



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS

KARINA CARVALHO DE SOUZA

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA EM MEIOS DE
CULTURA DE BAIXO CUSTO PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS
SUSTENTÁVEIS**

Recife

2023

KARINA CARVALHO DE SOUZA

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA EM MEIOS DE
CULTURA DE BAIXO CUSTO PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS
SUSTENTÁVEIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciência de Materiais. Área de concentração: Materiais não metálicos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Glória Maria Vinhas

Coorientadora interna: Prof.^a Dr.^a Yeda Medeiros Bastos de Almeida

Orientadora externa: Prof.^a Dr.^a Leonie Asfora Sarubbo

Coorientadora externa: Prof.^a Dr.^a Andréa Fernanda de Santana Costa

Recife

2023

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S729p Souza, Karina Carvalho de
Produção e avaliação de celulose bacteriana em meios de cultura de baixo custo para aplicação em embalagens sustentáveis / Karina Carvalho de Souza. – 2023.
108 f.: il., fig.; tab.

Orientadora: Glória Maria Vinhas.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Exatas e da Natureza. Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais. Recife, 2023.
Inclui referências e apêndices.

1. Celulose bacteriana. 2. Amido de arroz e milho. 3. Meio salino. 4. Embalagem. I. Vinhas, Glória Maria (orientadora). II. Título.

620.19

CDD (23. ed.)

UFPE - CCEN 2024 – 77

KARINA CARVALHO DE SOUZA

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA EM MEIOS DE
CULTURA DE BAIXO CUSTO PARA APLICAÇÃO EM EMBALAGENS
SUSTENTÁVEIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciência de Materiais.

Aprovada em: 02/08/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Glória Maria Vinhas (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Carolina Lipparelli Morelli (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Felipe Pedro da Costa Gomes (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Sara Horácio de Oliveira Maciel (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Cristiana Maria Pedroso Yoshida (Examinadora Externa)
Universidade Federal de São Paulo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo!

Ao meu marido, Winícius Marques, obrigada por todo amor, apoio e carinho!

À minha avó Angelita, que sempre cuidou de tudo com tanto amor!

À minha mãe e irmã, obrigada por toda dedicação e amor!

Aos meus sogros, por todo apoio em tudo, até nos momentos difíceis.

À minha orientadora e Doutora Glória Maria Vinhas por contribuir com seus valiosos conhecimentos, exemplos e ensinamentos na vida.

Às minhas amigas Rosely Queiroz, Claudia Lais, Edna Barbosa, Julie e Ângela pelo companheirismo.

Aos membros da banca examinadora, agradeço.

Muito obrigada a todos do LMPC, em especial a Felipe Cunha, Gabriela, Tiago e Ivo.

Vocês tiveram papel importante na construção desse sonho.

Obrigada aos laboratórios que propiciaram a realização das análises, em especial a Ceça e Gisele do Laboratório de Microbiologia- DEQ.

Às minhas Coorientadoras, Prof.^a Dr.^a. Yêda Bastos, a Prof.^a Dr.^a. Leonie Asfora Sarubbo e a Prof.^a Dr.^a. Andréa Fernanda de Santana Costa obrigada pela confiança e apoio.

À minha querida professora Andrelina Maria, obrigada por seu incentivo e amizade.

Aos funcionários do programa de Pós-Graduação em Ciências de Materiais, e em especial a Ingrid Vanessa por toda dedicação, trabalho e atenção com todos os alunos do programa.

À minha “mãe científica”, Olga Marques, que não está mais entre nós, meu eterno agradecimento.

Agradeço a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), o Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais (PGMTR) e a CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos minha gratidão!

RESUMO

A celulose, representada pela fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$, é um polissacarídeo que pode ter origem vegetal e microbiana. Sua produção por via bacteriana, pelo seu alto grau de pureza e propriedades, tem potencial para aplicações pelas indústrias médica, de produtos farmacêuticos, cosméticos, alimentos, embalagens, compósitos, entre outros. A produção de nanofibrilas de celulose pura pelas bactérias do gênero *Komagataeibacter* ocorre a partir do consumo de glicose no meio, metabolizada em celulose pelos microrganismos. Neste estudo, os ensaios foram divididos em três etapas. A primeira foi realizada utilizando o amido, presente nos grãos de arroz e milho, como fonte de carbono para produção de celulose bacteriana (CB). Para isso, o amido foi hidrolisado por fungos (*Aspergillus oryzae*) para a obtenção de glicose, utilizada na produção de CB. Os resultados mostraram um rendimento máximo de $2,80 \pm 0,43$ g / L de CB obtida com o meio de arroz hidrolisado. Na segunda etapa dos experimentos, a produção de CB foi realizada utilizando uma solução salina, de composição própria, com adição de carboidratos e/ou proteínas (Glicose, Glicerol, Sacarose, Frutose, Peptona, Extrato de Levedura ou Manitol) como fontes de carbono. O rendimento máximo de $5,72 \pm 0,01$ g / L de CB foi obtido com o meio contendo Sacarose. Na terceira etapa, foi desenvolvido o protótipo de uma embalagem sustentável com característica de uma embalagem de papel. Todos os materiais produzidos foram caracterizados quanto à morfologia (Microscopia Eletrônica de Varredura- MEV), cristalinidade (Difratometria de raios X- DRX), estabilidade térmica (Análise Termogravimétrica-TGA) e análise dos grupos funcionais (Infravermelho com Transformada de Fourier- FTIR). Na primeira etapa das caracterizações, o FTIR confirmou os grupos funcionais presentes na CB, bem como a ausência de contaminantes do processo de produção. A avaliação de DRX mostrou uma cristalinidade em torno de 55%. A análise de TGA revelou que os polímeros formados a partir dos meios alternativos (Arroz ou Milho) obtiveram maior estabilidade térmica. O MEV mostrou uma estrutura não uniforme com o arranjo aleatório de nanofibrilas. Já na segunda etapa de caracterização, os difratogramas revelaram uma cristalinidade que variaram de 31% (CB-Extrato Levedura) a 66% (CB-Frutose) e a análise de FTIR confirmou os grupos funcionais existentes na celulose bacteriana, sem possíveis contaminantes. O TGA dos biopolímeros CB-Extrato de levedura e CB-Manitol revelaram temperaturas máximas de degradação

(T_{máx.}) de 350,7 ° C e 322,0 ° C, respectivamente. A partir das micrografias, as CB-Glicose e CB-Sacarose possuíram áreas de estruturas fibrilares mais dispersas e visíveis em comparação às demais. Por fim, as caracterizações do CB-Papel utilizado no desenvolvimento do protótipo de uma embalagem apresentaram T_{máx.} de 311,8 ° C e cristalinidade 86,42% com picos característicos da celulose e do carbonato de cálcio presentes em papéis. Na investigação por MEV, a morfologia fibrosa e de caráter nanométrico foi observada juntamente com enchimentos de calcita. Portanto, estudos como este apresentam novos meios de cultura para produção de CB, bem como uma importante aplicação para esses biopolímeros, a fim de criar alternativas à celulose vegetal, utilizada por exemplo, na indústria de embalagens alimentícias.

Palavras-chave: Celulose bacteriana; Amido de Arroz e Milho; Meio Salino; Embalagem.

ABSTRACT

Cellulose, represented by the formula $(C_6H_{10}O_5)_n$, is a polysaccharide that can be of vegetable or microbial origin. Its bacterial production, due to its high degree of purity and properties, has potential for applications in the medical, pharmaceutical, cosmetics, food, packaging, composites industries, among others. The production of pure cellulose nanofibrils by bacteria of the genus *Komagataeibacter* occurs from the consumption of glucose in the medium, metabolized into cellulose by the microorganisms. In this study, the tests were divided into three stages. The first was performed using starch, present in rice and corn grains, as a carbon source for BC production. For this, the starch was hydrolyzed by fungi (*Aspergillus oryzae*) to obtain glucose, used for the production of BC. The results showed a maximum yield of 2.80 ± 0.43 g / L of BC obtained with the hydrolyzed rice medium. In the second stage of the experiments, the production of BC was carried out using a saline solution, of its own composition, with addition of carbohydrates and/or proteins (Glucose, Glycerol, Sucrose, Fructose, Peptone, Yeast Extract or Mannitol) as carbon sources. The maximum yield of 5.72 ± 0.01 g / L of BC was obtained with the medium containing Sucrose. In the third stage, the prototype of a sustainable package, with characteristics of a paper package, was developed. All materials produced were characterized in terms of morphology (Scanning Electron Microscopy - SEM), crystallinity (X-ray Diffraction - XDR), thermal stability (Thermogravimetric Analysis - TGA) and analysis of functional groups (Infrared with Fourier Transform - FTIR). In the first stage of the characterizations, the FTIR confirmed the functional groups present in the BC, as well as the absence of contaminants from the production process. XRD evaluation showed crystallinity around 55%. The TGA analysis revealed that the polymers formed from the alternative media (Rice or Corn) obtained greater thermal stability. SEM showed a non-uniform structure with the random arrangement of nanofibrils. In the second stage of characterization, the diffractograms revealed a crystallinity that varied from 31% (BC-Yeast Extract) to 66% (BC-Fructose) and the FTIR analysis confirmed the existing functional groups in the bacterial cellulose, without possible contaminants. The TGA of the BC-Yeast extract and BC-Mannitol biopolymers revealed maximum degradation temperatures ($T_{max.}$) of 350.7°C and 322.0°C , respectively. From the micrographs, BC-Glucose and BC-Sucrose had areas of more dispersed and visible fibrillar structures

compared to the others. Finally, the characterizations of the BC-Paper used in the development of a packaging prototype presented T_{max} . of 311.8 ° C and crystallinity 86.42% with characteristic peaks of cellulose and calcium carbonate present in papers. In the SEM investigation, fibrous and nanometric morphology were observed together with calcite fillers. Therefore, studies like this present new culture media for the production of BC, as well as an important application for these biopolymers, in order to create alternatives to vegetable cellulose, used, for example, in the food packaging industry.

