225	260	369
R25	56	104	140	194	261	361

Fonte: a autora (2022).

Figura 17 – Curvas termogravimétricas das membranas de celulose bacteriana. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método *in situ*.



Fonte: a autora (2022).

A partir dos resultados dispostos na Tabela 7 e da observação dos perfis das curvas termogravimétricas (TGA e DTG) da Figura 17, é possível perceber a ocorrência de dois ou três estágios de perda de massa para todas as amostras. O primeiro refere-se à evaporação de água absorvida na membrana de CB mesmo após o processo de secagem. Em relação ao terceiro estágio, a perda de massa é associada com a própria degradação térmica da celulose bacteriana que ocorre em uma faixa de temperaturas mais altas, em torno de 236 a 380 °C. Nesta fase há um

processo característico de degradação, despolimerização, desidratação e decomposição das unidades de monossacarídeos de glicose com a consequente formação de resíduos de carbono, já que é sabido que o principal estágio de pirólise da celulose ocorre em uma faixa de temperatura de 300 a 380 °C (ZHU *et al.*, 2004). Estes resultados são muito semelhantes aos descritos na literatura (COSTA *et al.*, 2019; GAO *et al.*, 2019).

Algumas amostras produzidas com meios contendo diferentes proporções do padrão HS e dos extratos da casca de uva ou de repolho roxo (U50, U25, R50 e R25), apresentaram um segundo estágio de perda de massa intermediário em torno de 127 a 225 °C. Tal perda, provavelmente, está relacionada a alguns constituintes existentes no meio de fermentação que podem ter sido formados pela junção na composição dos meios HS com o extrato.

Um dos critérios para avaliar o processo de degradação do material é a partir de sua temperatura máxima ($T_{\text{máx}}$). Essas estão destacadas nas Figuras 17 ((b) e (d)). Para as amostras em estudo, a membrana de CB produzida com o meio padrão puro (HS) foi a que apresentou maior valor com $T_{\text{máx}} = 349$ °C. Enquanto a menor temperatura máxima de degradação foi encontrada para a membrana de CB obtida com extrato de uva puro (U100) ($T_{\text{máx}} = 308$ °C). As alterações nas temperaturas de degradação podem ser justificadas pelos componentes presentes nos extratos de uva e repolho, como polissacarídeos e alguns compostos fenólicos que devem contribuir com as alterações no processo de degradação térmica do polímero (COSTA *et al.*, 2019). No entanto, todas as membranas de CB exibiram uma decomposição máxima entre 308 e 349 °C, o que demonstra boa estabilidade térmica mesmo com a utilização dos meios alternativos.

É possível observar, ainda, uma concordância entre os valores dos índices de cristalinidade anteriormente calculados com os dados de difratometria de raios-X (Tabela 6 do item 4.6) e a tendência de degradabilidade térmica observada nas amostras. O aumento da estrutura cristalina exige uma temperatura de degradação térmica mais elevada (KESHK, 2014). Dentre as amostras produzidas, a obtida com o meio padrão HS é a que apresentou maior IC (75,61 %) e, consequentemente, maior $T_{\text{máx}}$ de degradação (349,51 °C).

Há trabalhos que também inferem a estabilidade referente ao conteúdo de massa residual. Nesse caso, os meios contendo os extratos de uva e repolho roxo apresentam maiores percentuais de massa residual que a CB no meio de HS. Isso

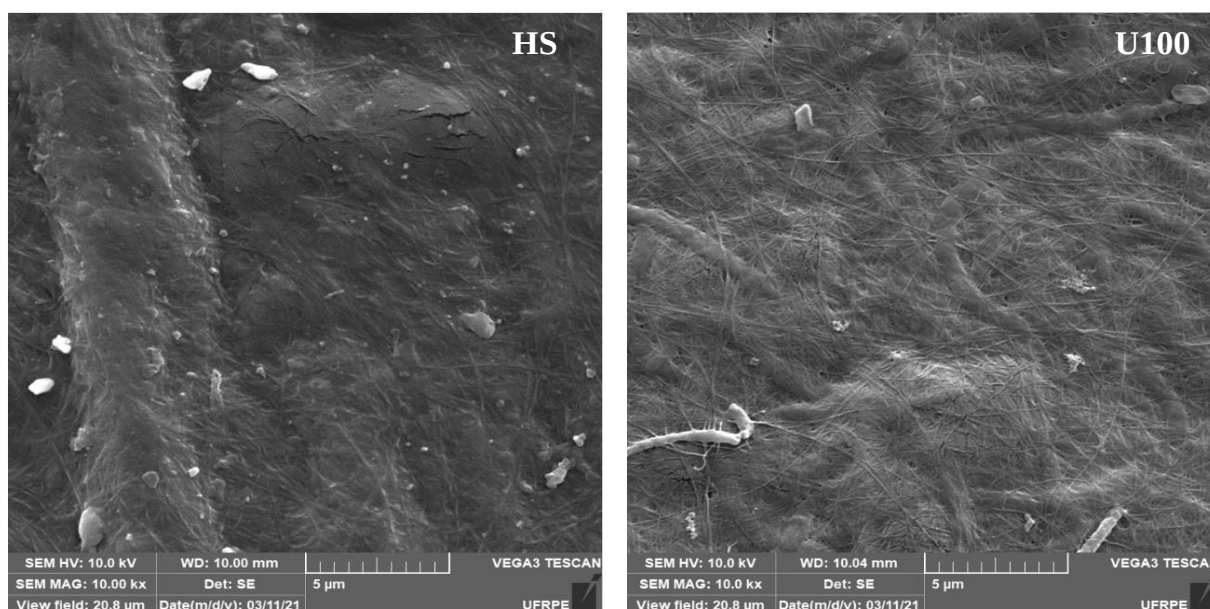
ratifica que a estabilidade dessas membranas está associada as estruturas químicas das antocianinas e compostos fenólicos que são relativamente estáveis ao calor (SANI *et al.*, 2021; GALDINO *et al.*, 2022).

É necessário destacar também que, em todas as curvas, não foi observado a estabilização na faixa de temperatura estudada, sugerindo que o processo de degradação continua ocorrendo até temperaturas mais altas (acima dos 600 °C). Ademais, pode-se concluir que estes meios alternativos empregados na biossíntese de CB contribuem para reduzir o custo de sua produção, ao mesmo tempo que conseguem manter uma boa estabilidade térmica dos materiais produzidos.

4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

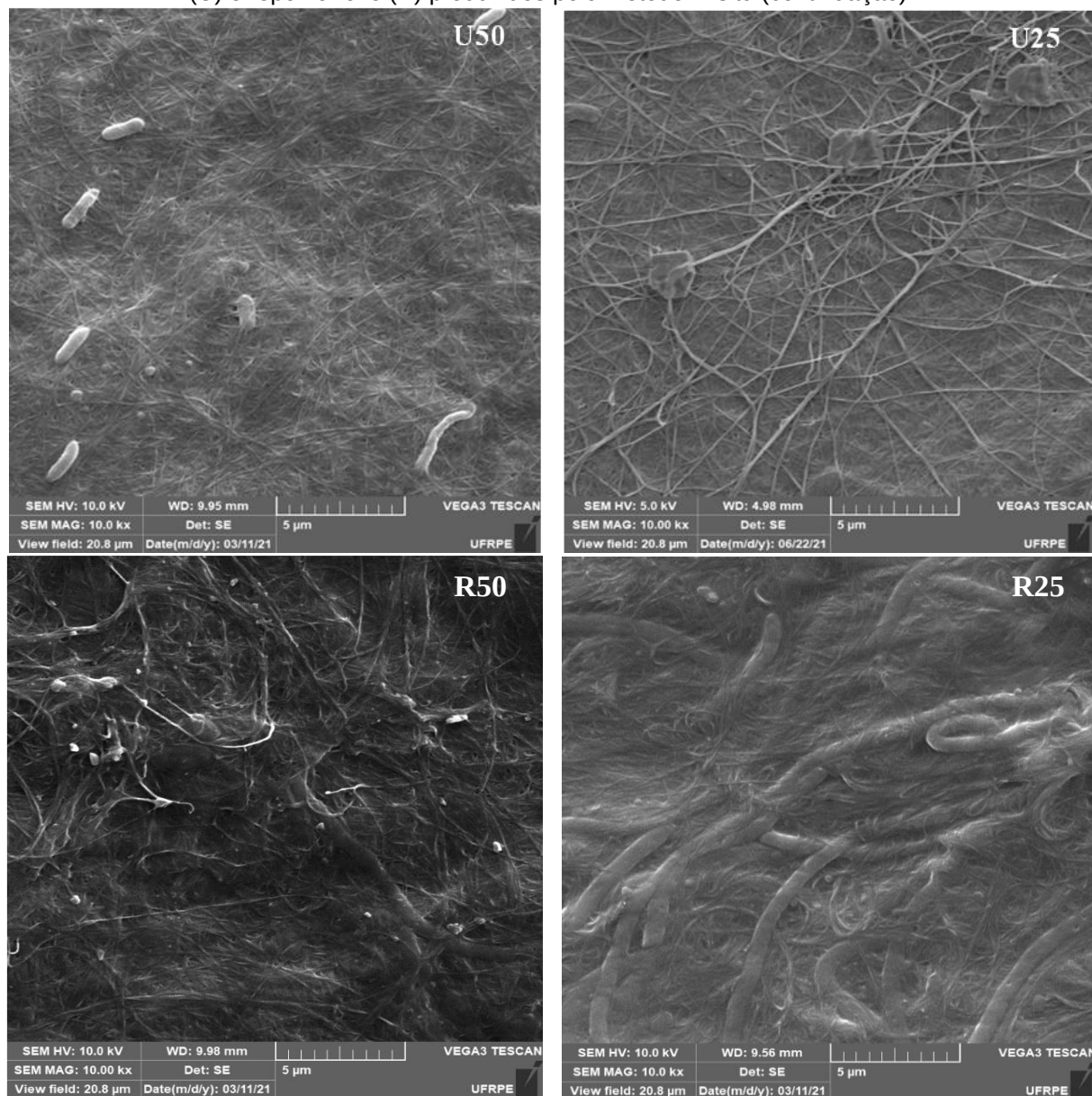
Para avaliar as morfologias das membranas produzidas foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens das membranas de CB secas obtidas após os 7 dias de cultivo para as membranas produzidas com os diferentes meios de produção empregados estão dispostas na Figura 18.

Figura 18 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura das membranas de celulose bacteriana. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método *in situ* (continua).



Fonte: a autora (2022).

Figura 18 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura das membranas de celulose bacteriana. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método in situ (continuação).



Fonte: a autora (2022).

Pela análise da Figura 18 é possível observar que mesmo com o emprego de meios de cultivo modificados com extrato de uva e repolho roxo, a morfologia característica da CB foi evidenciada. Todas as amostras apresentaram um aspecto de estrutura reticulada nanofibrilar ultrafina com distribuição irregular das fibras, dispostas em uma rede na forma tridimensional porosa, conforme dados já evidenciados na literatura (WANG *et al.*, 2021; GALDINO *et al.*, 2020). A morfologia nanométrica da CB resulta em uma elevada capacidade de retenção de água (CRA),

resultado esse que corrobora com os obtidos para as amostras em estudo, CRA em torno de 98% (conforme dados já apresentados no item 4.3).

Nas micrografias dispostas na Figura 18, é também possível perceber a presença de algumas células bacterianas, no formato de bacilos, encapsuladas na estrutura nanofibrilar. A presença das células bacterianas na rede de CB é muito comum de acontecer, uma vez que as fibras de CB são produtos da excreção dessas células, podendo essas ficarem aprisionadas entre as fibras. O processo de esterilização é que vai ser decisivo na inativação das células. A purificação das membranas por meio do uso de solução de NaOH à quente pode não ser eficiente para promover a morte celular em níveis adequados a depender da aplicação dessas membranas, como, por exemplo, nas áreas de cosméticos ou biomédicas.

Após as caracterizações com avaliação estrutural, estabilidade térmica e morfologia das membranas de CB obtidas, foi realizada a técnica de esterilização por irradiação gama. Em seguida, as amostras foram novamente submetidas as caracterizações com o intuito de avaliar a influência da utilização desse processo nas propriedades das membranas produzidas.

4.9 ESTERILIZAÇÃO DAS AMOSTRAS VIA IRRADIAÇÃO GAMA

A produção da CB envolve o emprego de bactérias que permanecem apoiadas ou aprisionadas na membrana polimérica e protegidas pelas redes nanofibrilares formadas, conforme pôde ser observado pelos resultados obtidos através da microscopia eletrônica de varredura (ver item 4.8). Foi comprovado, ainda, pelo grupo de pesquisa, que a técnica de purificação tradicional (NaOH e aquecimento) muitas vezes não inativa as células bacteriana aprisionadas nas membranas de CB. Após submeter as membranas purificadas a testes de inoculação em meio de cultura, foi revelada a contínua produção de CB, confirmando a viabilidade da bactéria mesmo após o processo de purificação.

Outro fator determinante, que inviabilizou a utilização da purificação tradicional com NaOH à quente, foi algumas das características das membranas produzidas com a utilização dos meios modificados com os extratos da casca de uva e do repolho roxo. Tais amostras demonstraram sensibilidade a variações de pH, a partir de alterações de coloração. Além disso, foi considerada a possível influência da

temperatura nas características das substâncias de interesse com propriedades antioxidantes que compunham as amostras.

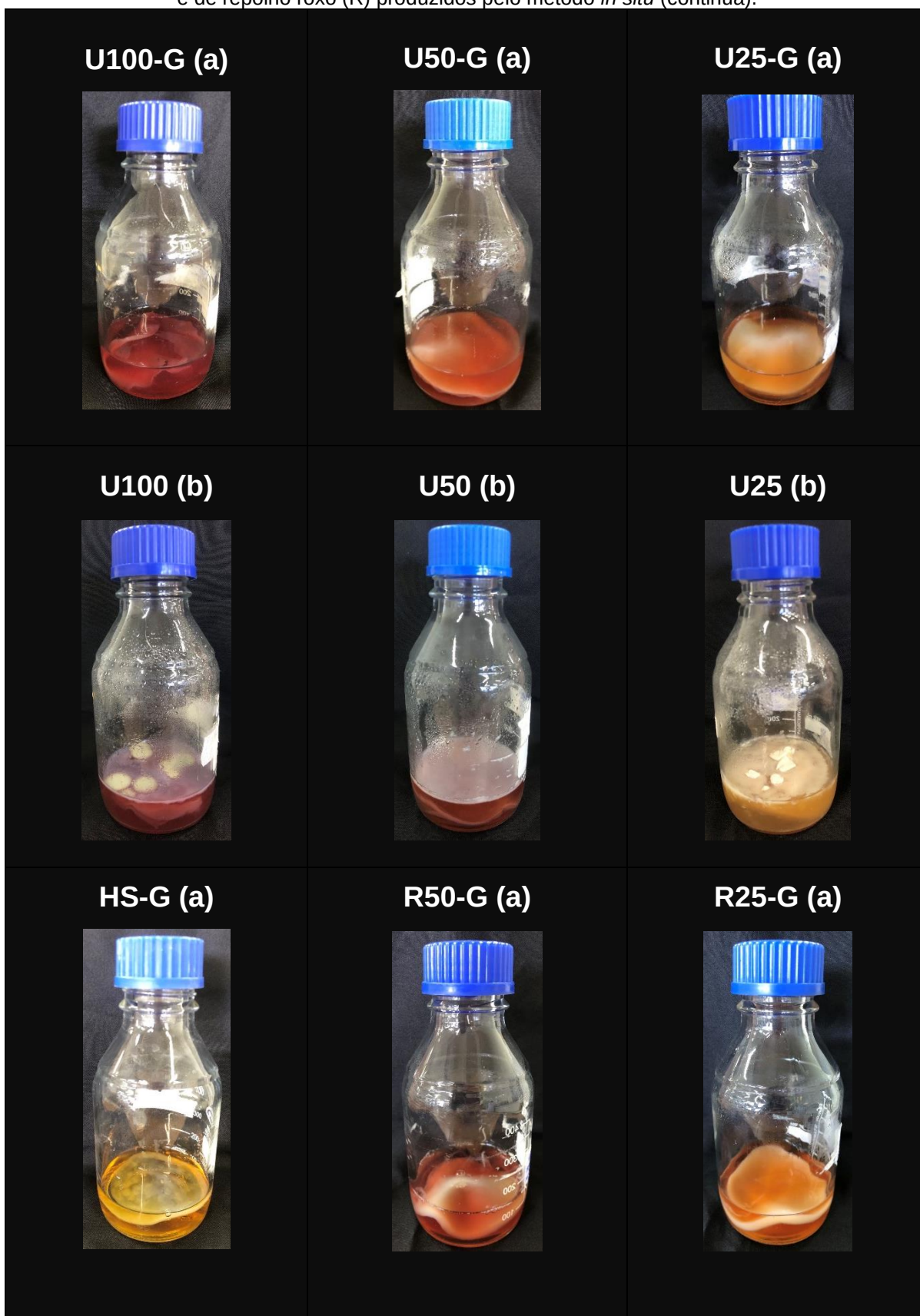
Por estes motivos, foi proposta a utilização do processo de esterilização pela técnica de irradiação gama como uma alternativa ao método de purificação com NaOH à quente tradicionalmente empregado (Hwang *et al.* 1999). As amostras produzidas pelo método *in situ* com os meios alternativos, bem como as membranas produzidas com meio HS padrão após a aditivação *ex situ* foram então submetidas à irradiação.

Dentre os possíveis métodos de esterilização que poderiam ser testados, a irradiação gama das amostras foi empregada por se tratar de uma técnica bastante utilizada como método de esterilização a frio para produtos com aplicações nos ramos da biomedicina, dos cosméticos e farmacêuticos (SALARI *et al.*, 2021). Tais aplicações exigem a utilização de métodos específicos capazes de inativar micro-organismos potencialmente nocivos e evitar infecções humanas graves (BEH *et al.*, 2019).

4.9.1 Teste de eficiência da esterilização na inativação celular

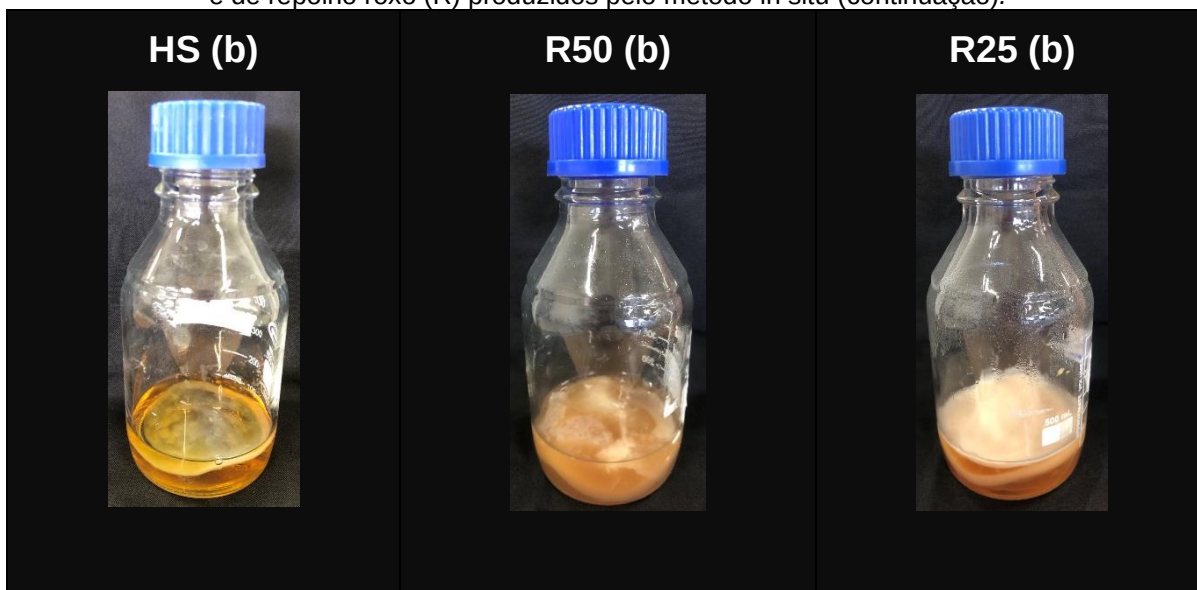
Para determinar da eficiência do processo de esterilização foram realizados testes de crescimento microbiológico para todas as membranas de CB produzidas antes e após serem submetidas ao processo de esterilização por radiação gama. Os resultados obtidos para as amostras com e sem esterilização estão dispostos na Figura 19.

Figura 19 - Teste de crescimento de micro-organismos com (a) membranas de celulose bacteriana esterilizadas por irradiação gama (G), (b) membranas de celulose bacteriana não esterilizadas. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e de repolho roxo (R) produzidos pelo método *in situ* (continua).



Fonte: a autora (2022).

Figura 19 – Teste de crescimento de micro-organismos com (a) membranas de celulose bacteriana esterilizadas por irradiação gama (G), (b) membranas de celulose bacteriana não esterilizadas. HS: meio padrão. U100, U50, U25, R50, R25: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e de repolho roxo (R) produzidos pelo método *in situ* (continuação).



Fonte: a autora (2022).

Conforme evidenciado na Figura 19 (a), todas as membranas de CB esterilizadas por radiação gama, não demonstraram nenhuma evidência de crescimento celular da bactéria *Komagataeibacter hansenii* ou de fungos. Verifica-se, ainda, que os meios de cultura permaneceram sem turvação e nenhuma presença de bolores ou novas películas em crescimento. Enquanto para as amostras que não foram esterilizadas por radiação gama (Figura 19 (b)) é possível perceber a presença de turbidez dos meios de cultura com crescimento celular e presença de uma nova membrana de CB na superfície do meio, assim como a ocorrência de contaminação de algumas amostras, possivelmente por fungos. Esses resultados confirmam que o processo de esterilização por irradiação gama foi eficiente para possibilitar a inativação celular, sem a presença de células viáveis no interior das fibras da CB que possa promover novo crescimento da membrana mesmo em condições de cultivo favoráveis.

Dentre as amostras avaliadas, apenas a produzida com o meio HS padrão não foi observada contaminação com a presença de bolores antes dela ser submetida ao processo de esterilização (Figura 19 (HS-G(a))). Tal resultado pode ser justificado pelo procedimento tradicional de purificação com hidróxido de sódio (NaOH) à quente utilizado. No entanto, conforme já destacado no item 3.6, a utilização de tal método para as demais amostras tornou-se inviável, pois as membranas produzidas com os

meios alternativos mostraram-se sensíveis a variações de pH e a temperatura com risco de alteração e/ou inativação dos compostos antioxidantes de interesse, como, por exemplo, as antocianinas substâncias presentes nos extratos da casca de uva e do repolho roxo, que foram utilizados nos meios de fermentação.

Ademais, é também importante destacar que não é possível garantir que o processo de purificação utilizado para a membrana de CB produzida com meio HS tenha sido suficiente para promover uma inativação celular completa. As células bacterianas que se encontram aprisionadas na rede fibrilar, em determinadas áreas mais internas da membrana, podem ainda apresentar-se viáveis, visto que a técnica de purificação com hidróxido de sódio (NaOH) à quente não é um método de alto poder de penetração. Em consequência, essas células podem acarretar produção de nanofibras locais na forma de aglomerados.

Após o processo de esterilização e a avaliação de sua eficiência, as membranas de CB obtidas foram secas e submetidas as diferentes técnicas de caracterizações com o intuito de observar as possíveis alterações nas suas propriedades físico-químicas.

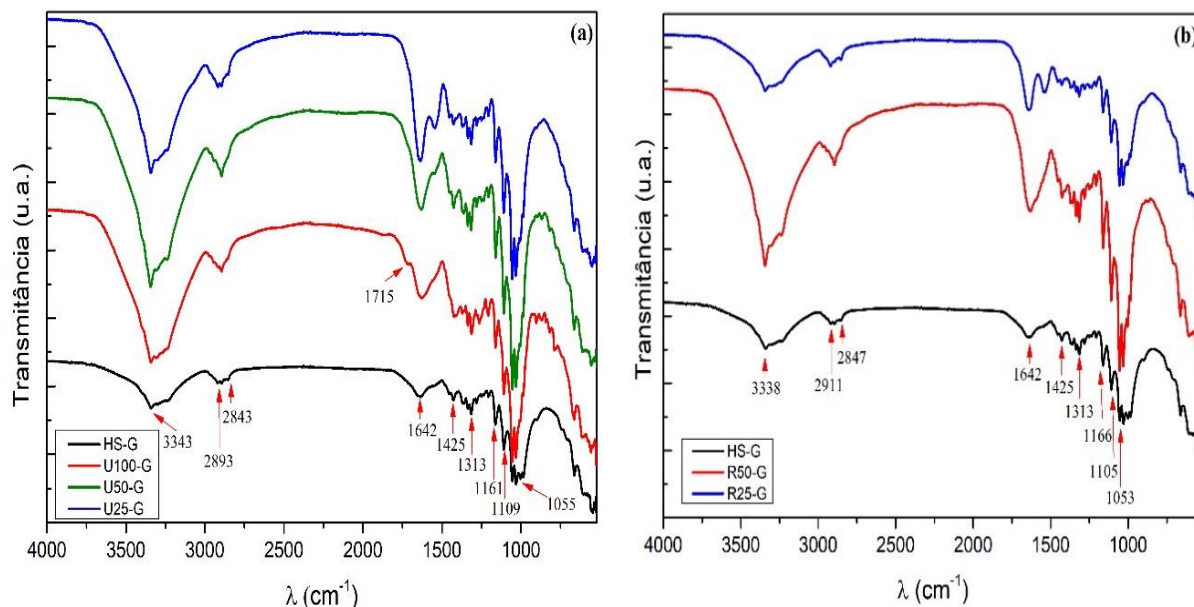
4.9.2 Caracterização das membranas de celulose bacteriana após a esterilização por irradiação gama

Após serem submetidas ao processo de esterilização por irradiação gama, as membranas de CB produzidas foram novamente caracterizadas pelas mesmas técnicas utilizadas anteriormente. Tal procedimento foi realizado com o intuito de verificar possíveis alterações estruturais que possam ter sido ocasionadas nas amostras após o processo de esterilização.