Keywords: Bacterial Cellulose; Rice and Corn Starch; Saline medium; Packaging.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura química da celulose	20
Figura 2 -	Micrografia das fibras de celulose bacteriana (A) e celulose vegetal (B).	21
Figura 3 -	3a: Biofilme de CB flutuando na superfície do meio de cultura e 3b: Biofilme de CB coletado.	21
Figura 4 -	Esquema da parede celular da bactéria e o processo de formação e montagem das cadeias de celulose.	23
Figura 5 -	Sobremesa a base de CB conhecida com nata de coco.	32
Figura 6 -	Síntese “in situ” de compósitos de celulose bacteriana.	34
Figura 7 -	Síntese “ex situ” de compostos de celulose bacteriana através da redução dos íons prata.	34
Figura 8 -	Estruturas básicas do grão de arroz.	36
Figura 9 -	Anatomia do grão de milho e suas partes.	38
Figura 10 -	Estrutura química da amilose e amilopectina.	39
Figura 11 -	Colônias algodonosas de <i>A. oryzae</i> crescido em placa de Petri (A) e a microfotografia das hifas fúngicas e seus esporos medindo 6,5 μm de diâmetro (B).	41
Figura 12 -	Embalagens à base de fibra de coco e polvilho para frutas e ovos (A e C); embalagem para ovos produzida com compósitos a partir da fibra de coco e borracha natural (B).	45
Figura 13 -	Embalagem de batatas fritas feita apenas de celulose bacteriana.	45
Figura 14 -	A: Solução de celulose bacteriana e casca de ovo. B: Embalagem compostável para snacks.	46
Figura 15 -	Diagrama de produção do meio hidrolisado para produção de celulose bacteriana.	50
Figura 16 -	Filmes CB produzidos em meio HS (A), milho (B) e arroz (C).	56
Figura 17 -	Curvas TGA para filmes CB produzidos em meio HS (C), milho (B) e arroz (A).	60
Figura 18 -	Difratogramas para filmes CB produzidos em meio de milho, arroz e HS.	62

Figura 19 -	Espectros de FTIR para filmes de CB produzidos em meio HS, meio hidrolisado de arroz e meio hidrolisado de milho.	64
Figura 20 -	Micrografias de superfícies de películas de CB produzidas em meio HS (A), arroz hidrolisado (B) e milho hidrolisado (C).	65
Figura 21 -	Meios de cultura salino com diferentes fontes carbono e CB coletadas.	67
Figura 22 -	Curvas TGA / DTG para filmes CB produzidos em meio salino com diferentes fontes de carbono.	73
Figura 23 -	Difratogramas das CB obtidas nos diferentes meios de cultura.	74
Figura 24 -	Espectros de infravermelho das membranas de celulose bacteriana produzidas em meio salino com diferentes fontes de carbono.	77
Figura 25 -	Imagens de microscopia eletrônica de varredura das membranas de celulose bacteriana. CB-Manitol (A); CB-Extrato de Levedura (B); CB-Glicerol (C); CB-Sacarose (D); CB-Glicose (E); CB-Frutose (F).	78
Figura 26 -	Papel Comum (B), CB Papel (A e C) e protótipo de embalagem feita a partir de CB (D).	80
Figura 27 -	(A) Curvas de TGA e DTG para CB Papel; (B) Curvas de TGA e DTG para Papel Comum.	80
Figura 28 -	Difratogramas de DRX para as amostras CB Papel e Papel Comum.	83
Figura 29 -	Espectros de FTIR das amostras CB Papel e Papel Comum.	85
Figura 30 -	Imagens de microscopia óptica do CB Papel (a) e Papel Comum (b), com lentes objetivas para aumento de 20x.	86
Figura 31 -	Micrografias do CB Papel (a e b), Papel Comum (c e d) e Micrografias com vistas de topo e seção transversal das amostras CB Papel (e e f) e Papel Comum (g e h).	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Propriedades da Celulose Bacteriana comparadas a celulose vegetal.	23
Tabela 2 -	Dados sobre condições de cultivo estudadas na literatura.	28
Tabela 3 -	Produção de Celulose Bacteriana em diferentes fontes de carbono.	30
Tabela 4 -	Comparação entre a composição química (%) do arroz integral, polido e Milho.	37
Tabela 5 -	Características dos amidos presentes no arroz e no milho.	40
Tabela 6 -	Massa e rendimento de filmes de CB desidratados, produzidos em meio alternativo e padrão HS de acordo com a concentração de glicose produzida na hidrólise.	57
Tabela 7 -	Principais vibrações características de FTIR para filmes de CB produzidos a partir da hidrólise de amido de milho e arroz.	64
Tabela 8 -	Rendimentos em grama por litro das produções de CB conforme a fonte de carbono utilizada.	68
Tabela 9 -	Resultados da perda de massa das CB até 100 ° C	72
Tabela 10 -	Temperaturas iniciais, finais e máxima para o principal estágio de degradação das CB.	73
Tabela 11 -	Fração cristalina das membranas de CB produzidas com diferentes fontes de carbono.	75
Tabela 12 -	Dados das temperaturas iniciais (Tonset), temperaturas finais (Toffset) e Temperaturas máximas de degradação (Tmáx) dos filmes Papel comum e CB Papel.	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CB	Celulose Bacteriana
CB-Arroz	Celulose Bacteriana formada em meio de Arroz Hidrolisado
CB-HS	Celulose Bacteriana formada em meio Hestrin-Schram
CB-Milho	Celulose Bacteriana formada em meio de Milho Hidrolisado
DRX	Difração de raios-X
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
GRAS	Organismos Geralmente Reconhecidos Como Seguros
HS	Hestrin-Schram
IC	Índice de cristalinidade
IGEM	<i>International Genetically Engineered Machine</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
MEV	Microscopia eletrônica de Varredura
MO	Microscopia Óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
TGA	Análise Termogravimétrica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	CELULOSE BACTERIANA	20
3.1.1	Biossíntese da Celulose Bacteriana	22
3.1.2	Propriedades da Celulose Bacteriana	23
3.1.3	Meios de Fermentação para Síntese da Celulose Bacteriana	25
3.1.4	Condições de Cultivo da Celulose Bacteriana	27
3.1.5	Meios de Cultura Alternativos para Produção de Celulose Bacteriana	29
3.1.6	Aplicações da Celulose Bacteriana	31
3.2	OS CEREAIS	36
3.2.1	O Arroz	36
3.2.2	O Milho	37
3.3	O AMIDO	39
3.4	O FUNGO	40
3.5	HIDRÓLISE DO AMIDO	41
3.6	EMBALAGENS SUSTENTÁVEIS	43
3.6.1	Embalagens Utilizando Celulose Bacteriana	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1	ETAPA 1: PRODUÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA UTILIZANDO AMIDO	48
4.1.1	Os Microrganismos	48
4.1.2	Preparação dos Grãos	48
4.1.3	Preparação do Meio de conservação	48
4.1.4	Hidrólise do Amido	49
4.1.5	Produção de Celulose Bacteriana	50
4.1.6	Purificação e Secagem	51
4.1.7	Caracterização dos Biopolímeros	51

4.1.7.1	Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	51
4.1.7.2	Análise Termogravimétrica (TGA)	52
4.1.7.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	52
4.1.7.4	Difratometria de Raios X (DRX)	52
4.1.8	Análise Estatística	52
4.2	ETAPA 2: PRODUÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA UTILIZANDO MEIO SALINO E DIFERENTES FONTES DE CARBONO	53
4.2.1	O Microrganismo	53
4.2.2	Preparação dos Meios de Cultura	53
4.2.3	Meio de Conservação e Manutenção	54
4.2.4	Purificação e Secagem	54
4.2.5	Caracterização dos Biopolímeros	54
4.3	ETAPA 3: PROTOTIPAGEM DE EMBALAGEM PARA ALIMENTOS DO TIPO PAPEL UTILIZANDO CELULOSE BACTERIANA	54
4.3.1	Produção do Papel de Celulose Bacteriana	54
4.3.2	Caracterização do Papel de Celulose Bacteriana	55
4.3.3	Prototipagem da embalagem tipo sachê	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	ETAPA 1: PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA UTILIZANDO AMIDO	56
5.1.1	Caracterização dos Filmes CB Produzidos Com Amido	59
5.1.1.1	Análise Termogravimétrica (TGA)	59
5.1.1.2	Difratometria de Raios-X (DRX)	61
5.1.1.3	Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	63
5.1.1.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	65
5.2	ETAPA 2: PRODUÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA UTILIZANDO MEIO SALINO E DIFERENTES FONTES DE CARBONO	67
5.2.1	Caracterização de Filmes CB Produzidos em Meio Salino e Diferentes Fontes de Carbono	70

5.2.1.1	Análise Termogravimétrica (TGA)	70
5.2.1.2	Difratometria de Raios-X (DRX)	73
5.2.1.3	Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	76
5.2.1.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	77
5.3	ETAPA 3: PROTOTIPAGEM DE EMBALAGEM PARA ALIMENTOS DO TIPO PAPEL UTILIZANDO CELULOSE BACTERIANA	79
5.3.1	Caracterização do Papel de Celulose Bacteriana	80
5.3.1.1	Análise Termogravimétrica (TGA)	80
5.3.1.2	Difratometria de Raios-X (DRX)	83
5.3.1.3	Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	84
5.3.1.4	Microscopia Óptica (MO)	85
5.3.1.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	86
6	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	91
	APÊNDICE A	106

1 INTRODUÇÃO

A celulose bacteriana (CB) é um polissacarídeo biodegradável, não tóxico, com considerável capacidade de retenção de líquidos e propriedades importantes para aplicações na área médica, engenharia de tecidos e embalagens alimentícias (DONINI *et al.*, 2010; HU, 2011; MANOUKIAN *et al.*, 2019;). Este biopolímero tem características semelhantes ao polímero de celulose de origem vegetal, mas difere quanto ao grau de polimerização e pureza, suas fibras possuem diâmetros na escala nano e estrutura reticular ultrafina, alta cristalinidade, elevada resistência à tração, elasticidade e durabilidade (ALMEIDA *et al.*, 2013; DE AMORIM *et al.*, 2020).

A celulose pode ser produzida por algas, fungos, protozoários e organismos procarióticos (TRACHE *et al.*, 2017). Entre os produtores de CB, bactérias do gênero *Komagataeibacter* (recentemente reclassificadas do gênero *Gluconacetobacter* com base nas características filogenéticas, fenotípicas, ecológicas e quimiotaxonômicas da sequência 16S rRNA) estão ganhando destaque na produção deste versátil biopolímero (YAMADA *et al.*, 2012; RYNGAJŁŁO *et al.*, 2019). A produção de nanofibrilas de celulose pura por bactérias do gênero *Komagataeibacter* ocorre por meio do consumo de glicose no meio, que é metabolizada em celulose pelas reações catabólicas e anabólicas (BROWN, 1886).

Esse processo metabólico requer carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e elementos como ferro e zinco, que podem ser encontrados em vários subprodutos agroindustriais. Considerando seu valor nutricional, esses subprodutos podem ser usados como substrato ou matéria-prima para o crescimento microbiano e a formação de biopolímeros de celulose (ADNAN *et al.*, 2015; HUSSAIN *et al.*, 2019).

Vários substratos são relatados na literatura como importantes fontes de carbono e nitrogênio para uso na produção de CB, como por exemplo, resíduo de azeite, subprodutos de sagu, água de coco, bagaço de maçã, cana-de-açúcar, resíduo de acerola, amido de batata, entre outros (HUSSAIN *et al.*, 2019; VOON *et al.*, 2019; UL-ISLAM *et al.*, 2020; KADIER *et al.*, 2021). Considerando a necessidade de superar os desafios da produção de CB em escala industrial, o uso de fontes renováveis de carbono e a otimização de bioprocessos constituem uma forma de reduzir os altos custos envolvidos (JANG *et al.*, 2017).