4.9.2.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

As membranas de CB obtidas através dos diferentes meios de cultivo após os 7 dias de produção foram esterilizadas via irradiação gama e posteriormente secas. Tais amostras também foram submetidas a análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e os gráficos obtidos estão dispostos na Figura 20.

Figura 20 – Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das membranas de celulose bacteriana esterilizadas com irradiação gama. HS-G: meio padrão. U100-G, U50-G, U25-G, R50-G, R25-G: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método *in situ*.



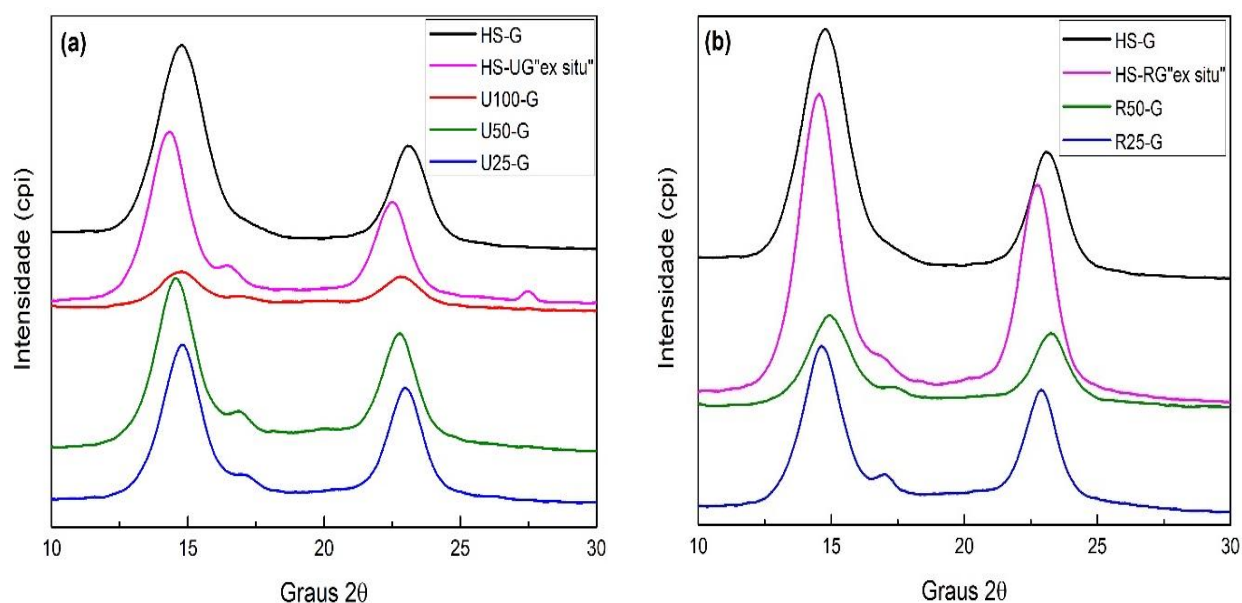
Fonte: a autora (2022).

A partir dos espectros dispostos na Figura 20 foi possível observar que as bandas encontradas nas amostras após o processo de esterilização por irradiação gama a 25 KGy se mantiveram idênticas a das amostras não esterilizadas, sem alterações em suas posições (ver item 4.5). Tais resultados indicaram que a irradiação empregada não foi capaz de alterar a estrutura da cadeia polimérica das membranas obtidas. Dados semelhantes também foram observados por Salari e colaboradores (2021) quando estudaram a influência de diferentes doses de irradiação gama nas propriedades de compósitos baseados em celulose bacteriana e por Hodder e colaboradores (2019) com a avaliação de vários métodos de esterilização nas propriedades da metil-celulose. De posse destes resultados, passou-se então a análise de difratometria de raios-X.

4.9.2.2 Difratometria de Raios-X

Após serem submetidas ao processo de esterilização por irradiação gama, as membranas de CB foram novamente avaliadas quanto as suas estruturas cristalinas e amorfa pela técnica de DRX. Os espectros obtidos estão dispostos na Figura 21.

Figura 21 – Difrátogramas de Raios-X das membranas de celulose bacteriana esterilizadas com irradiação gama. HS-G: meio padrão. U100-G, U50-G, U25-G, R50-G, R25-G: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método *in situ*. HS-UG"ex situ", HS-RG"ex situ": produzidas pelo método *ex situ*.



Fonte: a autora (2022).

Os difratogramas ilustrados na Figura 21 são muito semelhantes aos já observados para as amostras antes da exposição a irradiação (Figura 16 do item 4.6). Tais resultados indicam que o tratamento não resultou na criação de novos planos cristalinos de simetria, conforme já relatado anteriormente por Paula e colaboradores (2019). De posse dos novos dados de DRX, foram novamente calculados os IC para cada uma das amostras irradiadas por meio do método descrito por Segal e colaboradores (1959). Estes valores encontram-se dispostos na Tabela 8.

Tabela 8 – Índices de cristalinidade das membranas de celulose bacteriana esterilizadas com irradiação gama. HS-G: meio padrão. U100-G, U50-G, U25-G, R50-G, R25-G: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método *in situ*. HS-UG“ex situ”, HS-RG“ex situ”: membranas produzidas pelo método *ex situ*.

Membranas de CB	Índice de cristalinidade (IC)
	$\mu \pm \sigma$
Hestrin-Schramm (HS-G)	75,36 $\pm$ 0,27
Uva 100% (U100-G)	56,37 $\pm$ 0,48
Uva 50% (U50-G)	47,35 $\pm$ 1,52
Uva 25% (U25-G)	56,01 $\pm$ 0,21
HS-UG“ex situ”	72,61 $\pm$ 0,32
Repolho 50% (R50-G)	41,78 $\pm$ 1,99
Repolho 25% (R25-G)	44,02 $\pm$ 0,84
HS-RG“ex situ”	73,60 $\pm$ 0,35

μ = média. σ = desvio padrão.

Fonte: a autora (2022).

Na avaliação dos valores obtidos para as membranas irradiadas (Tabela 8), é possível perceber um decaimento dos IC para todas as amostras quando são comparados aos IC antes das amostras passarem pelo processo de esterilização por irradiação (Tabela 6 do item 4.6). Tal tendência de decaimento foi pequena para a maioria das membranas em estudo. Esses dados podem sugerir que as diferenças observadas estão dentro do erro já esperado na determinação, conforme já foi relatado anteriormente na literatura (HWANG *et al.*, 2021). Em contrapartida, as amostras U50 e R50 tiveram reduções consideráveis de 21,11% e 39,18%, respectivamente. Mais investigações são necessárias para explicar o aumento das regiões amorfas para essas amostras.

No caso das membranas produzidas pelo método de aditivação *ex situ* (HS-UG“ex situ” e HS-RG“ex situ”), foram observados valores de IC semelhantes a amostra obtida pelo meio padrão (HS-G). Tais resultados eram esperados, pois não houve alteração no processo de produção das membranas de CB e a consequente adição do extrato só ocorre após sua produção. A incorporação do extrato pelo método *ex situ* permite a utilização da CB como principal componente da matriz polimérica,

não sendo capaz de modificar a estrutura do material. Desta forma, muitas de suas características permanecem intactas, permitindo a adição de novas propriedades. Esse comportamento é uma das principais vantagens da utilização do método *ex situ*, conforme já relatado por Cazón *et al.* (2021).

4.9.2.3 Termogravimetria

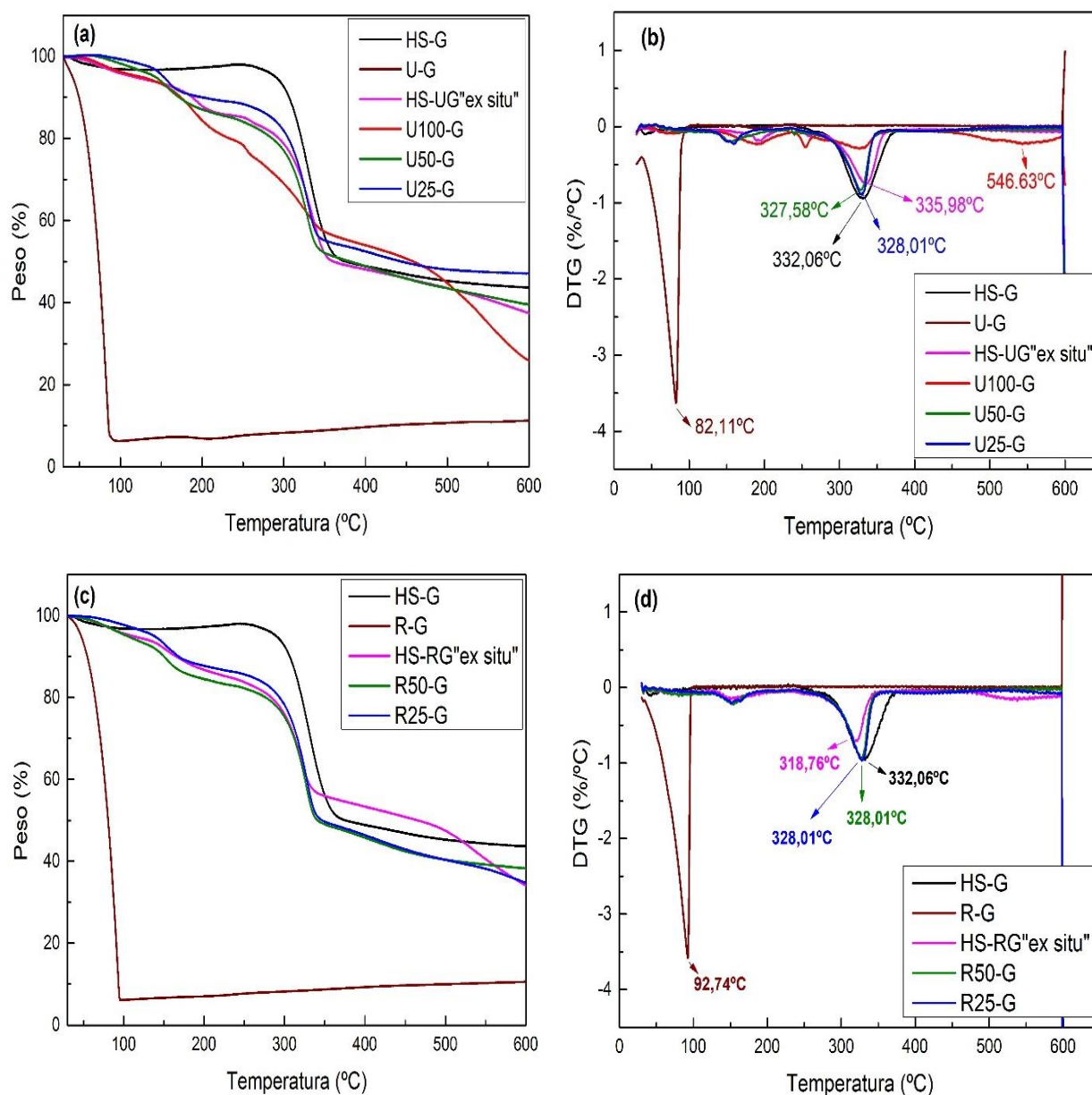
Os resultados de decomposição térmica e os perfis das curvas de TGA e DTG para os extratos utilizados como meios de fermentação e para as membranas de CB esterilizadas produzidas pelos métodos de aditivação *in situ* e *ex situ* estão dispostos na Tabela 9 e na Figura 22, respectivamente.

Tabela 9 – Dados de decomposição térmica das membranas de celulose bacteriana esterilizadas obtidas por meio das curvas de análise termogravimétrica. HS-G: meio padrão. U100-G, U50-G, U25-G, R50-G, R25-G: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U-G) e repolho roxo (R-G) produzidos pelo método *in situ*. HS-UG“*ex situ*”, HS-RG“*ex situ*”: membranas produzidas pelo método *ex situ*. T_{onset}, T_{endset}: temperaturas de início e fim para cada estágio.

CB	1º Estágio (°C)		2º Estágio (°C)		3º Estágio (°C)		4º Estágio (°C)		5º Estágio (°C)	
	T _{onset}	T _{endset}	T _{onset}	T _{endset}	T _{onset}	T _{endset}	T _{onset}	T _{endset}	T _{onset}	T _{endset}
HS-G	38	97	-	-	236	382	-	-	-	-
U-G	37	96	-	-	-	-	-	-	-	-
HS-UG “ <i>ex situ</i> ”	37	109	147	227	241	268	278	367	-	-
U100-G	38	110	128	235	235	265	265	370	440	596
U50-G	56	100	134	188	239	359	-	-	-	-
U25-G	56	103	129	190	238	359	-	-	-	-
R-G	34	95	-	-	-	-	-	-	-	-
HS-RG “ <i>ex situ</i> ”	37	99	134	186	-	-	270	341	-	-
R50-G	58	106	130	180	-	-	271	351	-	-
R25-G	58	106	130	180	-	-	271	351	-	-

Fonte: a autora (2022).

Figura 22 – Curvas termogravimétricas das membranas de celulose bacteriana esterilizadas. HS-G: meio padrão. U100-G, U50-G, U25-G, R50-G, R25-G: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método *in situ*. HS-UG“ex situ”, HS-RG“ex situ”: membranas produzidas pelo método *ex situ*.



Fonte: a autora (2022).

De acordo com os dados dispostos na Tabela 9 e os perfis das curvas termogravimétricas ilustrados na Figura 22, observa-se que para os extratos da casca de uva e de repolho roxo foram observados a existência de um único estágio em faixas de temperatura em torno de 34 a 97 °C. Este refere-se tanto à saída de água que compõe grande parte dos extratos produzidos, quanto à possível degradação de boa parte dos seus constituintes.

Para as amostras produzidas pelo método de aditivização *ex situ* (HS-UG“*ex situ*” e HS-RG“*ex situ*”) foi observado a presença de estágios intermediários quando se compara com a amostra obtida pelo meio padrão (HS-G). Tais resultados sugerem a ocorrência de uma possível interação entre os constituintes que compõem os extratos e os presentes no meio HS padrão, tendência já evidenciada para as membranas produzidas com essa junção pelo método de aditivização *in situ*.

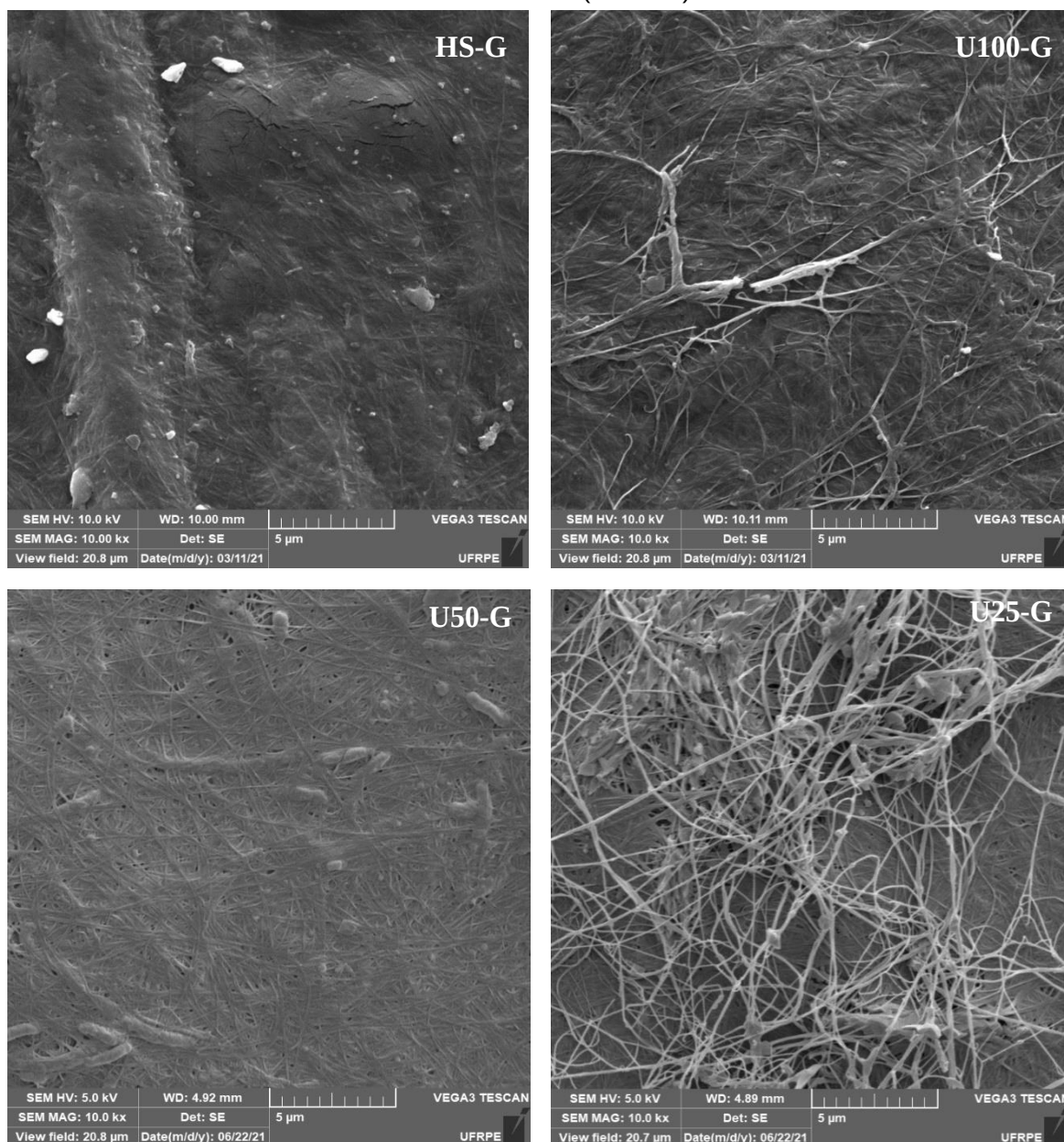
No caso da maioria das amostras produzidas pelo método de aditivização *in situ* com o meio HS padrão e diferentes proporções dos extratos e meio HS (HS-G, U50-G, U25-G, R50-G, R25-G), foram observados perfis de degradação térmica similares em comparação com as mesmas amostras antes de passarem pelo processo de irradiação (ver item 4.7). A exceção ocorreu para a membrana produzida com o extrato da casca de uva puro (U100-G). Nela foram encontradas alterações significativas com o surgimento de diferentes estágios de degradação. Estes estágios podem ser justificados por mudanças estruturais ocasionadas na CB após exposição à irradiação gama. Dentre as amostras estudadas, a U100 foi a que apresentou a menor espessura, ou seja, menor rendimento ($84,45 \pm 2,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Isso resulta em uma menor concentração de fibras em sua estrutura, sugerindo que a dose de irradiação gama utilizada para a esterilização (25 kGy) foi muito alta para essa amostra, levando a ocorrência de alterações estruturais na membrana. Os estágios adicionais apresentados para essa amostra, podem estar associados a degradação de constituintes do extrato, como polissacarídeos e compostos fenólicos, os quais estão presentes em maior concentração.

Com relação as temperaturas máximas de degradação das amostras ($T_{\text{máx}}$) após serem submetidas a irradiação, foi possível perceber pequenas alterações com tendência de redução para a maioria das amostras. Em geral, o processo de irradiação gama promove a formação de radicais permitindo a criação de centros reativos durante a exposição das membranas ao processo (PAULA *et al.*, 2019). De acordo com Salari e colaboradores (2021), o efeito da irradiação gama nas propriedades térmicas dos biopolímeros está diretamente relacionado ao tipo de biopolímero e a dosagem de radiação empregada no processo. Como consequência desses fatores é possível observar um aumento, uma diminuição ou até inalteração da temperatura máxima obtida nos materiais após serem submetidos ao processo de irradiação.

4.9.2.4 Microscopia eletrônica de varredura

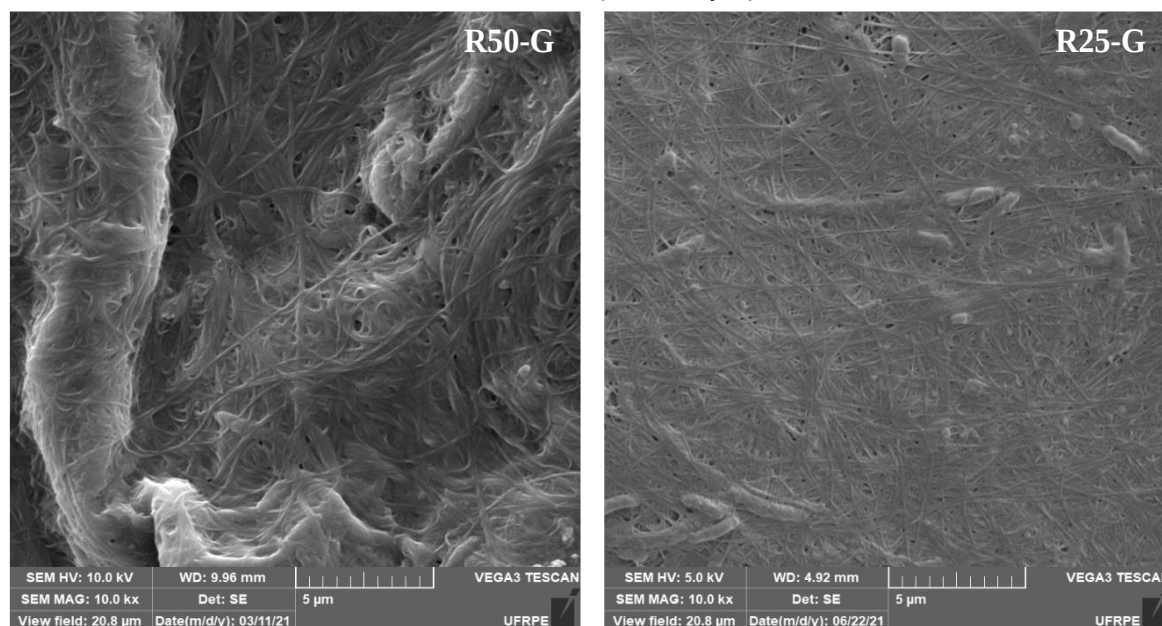
As micrografias das membranas de CB secas após os 7 dias de cultivo produzidas com os diferentes meios de produção empregados após serem submetidas ao processo de irradiação gama estão ilustradas na Figura 23.

Figura 23 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura das membranas de celulose bacteriana esterilizadas com irradiação gama. HS-G: meio padrão. U100-G, U50-G, U25-G, R50-G, R25-G: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método *in situ* (continua).



Fonte: a autora (2022).

Figura 23 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura das membranas de celulose bacteriana esterilizadas com irradiação gama. HS-G: meio padrão. U100-G, U50-G, U25-G, R50-G, R25-G: meios com diferentes composições dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) produzidos pelo método *in situ* (continuação).



Fonte: a autora (2022).

Nas imagens mostradas na Figura 23 é possível observar que a estrutura tridimensional com aspecto nanofibrilar dessas amostras se mantiveram, o que evidencia uma aparente manutenção da morfologia mesmo após o processo de irradiação gama. Nas imagens é possível perceber ainda a presença de células bacterianas encapsuladas na estrutura nanofibrilar. No entanto, pela realização do teste de eficiência do processo de esterilização (ver item 4.9.1) foi confirmado que as células aprisionadas na estrutura após o processo de esterilização foram possivelmente inativadas, pois não foi evidenciado o aparecimento de contaminação.

Após a avaliação das propriedades físico-químicas das membranas esterilizadas, foi avaliada a capacidade antioxidante das amostras obtidas pelos diferentes métodos de aditivação *in situ* e *ex situ*, bem como dos extratos da casca de uva e do repolho roxo.

4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Com o intuito de verificar a capacidade antioxidante foi avaliado os valores de inibição da atividade antioxidante por meio da técnica de DPPH. Tal verificação foi realizada tanto nos extratos da casca de uva e de repolho roxo produzidos, bem como

para as membranas de celulose bacteriana obtidas pelos métodos *in situ* e *ex situ* (Tabela 10).

Tabela 10 – Atividade antioxidante dos extratos de uva (U) e repolho roxo (R) puros e das membranas de celulose bacteriana esterilizadas com irradiação gama. U100-G, U50-G, U25-G, R50-G, R25-G: meios com diferentes composições dos extratos produzidos pelo método *in situ*. HS-UG“*ex situ*”, HS-RG“*ex situ*” produzidos pelo método *ex situ*.

Membranas de CB	Inibição DPPH* (%)
Extrato de Uva (U)	38,5 ± 0,3
Extrato de Repolho (R)	28,1 ± 0,5
Uva 100% (U100-G)	35,6 ± 0,4
Uva 50% (U50-G)	22,1 ± 0,7
Uva 25% (U25-G)	12,9 ± 0,9
HS-UG“ <i>ex situ</i> ”	30,0 ± 0,6
Repolho 50% (R50-G)	21,1 ± 0,7
Repolho 25% (R25-G)	11,1 ± 0,8
HS-RG“ <i>ex situ</i> ”	19,8 ± 0,4

μ = média. σ = desvio padrão.

Fonte: a autora (2022).

Os resultados apresentados na Tabela 10 para todas as amostras produzidas pelo método *in situ* demonstram que ocorreu um decaimento da atividade antioxidante, que está diretamente relacionado com a redução da quantidade do extrato na composição de cada meio. Estes resultados confirmam que a incorporação desses extratos nas membranas de CB é a responsável pela adição da propriedade antioxidante nestes materiais, como já relatado por Yorghanlu e colaboradores (2021) com o estudo de filmes produzidos por nanocompósitos em que houve a introdução de atividade antioxidante aos materiais após a adição de essência de semente de uva.