À face do exposto, o amido destaca-se dentre as fontes de carbono mais abundantes e pertence à classe dos polissacarídeos. Ele é armazenado nas plantas

na forma de grânulos e, as variações e composição (glicosídeos, umidade, proteínas, lipídeos, proteínas e minerais) dependem de sua origem: milho, trigo, arroz, cevada e batata (CORRADINI *et al* 2007). Esse carboidrato, composto por dois tipos de polímeros de glicose: amilose e amilopectina, pode ser importante também, para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis (MOHANTY *et al.*, 2005; PRABHAKAR *et al.*, 2017). Os subprodutos agroindustriais (resíduos de feijão, alfafa, amaranto e brócolis) contendo grandes concentrações de amido são acessíveis e baratos (SILVA *et al.*, 2020). Além disso, alguns grãos, como arroz e milho também podem fornecer micro e macronutrientes úteis para a produção de celulose bacteriana, favorecendo o desenvolvimento de novas e limpas biotecnologias (HUSSAIN *et al.*, 2019).

Assim, pode-se obter a glicose do amido através da hidrólise enzimática na presença de fungos filamentosos, microrganismos altamente adaptáveis ao crescimento em substratos sólidos (DULF *et al.*, 2016).

Pertencente ao reino Fungi, os fungos são seres eucariontes que desempenham um papel essencial na decomposição da matéria orgânica e ciclo de nutrientes (TORTORA *et al.*, 2017). A exemplo disso, temos o *Aspergillus oryzae* que é um fungo filamentoso importante e muito utilizado em processos de fermentação e processamento de alimentos como molho de soja e fabricação de saquê (JIE JIN *et al.*, 2021). Esse microrganismo produz muitas enzimas hidrolíticas fundamentais na biotecnologia enzimática. Um exemplo é a amilase, que quebra o amido em glicose. Além do mais, esses microrganismos podem crescer em ambientes com baixa umidade e possuem alta atividade enzimática (DURAND, 2003; WÖSTEN, 2019; SUGIHARTO, 2019).

Fontes de carbono como a glicose e outros açúcares, provenientes de resíduos ou não, possuem uma gama enorme de estudos e aplicações para produção de CB (DUARTE *et al.*, 2019; GOTTSCHALK *et al.*, 2021). No entanto, os principais estudos e modificações ocorrem, na maioria das vezes, nas composições de meios de cultura convencionais: Hestrin–Schramm (H), Yamanaka (Y), Zhou (Z) (MOHAMMADKAZEMI *et al.*, 2015). Contudo, poucas são as formulações que oferecem inovação ao meio cultura como um todo, modificando e barateando os custos de cada um dos nutrientes necessários ao crescimento da CB (SOUZA *et al.*, 2020).

Tão importante quanto a produção da celulose bacteriana é direcionar uma aplicação para esse polímero. Dessa forma, uma alternativa sustentável e ecológica é a utilização da CB para produção de filmes de papel, uma vez que a indústria de celulose e papel é considerada uma das principais responsáveis pelo impacto negativo ao meio ambiente. Alguns autores como Costa *et al.*, (2020) iniciaram suas pesquisas para o desenvolvimento de um papel a partir de celulose bacteriana e resíduos da indústria sucroalcooleira.

Desta forma, a principal motivação e inovação deste trabalho foi avaliar dois meios de produção, além de direcionar uma aplicação para CB. A primeira etapa consistiu na fermentação de um meio contendo amido de milho e arroz por *Aspergillus oryzae* para a produção de um mosto sacarificado, o qual foi utilizado para produção da CB. A segunda etapa teve o objetivo de produzir de CB utilizando uma solução salina, de composição própria, e açúcares. Por fim, um protótipo de uma embalagem sustentável de papel utilizando CB foi desenvolvido.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir biopolímeros de celulose bacteriana a partir de meios de cultura de baixo custo e utilizar a melhor produção na aplicação de um protótipo de embalagem para alimento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a fermentação para obtenção de meio sacarificado a partir dos grãos de arroz e milho na presença do fungo *Aspergillus oryzae*;
- Produzir os biopolímeros de celulose bacteriana a partir dos hidrolisados de arroz e milho (meios sacarificados);
- Produzir celulose bacteriana utilizando solução salina e complementação com fontes de carbono: Glicose, Glicerol, Sacarose, Manitol, Extrato de Levedura, Peptona e Frutose;
- Avaliar a produtividade e rendimento dos biopolímeros produzidos;
- Ampliar a escala da melhor produção de celulose bacteriana para produção do CB Papel;
- Desenvolver o protótipo de uma embalagem sustentável utilizando o CB Papel;
- Caracterizar todas as membranas de CB quanto à morfologia, cristalinidade, estabilidade térmica e análise estrutural.

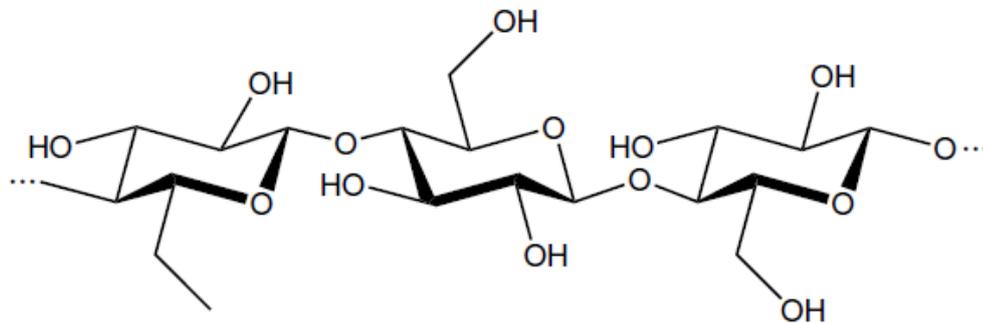
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CELULOSE BACTERIANA

A Celulose Bacteriana (CB) é um exopolissacarídeo produzido por várias espécies de bactérias. A produção de celulose foi relatada pela primeira vez em 1886 por Adrian Brown, quando ele observou um material gelatinoso na superfície de uma fermentação de vinagre (BROWN, 1886; HASSAN *et al.*, 2015).

Essa celulose ($C_6H_{10}O_5$)_n, também chamada glicídios ou hidratos de carbono, é um carboidrato formado pela junção de centenas de moléculas de β-glicose por meio de ligações β-1,4-glicosídicas, onde a unidade que se repete é a celobiose, ou seja, duas moléculas de glicose (VAZQUEZ *et al.*, 2013). Cada monômero de glicose está rotacionado aproximadamente 180° em relação ao vizinho e a cadeia glicana e pode conter até 15.000 monômeros de glicose, o que resulta em uma molécula com peso de 162,1406 g.mol⁻¹ (MCNAMARA *et al.*, 2015). Quanto às ligações de hidrogênio, elas garantem a forte associação do polímero linear de celulose, e como consequência, ocorre a formação de suas fibras, garantindo rigidez à estrutura (TSOUKO *et al.*, 2015). A Figura 1 mostra a estrutura química da celulose.

Figura 1 - Estrutura química da celulose

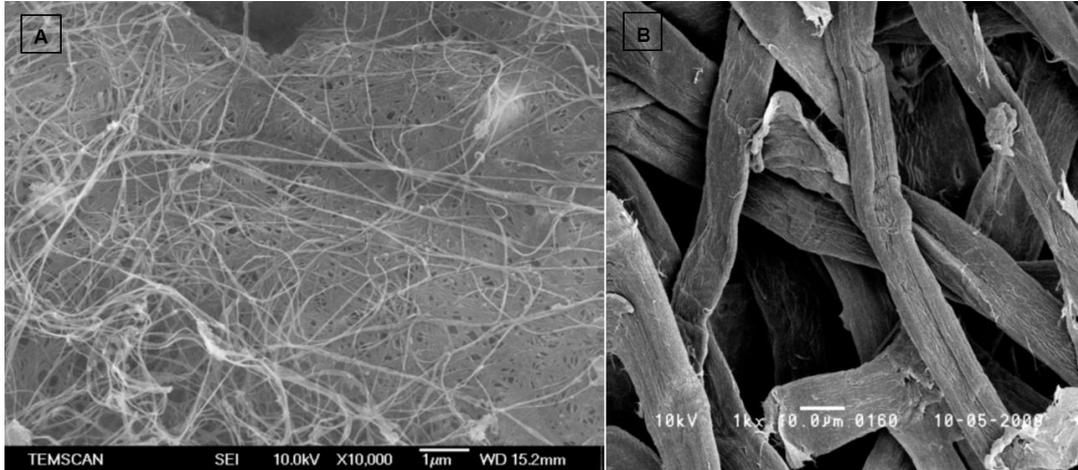


Fonte: KLEMM *et al.*, (2011).

A microfibrila de CB é aproximadamente 100 vezes mais fina (Figura 2) que as da celulose vegetal, tornando-a um material de alta porosidade com boas propriedades (estrutura reticular ultrafina, alta cristalinidade, elevada resistência à tração e elasticidade). Além disso, sua composição é quase que exclusivamente formada por celulose, sendo livre de impurezas como a lignina, hemicelulose ou outro composto que futuramente necessitariam de tratamentos poluidores e

desperdício de água e energia para a sua remoção (DONINI *et al.*, 2010; JOZALA *et al.*, 2016).

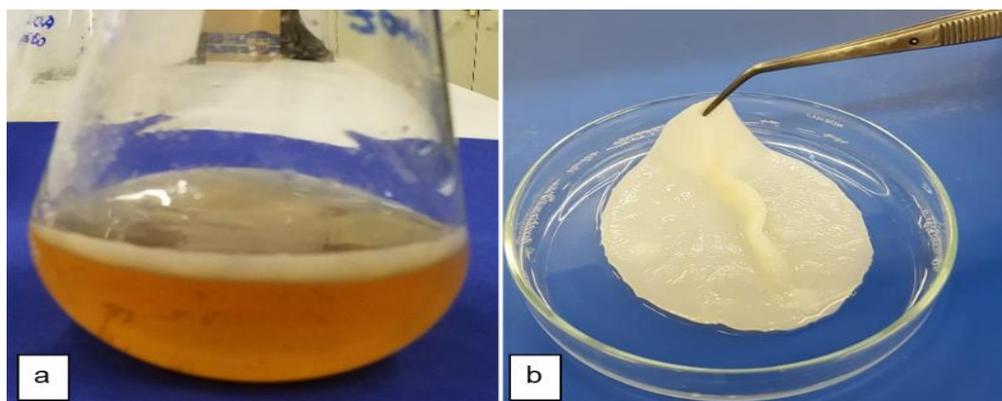
Figura 2 - Micrografia das fibras de celulose bacteriana (A) e celulose vegetal (B).



Fonte: DONINI *et al.*, (2010).

A película de CB (Figura 3a e 3b) desempenha um importante mecanismo de defesa para o microrganismo, uma vez que funciona como mecanismo de flotação (Figura 3a) onde a bactéria permanece em uma interface ar-líquido com a finalidade de obter oxigênio com mais facilidade. Além do mais, esse biofilme é uma barreira à radiação UV devido a sua opacidade. Por permanecer na superfície do meio, melhora também o transporte de nutrientes pelo mecanismo de difusão (KLEMM *et al.*, 2011), e ainda previne a desidratação do substrato, uma vez que possui caráter altamente higroscópico, protegendo as bactérias ali presentes (RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015).