É importante ainda destacar que a adição da propriedade antioxidante nas membranas de CB produzidas ocorre, principalmente, pela presença de altos teores de compostos fenólicos encontrados nas matrizes utilizadas para a obtenção dos extratos, como é o caso do emprego da casca de uva e do repolho roxo. Tal fato é o

que permite uma ampla aplicação de extratos de diferentes compostos naturais com uma composição rica em substâncias com propriedades antioxidantes, conforme já relatado no trabalho desenvolvido por Kalantari e pesquisadores (2020) em que eles descrevem estudo da extração de componentes bioativos com atividade antioxidante da casca de romã.

Com relação aos extratos puros da casca de uva e de repolho roxo, os valores de inibição da atividade antioxidante foram de $38,5 \pm 0,3 \%$ e $28,1 \pm 0,5 \%$, respectivamente. Enquanto para as amostras produzidas com esses extratos pelo método de aditivação *ex situ* (HS-UG“*ex situ*” e HS-RG“*ex situ*”) foi observada a manutenção de atividades nos valores de $30,3 \pm 0,6 \%$ e $19,8 \pm 0,4 \%$. Esses resultados são muito próximos aos encontrados para os extratos puros. Tais reduções são pouco significativas e encontram-se dentro do esperado, visto que existe uma dificuldade associada à migração do extrato após sua incorporação na membrana.

No caso das amostras de CB obtidas pelo método *in situ*, os valores de inibição da atividade antioxidante variaram de acordo com o percentual de extrato utilizado nos meios de produção. A membrana produzida com o meio contendo o extrato da casca de uva puro (U100-G) foi, dentre as amostras, a que apresentou o maior valor de inibição da atividade antioxidante ($35,6 \pm 0,4 \%$). Tal resultado corresponde a um decaimento muito pequeno quando comparado ao valor encontrado para o extrato puro. Esta diminuição pode ser considerada pouco relevante quando se leva em consideração a degradação natural de substâncias, como por exemplo a antocianina, presentes nesse extrato durante o tempo de produção da CB. De modo geral, os valores de inibição da atividade antioxidante para todas as amostras foram bastante promissores.

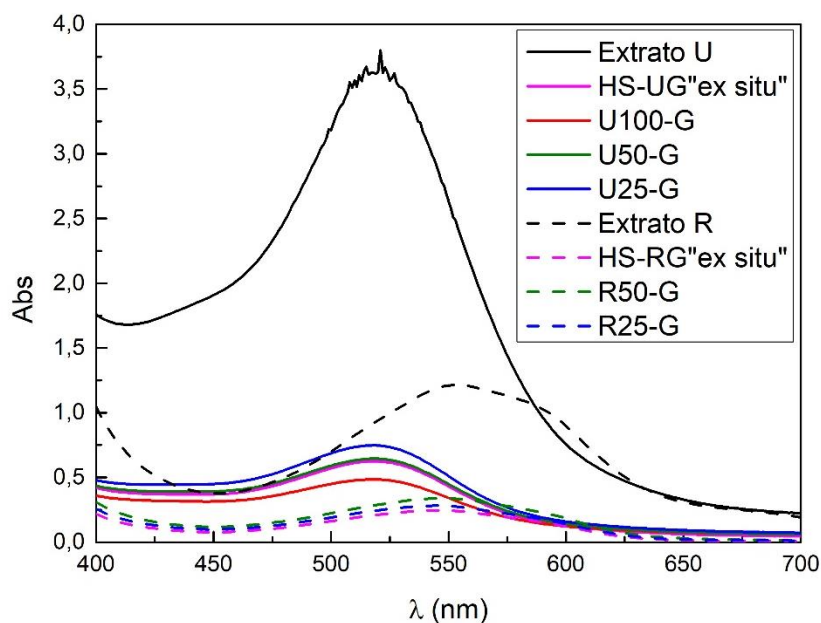
Após o estudo das características antioxidantes nos materiais produzidos foi realizada uma avaliação da capacidade desses compostos serem liberados em meio simulado com a utilização de água.

4.11 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE LIBERAÇÃO DOS EXTRATOS EM ÁGUA

Para determinar a capacidade de liberação dos extratos contidos nas membranas de CB, foi realizada uma análise do desprendimento destes quando as CB foram colocadas em contato com água. Sendo assim, após 24 h alíquotas da

amostra de água em contato com as membranas foram submetidas a análise de UV/Vis através de varredura espectral de 400-700 nm (Figura 24).

Figura 24 - Varredura espectral de (400-700nm) para os extratos de uva (U) e repolho roxo (R) puros e os sobrenadantes após contato das membranas de celulose bacteriana esterilizadas com irradiação gama. U100-G, U50-G, U25-G, R50-G, R25-G: meios com diferentes composições dos extratos produzidos pelo método *in situ*. HS-UG“ex situ”, HS-RG“ex situ”: produzidas pelo método *ex situ*.



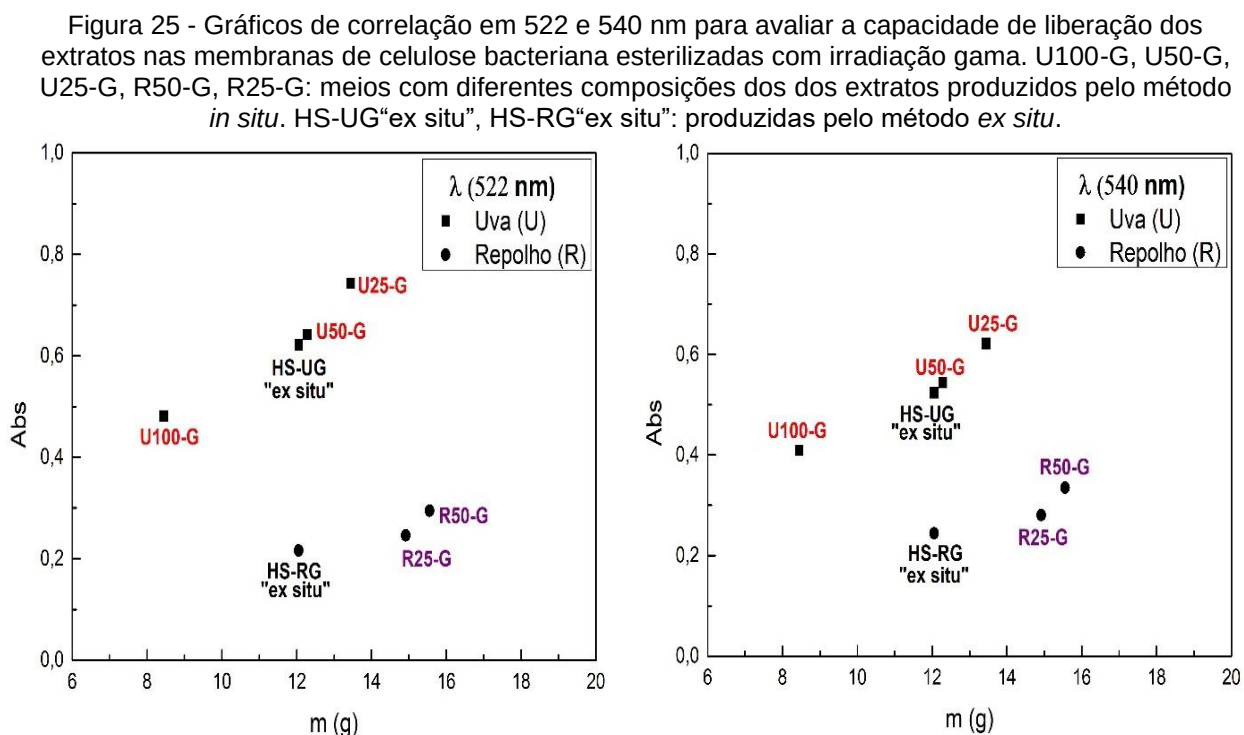
Fonte: a autora (2022).

Após a análise dos espectros obtidos (Figura 24) foram selecionados os comprimentos de onda (λ) de 522 e 540 nm para avaliar o comportamento da absorbância e a capacidade das amostras na liberação dos extratos em água. Nestes λ foram observados os picos que indicam a coloração dos extratos da casca de uva e do repolho roxo empregados, respectivamente. Além disso, analisando a Figura 24, percebe-se que há diferentes intensidades dos picos para cada tipo de extrato e há também uma diminuição da intensidade dos picos a depender da concentração de extrato utilizado. Os picos com as maiores intensidades são observados para a análise com os extratos puros (Extrato U e Extrato R).

Verificou-se, ainda, que para cada uma das membranas produzidas (com os diferentes extratos e suas concentrações), o rendimento obtido das membranas de CB está associado a capacidade de absorção do respectivo extrato empregado, conforme descrito no procedimento utilizado para incorporação dos extratos nas membranas de CB (item 3.7). Dentre as amostras obtidas, a membrana produzida com extrato de uva 100% (U100) foi a que apresentou o menor rendimento. Em

contrapartida, a membrana produzida com 50% do extrato de repolho roxo e 50% de meio padrão HS (R50) conduziu a um maior rendimento, de acordo com os resultados anteriormente dispostos na Tabela 3 (item 4.1).

Ao passar para etapa de avaliação da liberação do extrato, seguiu-se com a adição prévia através do método *ex situ* (conforme descrito no item 3.7) de uma quantidade determinada do extrato puro de uva e repolho. Para entender melhor a relação entre o rendimento (%) de cada membrana e a liberação dos extratos estudados em água, foram gerados gráficos de correlação para cada um dos λ selecionados. Para tal, também foram avaliados os dois parâmetros para as membranas produzidas com o meio HS. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 25.



Fonte: a autora (2022).

A partir da análise da Figura 25 foi possível observar a existência de uma correlação positiva entre o rendimento das membranas e a liberação do extrato em água. Neles foram constatados aumento da absorbância à medida que houve uma elevação da quantidade de extrato incorporado pela membrana. De tal forma que, quanto maior foi o rendimento de produção da CB, mais espessa a membrana obtida, aumentando a incorporação do extrato. Fato este que conduziu a uma maior liberação do extrato em água. Os resultados de liberação obtidos corroboram com os valores

de rendimento encontrados para as amostras, visto que o método utilizado para a adição do extrato nas membranas depende diretamente do rendimento, ou seja, da espessura das amostras úmidas.

De acordo com os resultados já apresentados na Tabela 3 (item 4.1), para as membranas produzidas com meios modificados pelo extrato de uva a ordem decrescente de rendimento foi (U25-G > U50-G > HS-UG“ex situ” > U100-G). Enquanto para as membranas produzidas com os meios modificados pelo extrato de repolho a ordem decrescente de rendimento foi (R50-G > R25-G > HS-RG“ex situ”). As mesmas ordens foram observadas para o teor de liberação do extrato em água. Sendo assim, pode-se afirmar que dentre as amostras estudadas, as que combinaram os melhores valores de rendimento e liberação foram a U25-G para as membranas obtidas com o extrato de uva e a R50-G para as membranas obtidas com o extrato de repolho roxo.

Verificou-se, ainda, que todas as membranas de CB, mesmo após os testes de liberação, continuaram exibindo colorações características dos extratos adicionados. Esses resultados sugerem que o processo de liberação dos extratos em água após o tempo de 24 h não foi total, ou seja, provavelmente uma parte desses extratos incorporados nas membranas continuam presentes em sua estrutura.

Outros estudos desenvolvidos anteriormente também avaliaram a capacidade de extração e liberação de compostos antioxidantes em diferentes matrizes, uma vez que esta propriedade é essencial no desenvolvimento de várias aplicações, como na produção de filmes para a obtenção embalagens inteligentes (KALANTARI *et al.*, 2020; POURJAVAHER *et al.*, 2017) e na produção de produtos cosméticos (AMORIM *et al.*, 2022). Além disso, Bujak e colaboradores (2022) demonstraram através do seu estudo uma avaliação do efeito que a utilização de diferentes extratos de flores com características antioxidantes pode ocasionar no aumento dos níveis de hidratação da pele, característica de grande interesse para o desenvolvimento de produtos cosméticos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi avaliada a capacidade de produção da celulose bacteriana, a partir da utilização da bactéria *Komagataeibacter hansenii* em diferentes meios de cultivos, com o intuito de reduzir o custo do processo e obter novos biomateriais com características antioxidantes para serem empregados em possíveis aplicações cosméticas. O método de produção empregado foi o sistema estático através de dois processos de aditivação distintos o *in situ* e o *ex situ*.

Os meios de produção utilizados foram modificados pela substituição total ou parcial do meio padrão Hestrin e Schramm (HS) por diferentes proporções de extratos naturais da casca de uva e do repolho roxo. As duas metodologias de produção das membranas de CB se mostraram eficientes e os meios modificados com diferentes proporções entre o meio padrão HS e os diferentes extratos resultaram em um aumento do rendimento de produção, quando comparados a utilização do meio HS sozinho. Tais resultados foram muito satisfatórios, pois permitiram uma redução do custo do processo. Além disso, a utilização do extrato da casca de uva pura como meio fermentativo também foi capaz de produzir a membrana de CB (Uva 100% v/v - U100) com um rendimento de $84,45 \pm 2,3 \text{ g.L}^{-1}$.

As membranas de CB produzidas foram caracterizadas, o que permitiu confirmar algumas propriedades importantes como: grupos funcionais pertencentes à estrutura química do biopolímero; elevadas capacidades de retenção de água (em torno de 98%) e porosidade coerentes com dados reportados pela literatura; membranas termicamente estáveis; estrutura cristalina com planos cristalográficos e perfis semelhantes aos comumente encontrados em materiais baseados em CB e morfologia fibrilar evidenciada pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura. Além disso, verificou-se que as membranas de CB obtidas apresentaram atividade antioxidante, que variou de acordo com o tipo, o método e a concentração de extrato incorporado.

Também foi estudada a capacidade de liberação em água dos extratos incorporados nas membranas produzidas. Os resultados encontrados demonstraram que os maiores valores de liberação dependeram diretamente do rendimento das membranas produzidas, consequentemente das quantidades de extrato incorporadas.

Foi proposto um processo de esterilização por irradiação gama nas membranas de CB com o intuito de garantir a biossegurança dos materiais obtidos e de avaliar as suas propriedades antes e após a irradiação. Mesmo após o processo de irradiação, foram demonstrados que as estruturas químicas, semicristalinas e morfológicas das membranas produzidas foram preservadas, conforme comprovados pelas técnicas de FTIR, DRX e MEV, respectivamente.

Por fim, os resultados encontrados demonstram que foi possível o desenvolvimento de novos sistemas à base de CB, os quais apresentaram atividade antioxidante, estabilidade dos compostos ativos mesmo após a adição nas membranas, capacidade de liberação desses compostos. Todas essas características aliadas as elevadas porosidades e alta capacidade de retenção de água encontradas nas amostras, demonstram que essas matrizes podem ter ampla aplicação na finalidade pretendida. A combinação dessas propriedades proporciona um ótimo efeito hidratante das amostras, além de permitir a incorporação dos extratos em maior quantidade, tornando-as excelentes candidatas no desenvolvimento de cosméticos sustentáveis, como máscaras e adesivos faciais.

5.2 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

Diante das conclusões obtidas nesta tese, algumas das sugestões para trabalhos futuros podem ser apresentadas:

- Avaliar outras propriedades das membranas de CB obtidas, antes e após serem submetidas ao processo de esterilização por irradiação gama, como a realização de ensaios mecânicos;
- Confeccionar protótipos de máscaras faciais e/ou de adesivos para olheiras baseados em CB para uso oclusivo com as membranas aditivadas produzidas;
- Realizar estudos de adição e de liberação dos extratos ricos em substâncias antioxidantes nas membranas de CB produzidas, em meios que simulem a composição da pele;
- Executar ensaios de biodegradabilidade e citotoxicidade das membranas de CB produzidas;
- Caracterizar os extratos puros obtidos por meio das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectroscopia de massa.

REFERÊNCIAS

- ABDELRAOF, M.; HASANIN, M. S.; EL -SAIED, H. Ecofriendly green conversion of potato peel wastes to high productivity bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 211, p. 75-83, 2019.
- ADEPU, S.; KHANDELWAL, M. Ex-situ modification of bacterial cellulose for immediate and sustained drug release with insights into release mechanism. **Carbohydrate Polymers**, v. 249, 2020.
- ALBUQUERQUE, R. M.; MEIRA, H. M.; SILVA, I. D.; SILVA, C. J. G.; ALMEIDA, F. C. G.; AMORIM, J. D. P.; VINHAS, G. M.; COSTA, A. F. S.; SARUBBO, L. A. Production of a bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) blend activated with clove essential oil for food packaging. **Polymers and Polymer Composites**, 2020.
- AMBERG, N.; FOGARASSY, C. Green Consumer Behavior in the Cosmetics Market. **Resources**, n. 3, v. 8, p. 1-19, 2019.
- AMNUAIKIT, T.; CHUSUIT, T.; RAKNAM, P.; BOONME, P. Effects of a cellulose mask synthesized by a bacterium on facial skin characteristics and user satisfaction. **Medical Devices: Evidence and Research**, v. 4, p. 77-81, 2011.
- AMORIM, J. D. P., COSTA, A. F. S., GALDINO Jr, C. J. S., VINHAS, G. M., SANTOS, E. M. S., SARUBBO, L. A. Bacterial Cellulose Production Using Fruit Residues as Substrat to Industrial Application. **Chemical Engineering Transactions**, v. 74, p. 1165-1170, 2019.
- AMORIM, J. D. P.; NASXIMENTO, H. A.; GALDINO, C. J. S. J.; MEDEIROS, A. D.; SILVA, I. D. I.; COSTA, A. F. S.; VINHAS, G. M.; SARUBBO, L. A. Obtainment of bacterial cellulose with added própolis extract for cosmetic applications. **Polymer Engineering and Science**, v. 62, p. 565-575, 2022.
- AMORIM, J. D. P.; SOUZA, K. C.; DUARTE, C. R.; DUARTE, I. S.; RIBEIRO, F. A. S.; SILVA, G. S.; FARIAS, P. M. A.; STINGL, A.; COSTA, A. F. S.; VINHAS, G. M.; SARUBBO, L. A. Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review. **Environmental Chemistry Letters**. 2020.
- AZEREDO, H. M. C., BARUD, H., FARINAS, C. S., VASCONCELLOS, V. M., CLARO, A. M. Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 3, n. 7, 2019.
- BAIANO, A.; NOBILE, M. A. Antioxidant Compounds from Vegetable Matrices: Biosynthesis, Occurrence, and Extraction Systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n.12, p. 2053-2068, 2016.
- BALAJI, A., VELLAYAPPAN, M. V., JOHN, A. A., SUBRAMANIAN, A. P., JAGANATHAN, S. K., SELVAKUMAR, M., FAUDZI, A. A. M., SUPRIYANTO, E.,

YUSOF, M. Biomaterials based nano-applications of Aloe vera and its perspective: a review. **The Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 86199-86213, 2015.

BARUD, H. G. O., SILVA, R. R., BARUD, H. S., TERCJAK, A., GUTIERREZ, J., LUSTRI, W. R., OLIVEIRA JÚNIOR, O. B., RIBEIRO, S. J. L. A Multipurpose Natural and Renewable Polymer in Medical Applications: Bacterial Cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 406-420, 2016.

BEH, C. C.; FARAH, S.; LANGER, R.; JAKLENEC, A. Methods for Sterilization of Biopolymers for Biomedical Applications. Antimicrobial Materials for Biomedical Applications. **Royal Society of Chemistry**, p. 1-37, 2019.

BEKATOROU, A.; PLIONI, I.; SPAROU, K.; MAROUTSIU, R.; TSAFRAKIDOU, P., PETSI, T.; KORDOULI, E. Bacterial Cellulose Production Using the Corinthian Currant Finishing Side-Stream and Cheese Whey: Process Optimization and Textural Characterization. **Foods**, n. 8, v. 193, p. 1-14, 2019.

BIANCHET, R. T., CUBAS, A. L. V., MACHADO, M. M., MOECKE, E. H. S. Applicability of Bacterial Cellulose in Cosmetics - Bibliometric Review. **Biotechnology Reports**, v. 27, p. 1-25, 2020.

BLANCO, A., MONTE, M.C., CAMPANO, C., BALEA, A., MERAYO, N., NEGRO, C. Nanocellulose for industrial use: Cellulose nanofibers (CNF), cellulose nanocrystals (CNC), and bacterial cellulose (BC). In **Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications**; Elsevier: Newark, NJ, USA, p. 74-126, 2018.

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

BUENO, J. N.; BOCANEGRA, B. B.; ROONEY, A.; HIERRO, J. M. H.; HEREDIA, F. J.; BYRNE, H. J. Linking ATR-FTIR and Raman features to phenolic extractability and other attributes in grape skin. **Talanta**, v. 167, p. 44-50, 2017.

BUJAK, T.; ZAGÓRSKA-DZIOK, M.; ZIEMLEWSKA, A.; NIZIOŁ-ŁUKASZEWSKA, Z.; LAL, K.; WASILEWSKI, T.; HORDYJEWICZ-BARAN, Z. Flower Extracts as Multifunctional Dyes in the Cosmetics Industry. **Molecules**, v. 27, 2022.

CAMPANO, C., BALEA, A., BLANCO, A., NEGRO, C. Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 57-91, 2015.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, n. 4, v. 113, p. 859-871, 2009.

CAZÓN, P.; VÁSQUEZ, M. Improving bacterial cellulose films by *ex-situ* and *in-situ* modifications: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 113, 2022.

CHEN, C.; DING, W.; ZHANG, H.; ZHANG, L.; HUANG, Y.; FAN, M.; YANG, J.; SUN, D. Bacterial cellulose-based biomaterials: From fabrication to application. **Carbohydrate Polymers**, v. 278, 2022.

CHOI, S. M.; RAO, K. M.; ZO, S. M.; SHIN, E. J.; HAN, S. S. Bacterial cellulose and its applications. **Polymers**, v. 14, 2022.

CIECHOLEWSKA-JUŚKO, D.; ZYWICKA, A.; JUNKA, A.; DROZD, R.; SOBOLEWSKI, P.; MIGDAŁ, P.; KOWALSKA, U.; TOPORKIEWICZ, M.; FIJAŁKOWSKI, K. Superabsorbent crosslinked bacterial cellulose biomaterials for chronic wound dressings. **Carbohydrate Polymers**, v. 253, 2021.

COSTA, A. F. S., ALMEIDA, F. C. G., VINHAS, G. M., SARUBBO, L. A. Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* Using Corn Steep Liquor As Nutrient Sources. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-12, 2017.

COSTA, A. F. S.; AMORIM, J. D. P.; ALMEIDA, F. C. G.; LIMA, I. D.; PAIVA, S. C.; ROCHA, M. A., V.; VINHAS, G. M.; SARUBBO, L. A. Dyeing of bacterial cellulose films using plant-based natural dyes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 580-587, 2019.

COSTA, A. F. S.; GALDINO JUNIOR, C. J. S.; MEIRA, H. M.; AMORIM, J. D. P.; SILVA, I. D. L., GOMES, E. A. S., SARUBBO, L. A. Production of paper using bacterial cellulose and residue from the sugar and alcohol industry. **Chemical Engineering Transactions**, v. 79, p. 85-90, 2020.

DAYAL, M. S.; CATCHMARK, J. M. Mechanical and Structural Property Analysis of Bacterial Cellulose Composites. **Carbohydrate Polymers**, v. 144, 2016.

DING, Z.; LIU, X.; LIU, Y.; ZHANG, L. Enhancing the Compatibility, Hydrophilicity and Mechanical Properties of Polysulfone Ultrafiltration Membranes with Lignocellulose Nanofibrils. **Polymers**, n. 8, v. 349, 2016.

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

DONG, Y. D.; ZHANG, H.; ZHONG, G. J.; YAO, G.; LAI, B. Cellulose/carbon Composites and their Applications in Water Treatment – a Review. **Chemical Engineering Journal**, v. 405, 2021.

DUARTE, E. B.; ANDRADE, F. K.; LIMA, H. L. S.; NASCIMENTO, E. S.; CARNEIRO, M. J. M.; BORGES, M. F.; LUZ, E. P. C. G.; CHAGAS, B. S.; ROSA, M. F. Celulose Bacteriana, Propriedades, Meios Fermentativos e Aplicações. Embrapa Agroindústria Tropical, 2019.

ELIAZ, N. Corrosion of Metallic Biomaterials: A Review. **Materials**, v. 12, p. 407, 2019.

FAN, M.; CHOI, Y. J.; TANG, Y.; BAE, S. M.; YANG, H. P.; KIM, E. K. Efficacy and Mechanism of Polymerized Anthocyanin from Grape-Skin Extract on High-Fat-Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Nutrients**, v. 11, 2019.

FERNANDES, I. A. A.; PEDRO, A. C.; RIBEIRO, V. R.; BORTOLINI, D. G.; OZAKI, M. S. C.; MACIEL, G. M.; HAMINIUK, C. W. I. Bacterial cellulose: From production optimization to new applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 2598-2611, 2020.

FERNANDES, M.; SOUTO, A. P.; DOURADO, F.; GAMA, M. Application of Bacterial Cellulose in the Textile and Shoe Industry: Development of Biocomposites. **Polysaccharides**, v. 2, p. 566-581, 2021.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; REIS, M. A. M. Bacterial Polysaccharides: Production and Applications in Cosmetic Industry. **Polysaccharides**, p. 2017-2043, 2015.

GALANTE, R.; PINTO, T. J. A.; COLAÇO, R.; SERRO, A. P. Sterilization of hydrogels for biomedical applications: A review. **Journal of Biomedical Materials Research**, n. 6, v. 106, p. 2472-2492, 2018.