Figura 3 - 3a: Biofilme de CB flutuando na superfície do meio de cultura e 3b: Biofilme de CB coletado.



Fonte: A autora (2021).

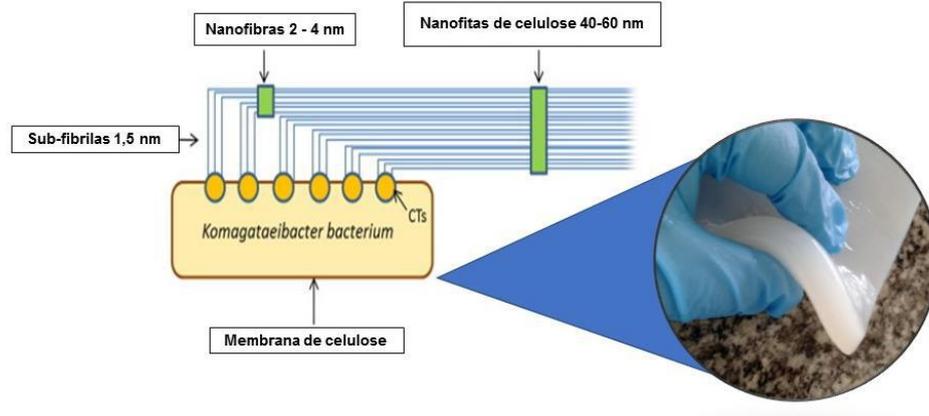
3.1.1 Biossíntese da Celulose Bacteriana

Na biossíntese da CB, espécies de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas poderão ser responsáveis pela formação desse exopolissacarídeo ou biofilme na superfície do meio de cultura líquido. Os gêneros mais conhecidos são: *Komagataeibacter* (Anteriormente, *Gluconacetobacter* - YAMADA *et al.*, 2012), *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Sarcina* (HASSAN *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2014; SHI *et al.*, 2014).

Em uma visão microscópica da parede celular desses microrganismos, o processo de formação da celulose ocorre entre as membranas interna e citoplasmática das células, quando a glicose é transportada do meio externo para o citoplasma da bactéria ou de fontes internas. Essa biossíntese depende de duas vias importantes, a via das pentoses, onde ocorre a oxidação dos carboidratos, e o ciclo de Krebs, em que atua na oxidação dos ácidos orgânicos. Essencialmente, a síntese da celulose acontece a partir de um conjunto metabólico de hexose fosfato, tendo como mecanismo principal a fosforilação de hexoses exógenas, e, de forma indireta, a via das pentoses e gliconeogênese (DONINI *et al.*, 2010).

Quatro enzimas são responsáveis pela conversão da glicose: Glicoquinase, enzima responsável pela fosforilação do carbono 6 da glicose, a Fosfoglicomutase que catalisa a reação de isomerização da glicose-6-fosfato para glicose-1- fosfato; a UDPG - pirofosforilase (glicose – 1 - fosfato uridililtransferase) que sintetiza a UDP - glicose (UDPG) e a Celulose Sintase (CS) que produz a celulose a partir de UDP-glicose. Durante o processo de formação e montagem das cadeias de celulose (Figura 4), primeiramente ocorre a formação das cadeias de 1,4 β -glicano e depois a montagem e cristalização das mesmas (NASCIMENTO, 2018). As cadeias agrupam-se através de ligações de hidrogênio, inicialmente em cadeias chamadas de fibrilas subelementares (1,5 nm) que se associam e formam as microfibrilas (2 a 4 nm de diâmetro), depois organizam-se em nanofitas de 40 a 80 nm de largura. Por fim, as microfibrilas se agregam por meio da cristalização das cadeias de glucano adjacentes (CACICEDO *et al.*, 2015; KLEMM *et al.*, 2005). Assim, fibras de celulose dispersas no meio de cultura formam um filme gelatinoso que flutua na superfície e serve como matriz de suporte ao crescimento da população bacteriana (ANDRADE *et al.*, 2010; COIMBRA, 2016).

Figura 4 - Esquema da parede celular da bactéria e o processo de formação e montagem das cadeias de celulose.



Fonte: CACICEDO *et al.*, (2015) Adaptada.

3.1.2 Propriedades da Celulose Bacteriana

A CB possui muitas propriedades (Tabela 1) que despertam interesse em novos campos de aplicação e no desenvolvimento de métodos para sua produção em larga escala. O alto grau de resistência mecânica, pureza, cristalinidade e teor de água são algumas das propriedades mais importantes da celulose bacteriana (KLEMM *et al.* 2005). Fazendo uma rápida analogia com a celulose vegetal, as principais diferenças são em relação à estrutura fibrosa, essencialmente nanométrica, maior pureza e cristalinidade. (LEE *et al.*, 2014). O grau de cristalinidade gira em torno de 80% para os biofilmes de CB, este fator está profundamente ligado às condições de cultivo, como composição do meio e processo de produção estático ou agitado (JUNG *et al.* 2010; TROVATTI *et al.* 2011).

Tabela 1 - Propriedades da Celulose Bacteriana comparadas a celulose vegetal.

Propriedade	Celulose Vegetal	Celulose Bacteriana
Largura da fibra (nm)	14 - 40.000	50 - 80
Cristalinidade %	43 - 65	84 - 89
Grau de polimerização	13.000 - 14.000	2.000 - 6.000
Módulo de Young (GPa)	13 - 180	15 - 138
Resistência à tração (MPa)	10 - 250	91 - 260
Quantidade de água (%)	60	98,5

Fontes: CAMPANO *et al.*, 2016; CHAWLA *et al.*, 2009; MOON *et al.*, 2011; PECORARO *et al.*, 2008.

Em seus experimentos, Cerrutti *et al.*, (2016) avaliaram a produção de nanocelulose bacteriana a partir de resíduos da indústria do vinho. A nanocelulose

foi produzida em meio estático contendo licor de maceração de milho como fonte de nitrogênio e extrato de bagaço de uva como principal fonte de carbono, em tempos de fermentação de 5, 21 e 30 dias. Como principais resultados de caracterização, os padrões de DRX das membranas obtidas em tempos de incubação crescentes mostraram um aumento do material cristalino em função do tempo de fermentação.

As microfibrilas de celulose bacteriana são organizadas em uma rede nanofibrilar tridimensional, permitindo a retenção de água na estrutura porosa fina e altamente hidrofílica, sendo capaz de absorver quase 100 vezes sua própria massa em água. Já a insolubilidade em água e em solventes orgânicos comuns, bem como resistência à hidrólise enzimática e química estão associados à organização supramolecular das moléculas de celulose, na qual as cadeias de glucana são estabilizadas por ligações de hidrogênio intercadeia e intracadeia (KOOLMAN E ROHM 2005; ROMLING 2002).

Gomes *et al.* (2021) utilizaram o melão de soja como matéria-prima para a produção da CB por bactérias isoladas de indústrias de vinagres. Como principais resultados, as membranas de CB produzidas em melão de soja com etanol apresentaram cristalinidade normalmente observada para CB, menor capacidade de retenção de água e maior taxa de reidratação do que as CB produzidas em meio HS, demonstrando que o tipo de substrato utilizado tem um efeito sobre as características da celulose obtida.

Em suas pesquisas, Cazón *et al.* (2020) observaram que a água atuou como plastificante, afetando principalmente as propriedades mecânicas e de permeabilidade ao vapor de água. Os valores de resistência à tração aumentaram até 22,28 MPa quando o teor de umidade aumentou de 0,11 para 0,32 aw (Atividade de água). No entanto, em valores mais altos de aw ($0,75 < aw < 0,91$) houve diminuição contínua da resistência à ruptura. De forma geral, a presença de um agente plastificante, como a água, pode quebrar ou substituir as ligações de hidrogênio intermoleculares polímero-polímero que mantêm as cadeias poliméricas unidas, aumentando a elasticidade.

Além disso, esse biopolímero possui elevado módulo de elasticidade, alto grau de polimerização (até 6.000), alta permeabilidade, alta porosidade (aprox. 94%) (MEFTAHI *et al.*, 2010; MOON *et al.*, 2006) boa resistência mecânica e elevada área superficial, como decorrência de sua cristalinidade e do pequeno diâmetro das fibras, respectivamente (SILVA, 2012).

A considerável resistência mecânica da celulose bacteriana é devida às cadeias lineares de celulose e à forte coesão entre macromoléculas, formadas por uma rede de ligações de hidrogênio (tanto intra quanto intermoleculares) e ligações glicosídicas (KLEMM *et al.* 2006; SKVORTSOVA *et al.*, 2019). O módulo de Young ou módulo de elasticidade da celulose bacteriana varia de 15 a 138 GPa, com uma tensão e deformação na ruptura de cerca de 240 MPa e 2,6%, respectivamente (IGUCHI *et al.* 2000; PECORARO *et al.* 2007; VITTA E THIRUVENGADAM 2012; HSIEH *et al.* 2008; GARDNER *et al.* 2008). As propriedades dependem de vários fatores, incluindo a cepa bacteriana utilizada, a composição do meio de cultura e as condições pós-incubação.

Quando avaliamos a degradação térmica devemos ter em mente que a mesma pode ser afetada por alguns parâmetros estruturais: peso molecular, cristalinidade e orientação das fibras. Fornecendo assim, algumas pistas sobre as interações das fibras de CB (BARUD *et al.*, 2007; VAZQUEZ *et al.*, 2013).

Tal fato foi avaliado por Mohammadkazemi *et al.* (2015), que correlacionaram os parâmetros de cristalinidade, morfologia e avaliação termogravimétrica. Esses pesquisadores observaram que a fonte de carbono manitol conferiu aos biopolímeros maior estabilidade térmica. Já os resultados de DRX mostraram que a CB produzida em meio de manitol foi a que apresentou a maior cristalinidade, justificando o possível comportamento térmico. Além disso, as micrografias forneceram evidências da forte adesão interfacial entre as fibras de CB.

3.1.3 Meios de Fermentação para Síntese da Celulose Bacteriana

Em 1954, Hestrin e Schramm foram os pioneiros no desenvolvimento de um caldo que continha, basicamente, fósforo, nitrogênio, carbono e oligoelementos. O meio desenvolvido por eles é composto por 2% de glicose, que é a principal fonte de carbono, 0,5% peptona, 0,5% extrato de levedura, 0,27% fosfato dissódico anidro e 0,015% de ácido cítrico (HESTRIN & SCHRAMM 1954).

Macro e micronutrientes tornaram-se formulação chave para a produção de celulose bacteriana entre os pesquisadores e produtores (DONINI *et al.*, 2010; DE VASCONCELOS *et al.*, 2020). Dentre os macronutrientes, pode-se citar o carbono, nitrogênio, oxigênio, hidrogênio, enxofre, fósforo, magnésio e potássio, pois são necessários em grandes concentrações. Já os micronutrientes (molibdênio, zinco, cobre, manganês, cálcio, sódio, vitaminas, hormônios e precursores metabólicos)

são necessários em quantidades mínimas, e, uma concentração muito alta pode ser tóxica para as bactérias (ADNAN, 2015).

Atualmente, algumas distinções foram criadas, e dividem os meios de fermentação em dois tipos: meios de composição definida, os quais apresentam componentes químicos com composição exata e conhecida e, os meios complexos (indefinidos) que são obtidos a partir de extratos naturais e sua composição exata pode não ser conhecida.

De acordo com a definição sugerida pelas bibliotecas do LibreTexts: “Um meio quimicamente definido é totalmente isento de componentes derivados de animais (incluindo componentes derivados de micróbios, como extrato de levedura) e representa um meio mais puro e consistente”. Por definição, meios quimicamente definidos não podem conter soro bovino fetal, albumina de soro bovino ou albumina de soro humano, pois, esses produtos contêm misturas complexas de albuminas e lipídios. O termo 'meios quimicamente definidos' é muitas vezes mal utilizado na literatura (LIBRETEXTS BIOLOGY, 2022).

Diante disso, alguns pesquisadores preferem trabalhar com meios de composição definida, principalmente na área médica, devido sua maior reprodutibilidade e facilidade de purificação dos biofilmes (SHULER E KARGI, 2002; ADNAN, 2015).

Porém, nos últimos anos, a fim de minimizar os custos de produção desse biopolímero, diversos parâmetros de fermentação, como controle de pH, agitação, tempo de cultivo e fontes de carbono como: cana-de-açúcar, melão, sacarose, glicose, manitol e frutas em decomposição, têm sido estudadas (SOUZA *et al.*, 2021; DE VASCONCELOS *et al.*, 2020; COSTA *et al.* 2018; HUANG *et al.* 2016; TYAGI E SURESH 2016;). Souza *et al.* (2021) utilizaram o microrganismo *K. xylinus*, em um meio de cultura suplementado com pó de café, melão de cana hidrolisado e etanol a 1% (v/v), ao final do estudo obtiveram um rendimento máximo de 11,08 g/L de CB.

Amorim *et al.* (2019) usaram resíduos de frutas tropicais como fonte de carbono em uma cultura estática por 10 dias e obtiveram 6,98 g/L de celulose. Uma alternativa usada por Kurosumi *et al.* (2009) foi a utilização de suco de laranja para produção de polímeros, obtendo-se 5,9 g/L de celulose bacteriana em 14 dias de incubação. De forma geral, os resultados mostram que a utilização de diferentes fontes de carbono dos subprodutos avaliados são alternativas viáveis na redução de custos na produção de CB.

De acordo com Donini *et al.* (2010), um dos melhores rendimentos relatados da literatura para produção de CB foi de 15,30 g / L após 50 horas de cultivo estático, onde os pesquisadores utilizaram a glicose como principal fonte de carbono, bem como, suplementação de etanol e oxigênio.

3.1.4 Condições de Cultivo da Celulose Bacteriana

Existem dois processos submersos de produção da CB. Um deles é o sistema estático que favorece a formação da CB na forma de uma membrana ou película na interface ar/líquido. O outro, é a fermentação sob agitação promovendo a homogeneização constante do meio de cultura e, como principal resultado, a CB obtida adquire tamanhos e formas variadas, como esferas, *pellets* ou suspensão fibrosa. A seleção do método depende das aplicações finais da CB, bem como das características mecânicas, físicas e morfológicas necessárias (YANG *et al.*, 1998; YAN *et al.*, 2008; WU; LIA, 2008; KADIER *et al.*, 2021).

Em um estágio inicial da produção de CB, em condições estáticas, as bactérias inoculadas consomem o oxigênio dissolvido no meio para aumentar a sua população, e, durante essa fase, uma certa quantidade de película é produzida por bactérias que estão internamente no meio, ou seja, fora da interface ar/líquido, formando um filme não uniforme e frágil, que muitas vezes se deposita no do recipiente. Após o consumo de todo oxigênio dissolvido no meio, as bactérias imersas na fase líquida, ficarão dormentes e poderão ser reativadas e usadas como inóculo em novas culturas (LAVOINE *et al.*, 2012; DUARTE *et al.* 2019).

Todavia, somente as bactérias que estão nas proximidades da interface ar/líquido na presença do oxigênio serão capazes de manter a sua atividade metabólica viável e produzir um filme polimérico uniforme e resistente que irá flutuar a fim de manter as condições ideais do crescimento celular (LAVOINE *et al.*, 2012; DUARTE *et al.* 2019).

Arelado a isso, o alto custo e o baixo rendimento são os dois principais problemas em culturas estáticas. A fim de mitigar isso, alguns autores sugerem o uso das culturas agitadas, pois o fornecimento de oxigênio está diretamente associado à produção da CB. Por outro lado, se não dimensionado de forma correta, o suprimento excessivo de oxigênio resultará em uma diminuição na formação dos biofilmes. De forma geral, em muitos experimentos, os meios agitados e estáticos resultaram basicamente na produção da mesma quantidade de CB em igual período

de fermentação (WANG *et al.*, 2019). No que se refere a isso, o modo de cultivo estático requer elevada área superficial disponível, por isso alguns pesquisadores têm indicado a cultura agitada em biorreatores como a técnica mais adequada para produção em escala industrial (LEE *et al.*, 2014).

A Tabela 2 apresenta alguns dados sobre importantes condições de cultivo estudadas na literatura.

Tabela 2 - Dados sobre condições de cultivo estudadas na literatura.

Técnica de cultivo	Microrganismo	Rendimento (g /L)	pH	Rotação (rpm)	Taxa de aeração (vvm)	Temperatura (° C)	Tempo	Referência
Meio estático	<i>K. hansenii</i> C 110	9,2	4,00	0	0	28	14 dias	Revin <i>et al.</i> (2019)
Meio estático	<i>A. xylinum</i> (ATCC 53263)	3,97	5,00	0	0	30	96h	Gao <i>et al.</i> (2020)
Meio Agitado	<i>A. xylinum</i> (ATCC 53263)	1,70	5,00	300	1,0	30	96h	Gao <i>et al.</i> (2020)
Jarra de Fermentação	<i>K. xylinus</i>	5.30	5,00	0	0	30	72h	Bae e Shoda (2004), Bae e Shoda (2005)
Meio Agitado em Incubadora rotativa	<i>A. xylinum</i> (ATCC #700178)	1,51	5.09	135	0	25	21 dias	Zeng <i>et al.</i> (2011)
Biorreator airlift modificado	<i>G. xylinus</i> (BPR2001)	1,80	5,00	130	2,0	30	66h	Wu e Li (2015)
Meio Agitado	<i>K. xylinus</i> (MTCC 2623)	3,50	*	140	*	30	24h	Dayal <i>et al.</i> (2013)
Biorreator com enriquecimento de oxigênio	<i>A. xylinum</i> (BPR2001)	10,40	4,50 -	*	0.4	30	44 h	Chao <i>et al.</i> , (2001)
Reator de discos rotativos	<i>A. xylinum</i> (0416)	7,07	*	7	0	28	96h	ZAHAN <i>et al.</i> (2016)

Fonte: A autora (2021).

De forma objetiva, o rendimento de produção da celulose bacteriana de algumas espécies produtoras encontra-se detalhado na Tabela 2 através de um comparativo entre alguns parâmetros, como o tipo de técnica de cultivo, pH, rotação, taxa de aeração, temperatura e tempo de produção para diferentes métodos encontrados na literatura.

Um estudo importante, realizado por Coimbra (2016), observou que a agitação do meio de cultura pode diminuir o rendimento de produção das CB. Segundo a autora, a velocidade de agitação aumenta os níveis de oxigênio dissolvido e favorece um maior crescimento bacteriano. Em contrapartida, a função da celulose como agente de flotação e maior contato com o oxigênio tornam-se prescindíveis, pois o maior aporte de oxigênio dissolvido no meio reduz a necessidade de produção de celulose para mantê-la na interface líquido-ar.

Sendo, portanto, essas informações cruciais para determinação de parâmetros de produção que serão considerados na presente pesquisa.

3.1.5 Meios de Cultura Alternativos para Produção de Celulose Bacteriana

Existe uma enorme diversidade de resíduos agroindustriais, entre eles, grãos, restos de frutas, bagaços, tortas e outros, provenientes de usinas sucroalcooleiras, abatedouros, indústrias do processamento de carnes, frutas e hortaliças, indústria da celulose e papel (DUARTE *et al.* 2019). Atualmente, muito tem sido relatado sobre o manejo eficiente dos resíduos orgânicos, pois o descarte incorreto gera enormes impactos ambientais. Segundo Dungani *et al.*, (2016), as agroindústrias produzem toneladas de biomassa diariamente e apenas 10% dela é usada como matéria-prima alternativa para produção de biocompósitos, componentes biomédicos, entre outros.

Dentre os grãos, o arroz é considerado alimento básico para mais 3 milhões de pessoas, e tem sua produção variando em torno de 480 milhões de toneladas por ano. A maior parte do arroz cultivado e consumido encontra-se na região asiática, onde a China e a Índia detêm cerca de 50% da produção mundial. Já a nível nacional, o Brasil ocupa a sétima posição no que diz respeito a produção desse cereal (PONTES, 2012; SATO & REIS, 2020). Outro grão muito consumido é o milho, apresentando estimativa nacional de área colhida (safra 2018/2019) de 17.333,3 mil hectares e uma produção de 99.312,3 mil toneladas (CONAB, 2019).

Associado à grande produção desse tipo de grão, tem-se a alta disponibilidade do amido proveniente do milho e do arroz, depois dos açúcares mais simples (sacarose, glicose, frutose, maltose, por exemplo) é o principal carboidrato que os vegetais superiores sintetizam a partir da fotossíntese, sendo um dos polímeros naturais mais abundantes, juntamente com a celulose (PONTES, 2012). À vista disso, devido a subutilização desse tipo de material, muitos pesquisadores avaliam seu aproveitamento, pois, resíduos da agroindústria contendo amido, poderão ser convertidos em matérias-primas para diversos processos industriais por conter grande quantidade de nutrientes (AL-ABDALLAH E DAHMAN, 2013; XIAO *et al.*, 2013; CHENG *et al.*, 2017).

Nesse contexto, a fermentação desempenha um papel de destaque no aproveitamento dos resíduos orgânicos visando à síntese de compostos de alto valor agregado e grande interesse industrial (DANTAS; AQUINO, 2010).

Em 2017, Cheng *et al.* utilizaram resíduos agrícolas de caule de milho hidrolisados como fonte de carbono para o microrganismo *Acetobacter xylinum* na produção de CB. Há também a milhocina, subproduto da moagem úmida do milho que possui uma completa fonte de nitrogênio, vitaminas e outros elementos, e pode ser utilizada no complemento nutricional para o crescimento microbiano durante a fermentação e produção de biopolímeros de CB (XIAO *et al.*, 2013).