GALDINO Jr. C. J. S., MAIA, A. D.; MEIRA, H. M., SOUZA, T.C., AMORIM, J. D. P., ALMEIDA, F. C. G., COSTA, A. F. S., SARUBBO, L. A. Use of a bacterial cellulose filter for the removal of oil from wastewater. **Process Biochemistry**, v. 91, p. 288-296, 2020.

GALDINO Jr. C. J. S., MEIRA, H. M., SOUZA, T.C., AMORIM, J. D. P., ALMEIDA, F. C. G., COSTA, A. F. S., SARUBBO, L. A. Evaluation of the Potential of Bacterial Cellulose in the Treatment of Oily Waters. **Chemical Engineering Transactions**, v. 74, p. 313-318, 2019.

GALDINO Jr., C. J. S.; AMORIM, J. D. P.; MEDEIROS, A. D. M.; CAVALCANTI, A. K. L. H.; NASCIMENTO, H. A.; HENRIQUE, M. A.; MARANHÃO, L. J. C. N.; VINHAS, G. M.; SILVA, K. K. O. S.; COSTA, A. F. S.; SARUBBO, L. A. Design of a naturally dyed and waterproof biotechnological leather from reconstituted cellulose. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 13, 2022.

GALLEGOS, A. M. A.; CARRERA, S. H.; PARRA, R.; KESHAVARZ, T.; IQBAL, H. M. N. Bacterial Cellulose: A Sustainable Source to Develop Value-Added Products – A Review. **BioResources**, v. 11, n. 2, p. 5641-5655, 2016.

GALLETTI, P. M., BORETOS, J. W. Report on the Consensus -Development Conference on "Clinical Applications of Biomaterials," 1-3 November 1983. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 17, p. 539-555, 1983.

GAO, M.; LI, J.; BAO, Z.; HU, M.; NIAN, R.; FENG, D.; AN, D.; LI, X.; XIAN, M.; ZHANG, H. A natural in situ fabrication method of functional bacterial cellulose using a microorganism. **Nature Communications**, v. 10, n. 437, 2019.

GAYATHRI, G.; SRINIKETHAN, G. Bacterial cellulose production by *K. saccharivorans* BC1 strain using crude distillery effluent as cheap and cost effective

nutriente médium. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 950-957, 2019.

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

GROMOVYKH, T. I.; SADYKOVA, V. S.; LUTCENKO, S. V.; DMITRENOK, A. S.; FELDMAN, N. B.; DANILCHUK, T. N.; KASHIRIN, V. V. Bacterial Cellulose Synthesized by *Gluconacetobacter hansenii* for Medical Applications. **Applied biochemistry and microbiology**, v. 53, n. 1, p. 60-67, 2017.

GUAN, F.; CHEN, S.; SHENG, N.; CHEN, Y.; YAO, J.; PEI, Q.; WANG, H. Mechanically robust reduced graphene oxide/bacterial cellulose film obtained via biosynthesis for flexible supercapacitor. **Chemical Engineering Journal**, v. 360, p. 829-837, 2019.

HAN, X.; ALU, A.; LIU, H.; SHI, Y.; WEI, X.; CAI, L.; WEI, Y. Biomaterial-assisted biotherapy: A brief review of biomaterials used in drug delivery, vaccine development, gene therapy, and stem cell therapy. **Bioactive Materials**, v. 17, p. 29-48, 2022.

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

HODDER, E.; DUIN, S.; KILIAN, D.; AHLFELD, T.; SEIDEL, J.; NACHTIGALL, C.; BUSH, P.; COVILL, D.; GELINSKY, M. LODGE, A. Investigating the effect of sterilisation methods on the physical properties and cytocompatibility of methyl cellulose used in combination with alginate for 3D-bioplotting of chondrocytes. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 30, 2019.

HONG, H. T.; NETZEL, M. E.; O'HARE, T. J. Optimisation of extraction procedure and development of LC–DAD–MS methodology for anthocyanin analysis in anthocyanin-pigmented corn kernels. *Food Chemistry*, v. 319, 2020.

HSIEH, J. T., WANG, M. J., LAY, 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. 0, p. 1-6, 2016.

HUNGUND, B. S.; GUPTA, S. G. Improved Production of Bacterial Cellulose From *Gluconacetobacter Persimmonis* GH-2. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, v. 2, n. 5, p. 127–133, 2010.

HUSSAIN, Z.; SAJJAD, W.; KHAN, T.; WAHID, F. Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review. **Cellulose**, v. 26, p. 2895-2911, 2019.

HWANG, J. W.; YANG, Y. K.; HWANG, J. K.; PYUN, Y. R.; KIM, Y. S. Effects of pH and Dissolved Oxygen on Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* BRCS in

Agitated Culture. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 2, p. 183-188, 1999.

HWANG, Y.; PARK, H. J.; POTTHAST, A.; JEONG, M. J. Evaluation of cellulose paper degradation irradiated by an electron beam for conservation treatment. **Cellulose**, v. 28, p. 1071-1083, 2021.

INOUE, B. S., STREIT, S., SCHNEIDER, A. L. S., MEIER, M. M. Bioactive bacterial cellulose membrane with prolonged release of chlorhexidine for dental medical application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 148, p. 1098-1108, 2020.

JIPA, I. M.; STROUESCU, M.; STOICA-GUZUN, A.; DOBRE, T.; JINGA, S.; ZAHARESCU, T. Effect of gamma irradiation on biopolymer composite films of poly(vinylalcohol) and bacterial cellulose. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 278, p. 82-87, 2012.

KALANTARI, S.; ROUFEGARINEJAD, L.; PIRSA, S.; GHAREKHANI, M. Green extraction of bioactive compounds of pomegranate peel using γ -Cyclodextrin and ultrasound. **Main Group Chemistry**, v. 19, p. 61-80, 2020.

KAN, H.; KADAM, A.; DUTT, D. Studies on bacterial cellulose produced by a novel strain of *Lactobacillus* genus. **Carbohydrate Polymers**, v. 229, 2020.

KARGARZADEH, H.; MARIANO, M.; HUANG, J.; LIN, N.; AHMAD, I.; DUFRESNE, A.; THOMAS, S. Recent developments on nanocellulose reinforced polymer nanocomposites: A review. **Polymer**, v. 132, p. 368-393, 2017.

KESHK, S. M. A. S. Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications. **Journal of Bioprocessing and Biotechniques**, v. 4, n. 2, 2014.

KHALIL, H. P. S. A., TYE, Y. Y., SAURABH, C. K., LEH, C. P., LAI, T. K., CHONG, E. W. N., FAZITA, M. R. N., HAFIDZ, J. M., BANERJEE, A., SYAKIR, M. I. Biodegradable polymer films from seaweed polysaccharides: review on cellulose as a reinforcement material. **Polymer Letters**, v. 11, n. 4, p. 244-265, 2017.

KHAN, S.; UL-ISLAM, M.; ULLAH, M. W.; ZHU, Y.; NARAYANAN, K. B.; HAN, S. S.; PARK, J. K. Fabrication strategies and biomedical applications of three-dimensional bacterial cellulose-based scaffolds: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 209, p.9-30, 2022.

KHOSHNEVISAN, K.; MALEKI, H.; SAMADIAN, H.; DOOSTAN, M.; KHORRAMIZADEH, M. R. Antibacterial and antioxidant assessment of cellulose acetate/polycaprolactone nanofibrous mats impregnated with propolis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 1260-1268, 2019.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN, A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. **Polymer Science**, v. 44, p. 3358-3393, 2005.

LEE, S. E.; PARK, Y. S. The role of bacterial cellulose in artificial blood vessels. **Molecular and Cellular Toxicology**, v. 13, p. 257–261, 2017.

LIMA, L. R.; SANTOS, D. B.; SANTOS, M. V.; BARUD, H. S.; HENRIQUE, M. A.; PASQUINI, D.; PECORARO, E.; RIBEIRO, S. J. L. Nanocristais de celulose a partir de celulose bacteriana. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1140-1147, 2015.

LIN, Y. C.; WEY, Y. C.; LEE, M. L.; LIN, P. C. **Cosmetic Composition Containing Fragments of Bacterial Cellulose Film and Method for Manufacturing Thereof**. Titular: Nympheas International Corp. Changhua County. US 2015/0216784 A1. Depósito: 06 fev. 20014. Concessão: 06 ago. 2015.

LORSON, T.; RUOPP, M.; EIBER, A. N. J.; VOGEL, U.; JUNGST, T.; LUHMANN, T. Sterilization Methods and Their Influence on Physicochemical Properties and Bioprinting of Alginate as a Bioink Component. **American Chemical Society**, n. 5, v. 12, p. 6481-6486, 2020.

LU, P.; HSIEH, Y. L. Cellulose isolation and core–shell nanostructures of cellulose nanocrystals from chardonnay grape skins. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2546-2553, 2012.

MACHADO, R. T. A.; MENEGUIN, A. B.; SÁBIO, R. M.; FRANCO, D. F.; ANTONIO, S. G.; GUTIERREZ, J.; TERCJAK, A.; BERRETTA, A. A.; RIBEIRO, S. J. L.; LAZARINI, S. C.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S. *Komagataeibacter rhaeticus* grown in sugarcane molasses-supplemented culture medium as a strategy for enhancing bacterial cellulose production. **Industrial Crops & Products**, v. 122, p. 637-646, 2018.

MALIK, D. S.; JAIN, C. K.; YADAV, A. K. Removal of heavy metals from emerging cellulosic low-cost adsorbents: a review. **Applied Water Science**, v. 7, p. 2113-2136, 2017.

MARESTONI, L. D.; BARUD, H. S.; GOMES, R. J.; CATARINO, R. P. F.; HATA, N. N. Y.; RESSUTTE, J. B.; SPINOSA, W. A. Commercial and potential applications of bacterial cellulose in Brazil: ten years review. **Polímeros**, v. 30, 2020.

MEDEIROS, A. D. M.; GALDINO Jr., C. J. S.; AMORIM, J. D. P.; NASCIMENTO, H. A.; CONVERTI, A.; COSTA, A. F. S.; SARUBBO, L. A. Biocellulose for Treatment of Wastewaters Generated by Energy Consuming Industries: A Review. **Energies**, v. 14, 2021.

MEFTAH, A.; SAMYN, P.; GERAIVAND, A.; KHAJAVI, R.; ALIBKHSI, S.; BECHELANY, M.; BARHOUM, A. Nanocelluloses as skin biocompatible materials for skincare, cosmetics, and healthcare: Formulations, regulations, and emerging applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 278, 2022.

MISHRA, R. K.; SABU, A.; TIWARI, S. K. Materials chemistry and the futurist eco-friendly applications of nanocellulose: Status and prospect. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 22, p. 949-978, 2018.

MITURA, S.; SIONKOWSKA, A.; JAISWAL, A. Biopolymers for hydrogels in cosmetics: review. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 31, 2020.

MONTGOMERY, D. C. Introdução ao controle estatístico da qualidade. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2016.

MORAIS, E. S.; SILVA, N. H. C. S.; SINTRA, T. E.; SANTOS, S. A. O.; NEVES, B. M.; ALMEIDA, I. F.; COSTA, P. C.; SÁ, I. C.; VENTURA, S. P. M.; SILVESTRE, A. J. D.; FREIRE, M. G.; FREIRE, C. S. R. Anti-inflammatory and antioxidant nanostructured cellulose membranes loaded with phenolic-based ionic liquids for cutaneous application. **Carbohydrate Polymers**, v. 206, p. 187-197, 2019.

MORGANTI, P.; MORGANTI, G.; GAGLIARDINI, A.; LOHANI, A. From Cosmetics to Innovative Cosmeceuticals—Non-Woven Tissues as New Biodegradable Carriers. **Cosmetics**, v. 8, 2021.

MUSSO, Y. S.; SALGADO, P. R.; MAURI, A. N. Smart gelatin films prepared using red cabbage (*Brassica oleracea* L.) extracts as solvent. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 674-681, 2019.

NAIKWADI, A. T.; SHARMA, B. K.; BHATT, K. D.; MAHANWAR, P. A. Gamma radiation processed polymeric materials for high performance applications: A Review. **Frontiers in Chemistry**, v. 10, 2022.

NDIAYE, M.; PHILIPPE, C.; MUKHTAR, H.; AHMAD, N. The Grape Antioxidant Resveratrol for Skin Disorders: Promise, Prospects, and Challenges. **Arch Biochem Biophys**, v. 508, n. 2, p. 164-170, 2011.

NGUYEN, J. K.; MASUB, N.; JAGDEO, J. Bioactive ingredients in Korean cosmeceuticals: Trends and research evidence. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 00, p. 1-15, 2020.

NILFOROUSHZADEH, M. A.; AMIRKHANI, M. A.; ZARRINTAJ, P.; MOGHADDAM, A. S.; MEHRABI, T.; ALAVI, S.; SISAKHT, M. M. Skin care and rejuvenation by cosmeceutical facial mask. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 17, p. 693-702, 2018.

NUMATA, Y.; MAZZARINO, L.; BORSALI, R. A slow-release system of bacterial cellulose gel and nanoparticles for hydrophobic active ingredients. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 486, p. 217-225, 2015.