Outro estudo produziu CB a partir de palha de trigo hidrolisada enzimaticamente por celulase, β -glucosidase e xilanase (AL-ABDALLAH E DAHMAN, 2013). Goelzer *et al.*, (2019), em seus experimentos, usaram cascas de arroz provenientes de resíduos agrícolas, pré-tratadas enzimaticamente, para produção de CB em condições aeradas e estáticas.

O melaço, subproduto da indústria açucareira, é também uma fonte de carbono muito atrativa e de baixo custo. Esse carboidrato contém grande quantidade de açúcares totais, como sacarose, glicose, frutose e rafinose (RIVAS *et al.*, 2004). Alguns trabalhos relatam a suplementação de meios de cultura utilizando melaços e milhocina na produção de CB (JUNG *et al.*, 2010; TYAGI; SURESH, 2016).

Os efluentes de destilaria são um dos maiores problemas enfrentados pelas indústrias produtoras de etanol. Com o intuito de mitigar os impactos provenientes desse setor industrial, Jahan *et al.*, 2018 utilizaram resíduos de destilação como meio potencial para produção de celulose bacteriana. O microrganismo usado foi a *Gluconacetobacter oboediens* e os principais resultados obtidos mostraram uma produção máxima de CB de 8,1 g/L do efluente bruto da destilaria.

Outro estudo desenvolvido por Barshan *et al.*, 2019 obteve biopolímeros de celulose bacteriana produzidos por *Komagatacibacter xylinus* PTCC 1734, utilizando vinhaça como meio de cultivo barato. A melhor produção foi obtida com a concentração máxima de 40% de vinhaça e tempo de incubação de 10 dias. A Tabela 3 relaciona a produtividade de CB a diferentes fontes de carbono.

Tabela 3 - Produção de Celulose Bacteriana em diferentes fontes de carbono.

Microrganismo	Principal fonte de Carbono	Tempo de cultivo	Rendimento (g/L)	Referência
<i>G. xylinus</i> ATCC 53524	Glicose	96 h	3,10	Mikkelsen <i>et al.</i> , (2009)
<i>K. xylinus</i> BPR 2001	Melaço hidrolisado por sulfúrico ácido	72 h	5,30	Bae e Shoda (2004), Bae e Shoda (2005)

<i>G. xylinus</i> (FC01)	Melaço	168 h	1,64	Cakar <i>et al.</i> , (2014)
<i>G. xylinus</i> ATCC 53524	Sacarose	96 h	3,83	Mikkelsen <i>et al.</i> , (2009)
<i>G. xylinus</i> ATCC 53582	Hestrin and Schramm (HS) + Cultura de frutas podres	96 h	60,0	Jozala <i>et al.</i> , (2014)
<i>A. xylinum</i> ATCC 23769	Casca de arroz hidrolisada + glicose	10 dias	2,42	Goelzer <i>et al.</i> , (2009)
<i>K. sucrofermentans</i> DSM 15973	Glicerol + Hidrolisados de farelo de girassol	15 dias	13,30	Tsouko <i>et al.</i> , (2015)
<i>A. xylinum</i> NRRLB-42	Bagaço de uva/ Licor demaceração de milho	21 dias	6,70	Cerrutti <i>et al.</i> , (2016)
<i>G. hanseni</i> PJK(KCTC 10505 BP)	Resíduos da produção de cerveja + Glicose	14 dias	8,60	Ha <i>et al.</i> , (2008)

Fonte: A autora (2021).

Acerca das pesquisas publicadas na literatura, estudos como os de Goelzer *et al.*, (2009) e Cerrutti *et al.*, (2016) poderão agregar informações importantes ao objeto de estudo desta tese, por se tratar da utilização de cascas de arroz hidrolisadas e licor de maceração de milho.

Em resumo, mesmo que muitos meios, comerciais ou alternativos, sejam suplementados com diversas fontes de carbono para a produção de CB, é importante identificar os meios mais adequados e as melhores condições de cultivo para atingir alta produtividade.

3.1.6 Aplicações da Celulose Bacteriana

A celulose bacteriana possui uma rede de fibras ultrafinas com poros de geometria variável e uma boa capacidade de moldagem em diferentes estruturas (STUMPF *et al.* 2018). Devido às suas propriedades únicas, que outros biomateriais não apresentam, a celulose bacteriana tem se mostrado um biopolímero com amplas aplicações. Nos últimos anos, diversas áreas como por exemplo, na indústria alimentícia (AZEREDO 2018), embalagens ativas (SILVA, 2018), biomédica (HOBZOVA *et al.* 2018), cosmética (STASIAK-ROZANSKA & PLOSKA 2018) e nanocompósitos (RAI *et al.* 2019), demonstram interesse em suas características.

No setor alimentício, um famoso doce chamado de nata de coco (Figura 5), nativo das Filipinas, se tornou um dos primeiros produtos alimentícios de polpa

bacteriana (DUARTE *et al.* 2019). O doce é um produto da fermentação direta da bactéria *Komagaitebacter xylinus* em água de coco ou suco de abacaxi, gerando um produto final muito apreciado pelo seu sabor adocicado (GAMA; GATENHOLM; KLEMM, 2012).

Buscando melhorar a qualidade dos alimentos, biopolímeros de CB foram utilizados como aditivos de baixa caloria, estabilizantes, espessantes, modificadores de textura, ou como embalagens (SHI *et al.*, 2014).

Figura 5 - Sobremesa a base de CB conhecida com nata de coco.



Fonte: AZEREDO *et al.*, (2019).

Em 2020, Buruaga-Ramiro *et al.* desenvolveram um papel bioativo antimicrobiano feito de celulose bacteriana. Esses pesquisadores utilizaram a lisozima, enzima de origem natural que possui ação antimicrobiana, para incorporar a fibra celulósica. O intuito principal da pesquisa foi criar um material novo para aplicação em embalagens ativas.

Silva (2018) desenvolveu e caracterizou filmes compósitos produzidos por goma de caju e celulose bacteriana nanofibrilada. Os resultados foram promissores, indicando uma possível aplicação do compósito na elaboração de embalagens de alimentos devido a importantes propriedades, como resistência à tração, solubilidade, diminuição da permeabilidade, homogeneidade e estabilidade térmica.

Albuquerque *et al.* (2021) desenvolveram uma mistura de polímeros contendo celulose bacteriana e poli (3-hidroxibutirato) ativado com óleo essencial de cravo para uso em embalagens ativas de alimentos. Os resultados mostraram que o filme desenvolvido é muito promissor por exibir ação antimicrobiana, e por apresentar

também, características mecânicas e térmicas favoráveis para uso em embalagens alimentícias.

Na área biomédica, pela aplicabilidade diversa, a celulose bacteriana destaca-se em muitos segmentos. A sua alta umidade, biocompatibilidade e a possibilidade de controlar diretamente o processo de biossíntese tornam possíveis a utilização das membranas nos muitos processos na engenharia de tecidos, como por exemplo, na cicatrização de feridas crônicas, queimaduras, em vasos sanguíneos artificiais, como cartilagem, válvulas cardíacas entre outros (ALMEIDA *et al.*, 2022; NASCIMENTO 2018).

Em 2018, Zmejkoski *et al.* desenvolveram um hidrogel composto de celulose bacteriana e lignina. Como principal resultado, o material foi promissor no tratamento de feridas crônicas, pois, teve efeito inibidor frente às bactérias clinicamente isoladas, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Serratia sp.*, e, em estirpes como, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *S. typhimurium*. O compósito também apresentou liberação prolongada de compostos antibacterianos, o que pode ser benéfico na prevenção de infecções. Ainda nessa área, Kamal *et al.*, 2022 desenvolveram filmes de celulose bacteriana produzidos com resíduos de tomate. Os filmes foram impregnados com extrato vegetal bioativo da planta *Dracaena serrulata*, composto antimicrobiano verde para potenciais aplicações biomédicas.

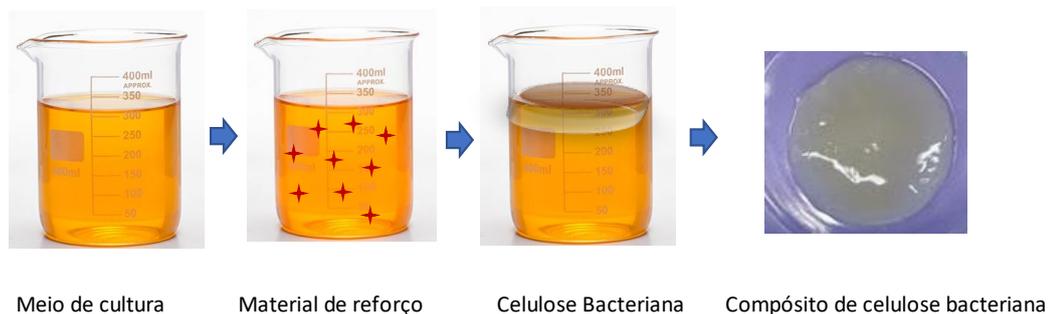
No setor de cosméticos, ativos naturais vêm alavancando o mercado que está em constante expansão. Esses ativos são substâncias que podem ser responsáveis pela melhora da pele, por exemplo, e são incorporados aos polímeros que os transportam até a derme. Polímeros naturais como nanofibras de celulose bacteriana, polpa de celulose e hidrogéis têm sido usados como materiais essenciais para a fabricação desse tipo de cosméticos.

Amorim *et al.* (2020) avaliaram a incorporação de um extrato de própolis em filmes de CB, a fim de ser usado como máscara hidratante e anti-inflamatória em peles com tendência a acne e inflamações. Os resultados do estudo proposto por esses pesquisadores foram promissores, pois, o extrato de própolis mostrou-se favorável como agente anti-inflamatório e mantendo as propriedades iniciais dos biopolímeros de CB.

A natureza hidrofílica da celulose favorece o desenvolvimento de muitos compósitos ambientalmente corretos (YU *et al.* 2006). Os compósitos contendo celulose podem ser preparados por uma mistura de materiais compatíveis com água

ou por extrusão com material de matriz plástica imiscível em água (HUBBE *et al.* 2008). Vários pesquisadores usaram a celulose bacteriana como material de base para o desenvolvimento de compósitos (EVANS *et al.* 2003; NAKAYAMA *et al.* 2004; YU *et al.* 2006; YOON *et al.* 2006; SAIBUATONG E PHISALAPHONG, 2010; TANG *et al.* 2010; SHAH *et al.* 2013). Com base na natureza dos agentes de combinação os compósitos poliméricos podem ser sintetizados de duas formas básicas: “in situ” e “ex situ”. O método in situ, o aditivo faz parte do meio de fermentação e sua incorporação ocorre durante sua síntese (Figura 6).

Figura 6 - Síntese “in situ” de compósitos de celulose bacteriana.

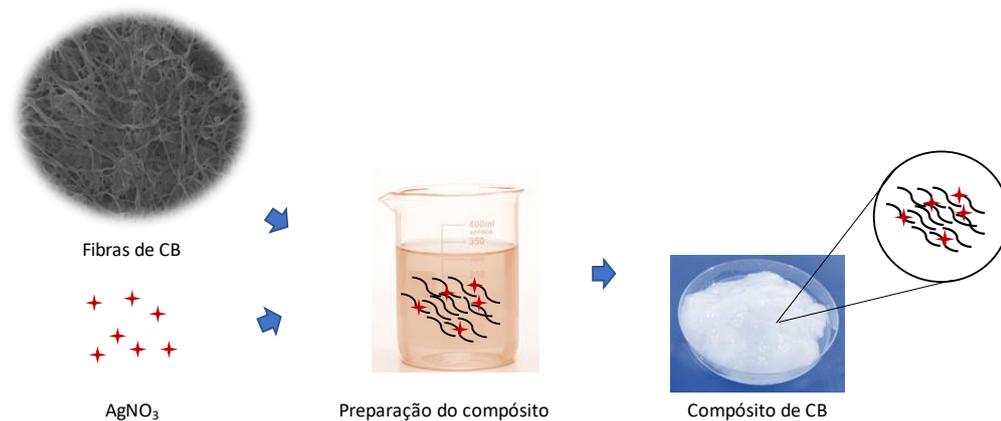


Fonte: AMORIM *et al.*, (2021), Adaptada.

Em 2010, Saibuatong e Phisalaphong (2010) utilizaram o método de síntese “in situ” para o desenvolvimento de biocompósitos de celulose bacteriana. Os filmes eram compostos de celulose bacteriana e aloe vera, onde a mesma era adicionada em diferentes proporções ao meio de cultivo da celulose bacteriana sob condições estáticas. Os componentes do aloe vera ficaram aderidos nas fibrilas de celulose bacteriana, o que agregou propriedades físico-mecânicas superiores ao material final. O que acontece nesse tipo de processo é que as microfibrilas de celulose bacteriana crescem formando uma espécie de “teia” capaz de se ligar a vários materiais adicionados ao meio de cultura, resultando em compósitos de CB (HORII *et al.* 1997; TANG *et al.* 2010).

No método “ex situ” (Figura 7), a CB é inicialmente produzida sem o aditivo e após sua síntese é impregnada com materiais de reforço para produzir os compósitos (SAIBUATONG e PHISALAPHONG 2010; SHAH *et al.* 2013).

Figura 7 - Síntese “ex situ” de compostos de celulose bacteriana através da redução dos íons prata.



Fonte: AMORIM *et al.*, (2021), Adaptada.

Nanoceluloses obtidas por meio de culturas estáticas são geralmente utilizadas para a síntese de compósitos com aplicações biomédicas e industriais (MANEERUNG *et al.* 2008). A grande utilização desse biopolímero se deve a sua porosidade e por conter grupamentos OH disponíveis, pois, nanopartículas podem facilmente ser absorvidas pela matriz polimérica através de interações de caráter físico ou químicas. Outro fator importante da síntese “*ex situ*” é que a estrutura do polímero permanece basicamente inalterada. À face do exposto, muitos pesquisadores buscam desenvolver compostos formados a partir de polímeros, materiais inorgânicos, metais e óxidos de metal (EVANS *et al.* 2003; NAKAYAMA *et al.* 2004; YOON *et al.* 2006).

A partir da celulose bacteriana produzida por *Acetobacter xylinum*, Maneerung *et al.* (2008) reduziram o íon prata absorvido na matriz polimérica com o intuito de obter um material interessante para uso como curativo. Por fim, a celulose bacteriana impregnada com nanopartículas de prata liofilizada exibiu forte atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva).

Apesar das pesquisas que buscam identificar variáveis de processo adequadas e microrganismos potencialmente produtores de CB, a fonte de carbono ainda é uma das mais importantes variáveis de investigação para acompanhar a produtividade e viabilidade celular durante o crescimento microbiano. Nesse contexto, o amido presente em diversos cereais são fontes de carbono valiosas e abundantes em nosso bioma. Dentre os cereais, o arroz e o milho são importantes fontes de nutrientes a serem estudados, por conter macro e micro nutrientes

fundamentais ao crescimento celular e formação dos biopolímeros de celulose bacteriana.

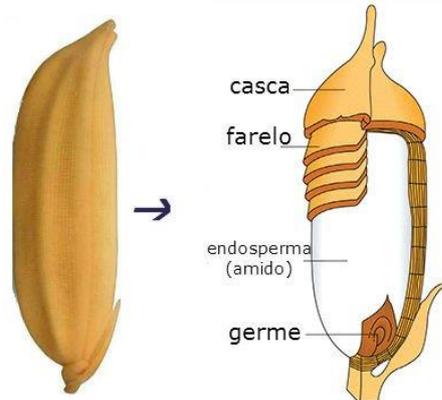
3.2 OS CEREAIS

3.2.1 O Arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um importante cereal da dieta do brasileiro, tendo seu maior consumo na forma de grãos inteiros, descascados e polidos. Por possuir condições privilegiadas de plantio em várzeas e terras altas, o Brasil destaca-se entre os maiores produtores deste alimento, atingindo a marca de 11,5 milhões de toneladas (LIMBERGER *et al.*, 2008; PONTES *et al.*, 2012; IBGE, 2021).

Com relação às características botânicas, o arroz (Figura 8) é um frutosemente das gramíneas e possui quatro componentes principais: casca, farelo, endosperma e germe, e que poderão ser removidas durante o beneficiamento do produto para consumo (VIEIRA; RABELO, 2006).

Figura 8 - Estruturas básicas do grão de arroz.



Fonte: CARVALHO (2015).

É durante o beneficiamento do arroz que se inicia a separação da casca do resto do grão para a obtenção do arroz polido para o consumo. O Arroz polido (branco) é o arroz de grãos longos e finos, destituído da camada externa e do germe. Já no Arroz integral, sua aparência mais escura deve-se à presença da camada de farelo e do germe. Nesse tipo de cereal são encontradas maiores concentrações de fibras, proteínas, cálcio, fósforo, ferro e vitaminas do complexo B (RATHNA, 2019).

O arroz parboilizado apresenta uma cor amarelada e odor mais forte. A parboilização é um tratamento hidrotérmico onde o arroz é encharcado, aquecido e seco. Posteriormente, o grão parboilizado é descascado podendo ser comercializado na forma “parboilizado integral” ou “parboilizado polido”, sendo mais comum o parboilizado polido (ABIAP, 2007; DORS *et al* 2009; RATHNA, 2019). A Tabela 4 apresenta uma importante comparação entre os cereais que serão objeto de estudo nesta pesquisa.

Tabela 4 - Comparação entre a composição química (%) do arroz integral, polido e Milho.

Constituinte	Arroz integral	Arroz polido	Milho
Amido	74,12	87,58	72,00
Proteínas	10,46	8,90	9,50
Lípídeos	2,52	0,36	4,00
Fibras	11,76	2,87	9,00
Cinzas	1,15	0,15	1,20

Fonte: PONTES, 2012; EMPRAPA, 2006 (Adaptada).

Fazendo uso da Tabela 4, observa-se que os grãos de arroz têm, basicamente, em sua composição química, proteínas, lipídios, fibras, cinzas e amido, sendo este último, encontrado em maior quantidade no grão desse cereal (TURINI *et al.*, 2021).

O amido, presente em grande quantidade nos grãos de arroz, é composto por dois polissacarídeos, amilose e amilopectina e, quando hidrolisado, produz oligossacarídeos, dextrinas e glicose (ECKERT *et al.*, 2018), o que o torna bastante atrativo para ser utilizado como fonte energética em diversos processos industriais.

Ademais, o alto teor desse polissacarídeo pode ser convertido, através de técnicas simples e economicamente viáveis, em açúcares fermentáveis. A exemplo disso, tem-se o processo de hidrólise enzimática que consiste numa reação química catalisada por uma enzima que utiliza água para quebrar uma molécula em duas outras (PONTES *et al.*, 2012; TURINI *et al.*, 2021).

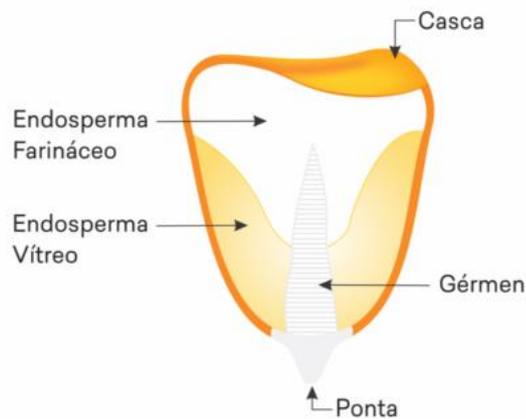
A hidrólise enzimática do amido através da ação seletiva da enzima resulta em uma eficiente conversão do polissacarídeo sob condições específicas de pH, temperatura, concentração e tempo de reação (FERREIRA *et al.*, 2013; BISSWANGER, 2014).

3.2.2 O Milho

A cultura do milho (*Zea mays*) caracteriza-se como uma grande fonte econômica no Brasil, abrangendo muitas regiões. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, durante o Levantamento Sistemático da Produção Agrícola em agosto de 2021, a safra do milho atingiu uma produção de 61,7 milhões de toneladas. Destacando o Brasil como um dos maiores produtores do mundo.

O milho, originário do México, é formado por quatro principais estruturas físicas: endosperma, gérmen, pericarpo (casca) e ponta (Figura 9), as quais diferem em composição química (Tabela 4) e também na organização dentro do grão (SINGH *et al.*, 2011; CARVALHO, 2016; GIACOBBO, 2020).

Figura 9 - Anatomia do grão de milho e suas partes.



Fonte: PAES (2006).

O Endosperma representa aproximadamente 82% do peso seco do grão e é composto principalmente por amido. No endosperma estão presentes também as proteínas de reserva que compõem a matriz que envolve os grânulos de amido.

Com base na distribuição dos grânulos de amido e da matriz proteica, o endosperma é classificado em dois tipos: farináceo e vítreo. No primeiro, os grânulos de amido são arredondados e estão dispersos, não havendo matriz proteica. Em contrapartida, no endosperma vítreo, a matriz proteica é mais densa com corpos proteicos estruturados. O gérmen representa 11% do grão de milho e concentra a maior parte dos lipídios e minerais. O Pericarpo, compondo em média 5% do grão, é a estrutura que protege o grão dos microrganismos, insetos e umidade do ambiente. Por fim, temos a Ponta, que é a menor estrutura, apenas 2%, e conecta o grão ao sabugo (PAES, 2006; SINGH *et al.*, 2011; CARVALHO, 2016; GIACOBBO, 2020).