NUNES, M. A.; RODRIGUES, F.; OLIVEIRA, M. B. P. P. 11-Grape Processing By-Products as Active Ingredients for Cosmetic Proposes. **Handbook of Grape Processing By-Products**, p. 267-292, 2017.

OKIYAMA, A.; MOTOKI, M.; YAMANAKA, S. Bacterial cellulose II. Processing of the gelatinous cellulose for food materials. **Food Hydrocolloids**, v. 6, n. 5, p. 479-487, 1992.

OLEJNIK, A.; SZTORCH, B.; BRZĄKALSKI, D.; PRZEKOP, R. E. Silsesquioxanes in the Cosmetics Industry—Applications and Perspectives. **Materials**, v. 15, 2022.

ORYAN, A.; ALEMZADEH, E.; MOSHIRI, A. Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 98, p. 469-483, 2018.

PACHECO, G.; MELLO, C. V.; ANDRÉO, B. G. C.; ISAAC, V. L. B.; RIBEIRO, S. J. L.; PECORARO, E.; TROVATTI, E. Bacterial cellulose skin masks—Properties and sensory tests. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 17, n. 5, p. 840-847, 2017.

PARK, S. B.; LIH, E.; PARK, K. S.; JOUNG, Y. K.; HAN, D. K. Biopolymer-based functional composites for medical applications. *Progress in Polymer Science*, v. 68, p. 77-105, 2017.

PARTE, F. G. B.; SANTOSO, S. P.; CHOU, C. C.; VERMA, V.; WANG, H. T.; ISMADJI, S.; CHENG, K. C. Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 40, n. 3, p. 397-414, 2020.

PAULA, M.; DIEGO, I.; DIONISIO, R.; VINHAS, G.; ALVES, S. Gamma irradiation effects on polycaprolactone/zinc oxide nanocomposite flms. *Polímeros*, v. 29, 2019.

PENG, B.; YAO, Z.; WANG, X.; CROMBEEN, M.; SWEENEY, D. G.; TAM, K. C. Cellulose-based materials in wastewater treatment of petroleum industry. *Green Energy & Environment*, v. 5, p. 37-49, 2020.

PERUGINI, P.; BLEVE, M.; CORTINOVIS, F.; COLPANI, A. Biocellulose Masks as Delivery Systems: A Novel Methodological Approach to Assure Quality and Safety. *Cosmetics*, v. 5, 2018.

PERUGINI, P.; BLEVE, M.; REDONDI, R.; CORTINOVIS, F.; COLPANI, A. In vivo evaluation of the effectiveness of biocellulose facial masks as active delivery systems to skin. *Journal of Cosmetic Dermatology*, n. 3, v. 19, p. 725-735, 2020.

PHRUKSAPHITHAK, N.; KAEWNUN, C.; O-THONG, S. Bacterial cellulose production and applications. *Science, Engineering and Health Studies*, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2019.

PIADOZO, E. S. Nata de Coco Industry in the Philippines. In: *Bacterial Nanocellulose. Biotechnology to Bio-Economy*. 2016, p. 215-229.

PICHETH, G. F.; Pirich, C. L.; SIERAKOWSKI, M. R.; WOEHL, M. A.; SAKAKIBARA, C. N.; SOUZA, C. F.; MARTIN, A. A.; SILVA, R.; FREITAS, R. A. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 104, p. 97-106, 2017.

POURJAVAHER, S.; ALMASI, H.; MESHKINI, S.; PIRSA, S.; PARANDI, E. Development of a colorimetric pH indicator based on bacterialcellulose nanofibers and red cabbage (*Brassica oleraceae*) extract. *Carbohydrate Polymers*, v. 156, p. 193-201, 2017.

RAMANA, K. V.; REDDY, A. B. M.; MAJETI, N. V. R. K.; SINGHAL, S. S. Therapeutic Potential of Natural Antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Editorial**, 2018.

REGULES, A. O.; CASCALES, I. R.; ROS-GARCÍA, J. M. R.; LÓPEZ-ROCA, J. M.; GÓMEZ-PLAZA, E. A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 26-32, 2006.

RENIATI, I.; HRYMAK, A. N.; MARGARITIS, A. Recent developments in the production and applications of bacterial cellulose fibers and nanocrystals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 510-524, 2017.

REVIN, V.; LIYASKIN, E.; NAZARKINA, M.; BOGATYREVA, A.; SHCHANKIN, M. Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 151-159, 2018.

ROGERS, W. J. Sterilisation techniques for polymers. **Sterilisation of Biomaterials and Medical Devices**, p. 151-211, 2012.

SADIQ, M.; ADIL, M.; PAUL, J. An innovation resistance theory perspective on purchase of eco-friendly cosmetics. **Journal of Retailing and Consumer Services**, v. 59, 2021.

SALARI, M.; KHIABANI, M. S.; MOKARRAM, R. R.; GHANBARZADEH, B.; KAFIL, H. S. Use of gamma irradiation technology for modification of bacterial cellulose nanocrystals/chitosan nanocomposite film. **Carbohydrate Polymers**, v. 253, p. 117-144, 2021.

SANI, M. A.; TAVASSOLI, S.; HAMISHEHKAR, H.; McCLEMENTS, D. J. Carbohydrate-based films containing pH-sensitive red barberry anthocyanins: Application as biodegradable smart food packaging materials. **Carbohydrate Polymers**, v. 255, p. 117-488, 2021.

SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN, A. E.; CONRAD, C. M. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, p. 786-794, 1959.

SHAGHALEH, H., XU, X., WANG, S. Current progress in production of biopolymeric materials based on cellulose, cellulose nanofibers, and cellulose derivatives. **The Royal Society of Chemistry**, v. 8, p. 825-842, 2018.

SHARIP, N. S., ARIFFIN, H. Cellulose nanofibrils for biomaterial applications. **Materials Today**, v. 16, p. 1959-1968, 2019.

SHARMA, C., BHARDWAJ, N. K. Bacterial nanocellulose: Present status, biomedical applications and future perspectives. **Materials Science and Engineering: C**, v. 104, 2019.

SILVA, M. G.; SANTANA, R. M. R.; SOUZA, K. C.; NASCIMENTO, H. A.; LUCENA, A. L. A.; DIAZ, J. M. R.; NAPOLEÃO, D. C.; VINHAS, G. M. Versatility of bacterial cellulose and its promising application as support for catalyst used in the treatment of effluents. In: MADELLA, N. R.; ABIODUN, A. S. **Microbial Biofilms: Applications and control**. CRC Press: Taylor & Francis Group, 2022. p. 203-219.

SILVA, N. H. C. S.; RODRIGUES, A. F.; ALMEIDA, I. F.; COSTA, P.; ROSADO, C.; NETO, C. P.; SILVESTRE, A. J. D.; FREIRE, C. S. R. Bacterial cellulose membranes as transdermal delivery systems for diclofenac: In vitro dissolution and permeation studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, p. 264-269, 2014.

SILVA, R. C.; SILVA, R. M.; AQUINO, K. A. S. A interação da radiação gama com a matéria no processo de esterilização. **Revista Virtual de Química**, v. 6, p. 1624-1641, 2014.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; TSENG, Y. S.; KUMAR, V.; CHEN, C. W.; HALDAR, D.; SAINI, J. K.; DONG, C. D. Developments in bioprocess for bacterial cellulose production. **Bioresource Technology**, v. 344, 2022.

SONG, J. E.; KIM, H. R. Bacterial cellulose as promising biomaterial and its application. **Advances in Textile Biotechnology**, 2 ed., p. 263-277, 2019.

SONI, A.; SMITH, J.; THOMPSON, A.; BRIGHTWELL, G. Microwave-induced thermal sterilization- A review on history, technical progress, advantages and challenges as compared to the conventional methods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 97, p. 433-442, 2020.

SOUTO, E. B.; FERNANDES, A. R.; GOMES, C. M.; COUTINHO, T. E.; DURAZZO, A.; LUCARINI, M.; SOUTO, S. B.; SILVA, A. M.; SANTINI, A. Nanomaterials for Skin Delivery of Cosmeceuticals and Pharmaceuticals. **Applied Sciences**, v. 10, 2020.

STUMPF, T. R.; YANG, X.; ZHANG, J.; CAO, X. In situ and ex situ modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering. **Materials Science & Engineering: C**, v. 82, p. 372-383, 2018.

SWINGLER, S.; GUPTA, A.; GIBSON, H.; KOWALCZUK, M.; HEASELGRAVE, W.; RADECKA, I. Recent Advances and Applications of Bacterial Cellulose in Biomedicine. **Polymers**, v. 13, n. 3, 2021.

TAN, J.; HAN, Y.; HAN, B.; QI, X.; CAI, X.; GE, S.; XUE, H. Extraction and purification of anthocyanins: A review. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 8, 2022.

TARONE, A. G.; CAZARIN, C. B. B.; MORATISCA JUNIOR, M. R. Anthocyanins: New techniques and challenges in microencapsulation. **Food Research International**, v. 133, 2020.

TROVATTI, E.; FREIRE, C. S. R.; PINTO, P. C.; ALMEIDA, I. F.; COSTA, P.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P.; ROSADO, C. Bacterial cellulose membranes applied in topical and transdermal delivery of lidocaine hydrochloride and ibuprofen: In

vitro diffusion studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 435, p. 83-87, 2012.

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, p. 14832-14849, 2015.

ULLAH, H.; BADSHAH, M.; CORREIA, A.; WAHID, F.; SANTOS, H. A.; KHAN, T. Functionalized Bacterial Cellulose Microparticles for Drug Delivery in Biomedical Applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, p. 3692-3701, 2019.

ULLAH, H.; SANTOS, H. A.; KHAN, T. Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery. **Cellulose**, v. 23, n. 4, p. 2291-2314, 2016.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, n. 5, v. 26, p. 1025-1058, 2009.

VIANNA JUNIOR, A. S., COSTA, R. A., GIANNINI, H. Nanocompósitos poliméricos a base de nanocristais de celulose. **Semioses**, v. 10, n. 1, 2016.

VO, G. T.; LIU, Z.; CHOU, O.; ZHONG, B.; BARROW, C. J.; DUNSHEA, F. R.; SULERIA, H. A. R. Screening of phenolic compounds in australian grown grapes and their potential antioxidant activities. **Food Bioscience**, v. 47, 2022.

WANG, F.; ZHAO, X.; WAHID, F.; ZHAO, X.; QIN, X.; BAI, H.; XIE, Y.; ZHONG, C. Sustainable, Superhydrophobic Membranes Based on Bacterial Cellulose for GravityDriven Oil/Water Separation. **Carbohydrate Polymers**, v. 253, p. 117-220, 2021.

WANG, J., TAVAKOLI, J., TANG, Y. Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review. **Carbohydrate Polymers** 2019, v. 219, p. 63-76, 2019.

WILLIAMS, W. B.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

WILSON, A. J.; NAYAK, S. Disinfection, sterilization and disposables. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, n. 11, v. 20, p. 603-608, 2019.

WRIGHT, O.; PHAN, A. D. T.; HONG, H. T.; NETZEL, G.; SULTANBAWA, Y.; NETZEL, M. E. Bioactive Anthocyanins in Selected Fruits – A Foodomics Approach. **Reference Module in Food Sciences**, 2021.

WU, Y.; HUANG, T.Y.; LI, Z. X.; HUANG, Z. Y.; LU, Y. Q.; GAO, J.; HU, Y.; HUANG, C. In-situ fermentation with gellan gum adding to produce bacterial cellulose from traditional Chinese medicinal herb residues hydrolysate. **Carbohydrate Polymers**, v. 270, 2021.

XU, D. P.; LI, Y.; MENG, X.; ZHOU, T.; ZHOU, Y.; ZHENG, J.; ZHANG, J. J.; LI, H. B. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 96, 2017.

XU, S.; XU, S.; GE, X.; TAN, L.; LIU, T. Low-cost and highly efficient production of bacterial cellulose from Sweet potato residues: Optimization, characterization, and application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 196, p. 172-179, 2022.

YAMADA, Y.; YUKPHAN, P.; VU, H. T. L.; MURAMATSU, Y.; OCHAIKUL, D.; TANASUPAWAT, S.; NAKAGAWA, Y. Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). **J Gen Appl Microbiol.**, v. 58, p. 397-404, 2012.

YONG, H.; LIU, J. Recent advances in the preparation, physical and functional properties, and applications of anthocyanins-based active and intelligent packaging films. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 26, 2020.

YORGHANLU, R. A.; HEMMATI H.; PIRSA S.; MAKHANI A. Production of biodegradable sodium caseinate film containing titanium oxide nanoparticles and grape seed essence and investigation of physicochemical properties. **Polymer Bulletin**, 2021.

ZHAO, X.; ZHANG, S. S.; ZHANG, X. K.; HE, F.; DUAN, C. Q. An effective method for the semi-preparative isolation of high-purity anthocyanin monomers from grape pomace. **Food Chemistry**, v. 310, 2020.

ZHU, P.; SUI, S.; WANG, B.; SUN, K.; SUN, G. A study of pyrolysis and pyrolysis products of flame-retardant cotton fabrics by DSC, TGA, and PY–GC–MS. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 71, p. 645-655, 2004.