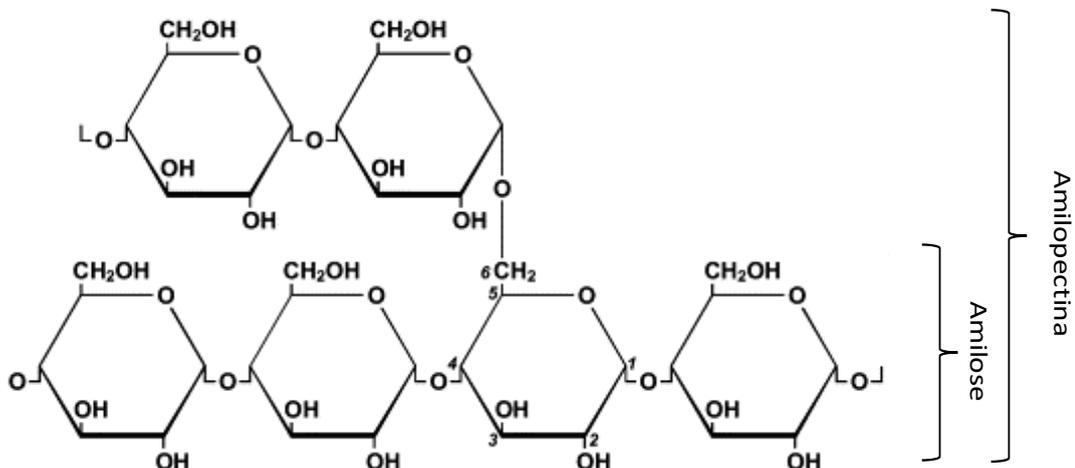
As várias formas de processamento dos grãos de milho podem mudar o seu valor nutritivo. Isso pode ocorrer, por exemplo, pelas alterações físicas, a exemplo da moagem, quebrando as barreiras de acesso ao amido e facilitando o processo de hidrólise (LAGE *et al.*, 2017).

Durante o processo de moagem ocorre a redução do tamanho de partículas a partir da força do impacto corte ou atrito, seguido de peneiramento e eliminação do pericarpo, que constitui uma barreira física. A Indústria moageira fabrica diversos produtos como: canjiquinha, canjica, creme de milho, fubá de milho, floculados, farinhas, óleos, etc. (MAPA; SPA; IICA, 2007; LAGE *et al.*, 2017).

3.3 O AMIDO

O amido é um polissacarídeo formado por unidades de glicose unidas. Depois dos açúcares simples, como sacarose, glicose, frutose e maltose, por exemplo, o amido é o principal carboidrato sintetizado pelos vegetais superiores a partir da fotossíntese. O grânulo de amido é constituído de dois componentes poliméricos principais: a amilose e a amilopectina. Quimicamente, a molécula de amilose possui ligações glicosídicas α -(D) -1-4 que lhe confere conformação helicoidal, enquanto que a amilopectina é ramificada, com ligações glicosídicas α -(D) -1-4 (cadeia principal) e α -(D) -1-6 (ramificações) (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2015; GADHAVE *et al.*, 2017). A Figura 10 apresenta as estruturas químicas da amilose e da amilopectina.

Figura 10 - Estrutura química da amilose e amilopectina.



Fonte: PONTES, Adaptada (2016).

As proporções da amilose e da amilopectina na composição do amido podem variar de acordo com sua origem, porém, a maioria dos amidos contém de 20 a 30% de amilose e 70 a 80% de amilopectina (PONTES, 2016). Outras características que também podem variar conforme a origem botânica do amido são cristalinidade, a forma, tamanho do grânulo entre outros constituintes, como por exemplo, os teores de lipídeos, de cálcio, fósforo, magnésio, potássio e sódio, encontrados em pequenas quantidades (menos que 4%) (YONEMOTO, 2007; PONTES, 2016).

Na Tabela 5 estão detalhadas algumas características dos tipos de amido, presentes no arroz e milho.

Tabela 5 - Características dos amidos presentes no arroz e no milho.

Fonte	Teor de Amilose (%)	Teor de Amilopectina (%)	Diâmetro (μm)	Formato
Arroz	19	81	3-8	Arredondado Oval
Milho	25	75	5-26	Poligonal

Fonte: FOOD INGREDIENTS BRASIL (2015).

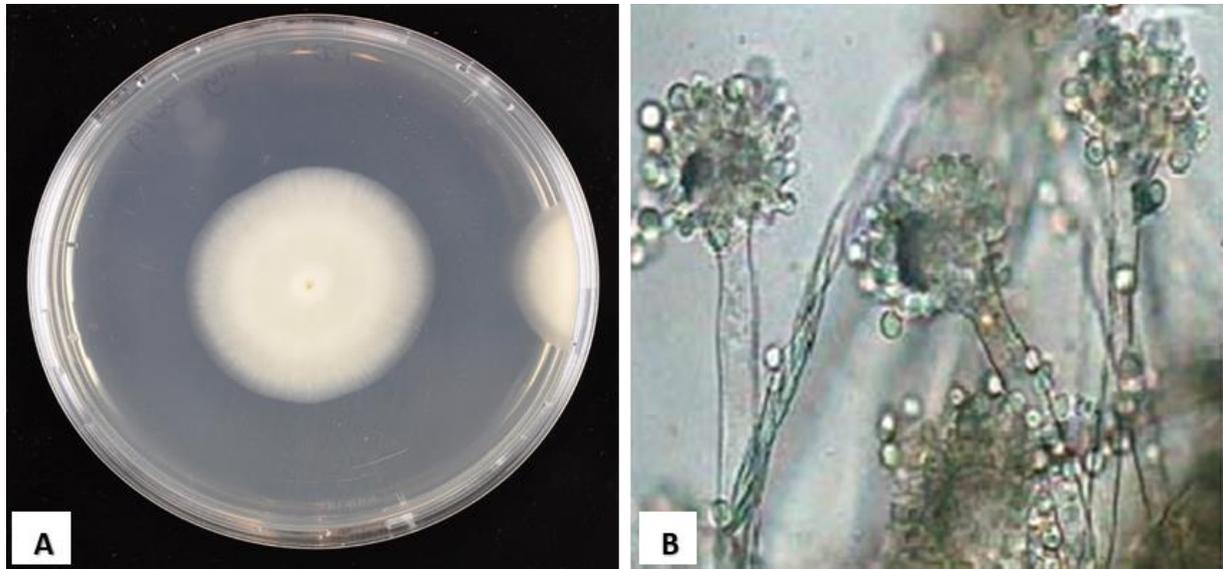
Industrialmente, o amido é muito utilizado na produção de xaropes açucarados e produtos com grande aplicação alimentícia. Muitos países, principalmente do continente asiático se beneficiam da hidrólise do amido por meio da ação enzimática de origem fúngica, já que esses microrganismos são bons produtores de amilases que convertem o amido em glicose, maltose, dextrose, entre outros. De forma geral, a ação fúngica e suas enzimas permitem que muitos processos químicos sejam mais econômicos e sustentáveis (PASSOS, 2000; SEVERO *et al.* 2010; FERREIRA *et al.*, 2013; TÔRRES, 2014).

3.4 O FUNGO

Os fungos são seres quimiorganotróficos, pois, absorvem componentes orgânicos como fonte de energia. Eles podem se desenvolver em meios de cultivo formando colônias de dois tipos: leveduriformes ou filamentosas. As colônias leveduriformes são pastosas ou cremosas, formadas por microrganismos unicelulares; já as colônias filamentosas podem ser algodonosas, aveludadas ou pulverulentas e são constituídas fundamentalmente por elementos multicelulares em forma de tubo (as hifas) (VIEIRA & FERNANDES, 2012).

O *Aspergillus oryzae* é um fungo filamentosso importante, amplamente aplicado nas indústrias tradicionais de fermentação e processamento de alimentos (JIE JIN *et al.*, 2021) (Figura 11).

Figura 11 - Colônias algodonosas de *A. oryzae* crescido em placa de Petri (A) e a microfotografia das hifas fúngicas e seus esporos medindo 6,5 µm de diâmetro (B).



Fonte: HAZAA *et al.*, (2014); IGEM (2018), Adaptada.

Frequentemente usado na produção de molho de soja, pasta de soja e fabricação de licores, o *A. oryzae* tem uma forte capacidade de secretar grandes quantidades de enzimas hidrolíticas, tornando-se assim, um importante microrganismo para biotecnologia enzimática. Desde a sua descoberta, quando foi isolado pela primeira vez por H. Ahlburg em 1876, até os dias de hoje, seu uso se difundiu bastante na indústria alimentícia, o que o levou a ser declarado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e Organização Mundial da Saúde (OMS) como organismos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) (KOBAYASHI *et al.*, 2007; PINTO, 2012; JIE JIN *et al.*, 2021).

3.5 HIDRÓLISE DO AMIDO

O processo químico da hidrólise do amido que corresponde a quebra de moléculas em unidades menores, normalmente acontece pela via enzimática ou ácida. Na hidrólise ácida, o baixo tempo de sacarificação é uma importante vantagem para o processo, porém, a corrosão dos equipamentos e a necessidade

de neutralização da solução após a hidrólise pode provocar destruição dos açúcares, diminuindo o rendimento da fermentação (VÍTOR, 2018).

Embora ainda seja muito utilizada, a modificação ácida vem perdendo espaço para a modificação enzimática que apresenta muitas vantagens, pois, a especificidade das enzimas proporciona a obtenção de produtos com propriedades químicas e físicas melhor definidas (FERREIRA *et al.*, 2013). Durante a modificação dos materiais amiláceos, as reações enzimáticas são realizadas em condições brandas de temperatura e pH, a exemplo, tem-se uma alfa-amilase produzida pelo *Aspergillus flavus* NSH9 que é termicamente estável a 50 ° C (KARIM *et al.*, 2018). Essas enzimas são altamente específicas, reduzindo o número de reações colaterais e a geração de resíduos durante o processamento (PASSOS, 2000; SEVERO *et al.* 2010; FERREIRA *et al.*, 2013; TÔRRES, 2014).

Além do mais, as enzimas também permitem que processos químicos sejam mais econômicos pelo fato de diminuir o consumo de energia. Alguns microrganismos, como algumas bactérias marinhas, podem permanecer vivas em baixas temperaturas e produzir enzimas ativas a frio (ELYASI *et al.*, 2020).

Uma variedade de enzimas amilolíticas é capaz de hidrolisar, de acordo com sua maneira de atuação, o amido presente em muitos grãos e raízes. No que se refere a isso, as alfa-amilases utilizadas para fins industriais são derivadas principalmente de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus amyloliquefaciens* (COSTA, 1996; TÔRRES, 2014; FAR *et al.*, 2020). Outros microrganismos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori* e *Aspergillus oryzae* são também produtores de alfa-amilase. Esse tipo de enzima é uma boa fonte para utilização na indústria (FAR *et al.*, 2020) e, portanto, a principal enzima envolvida na hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 (OATES, 1997; TAWIL *et al.*, 2011). As mesmas são classificadas como endoenzimas que catalisam as reações de hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 presentes na molécula de amido liberando produtos como glicose, maltose, entre outros (PANDEY *et al.* 2005).

De maneira geral, as amilases atuam em alguma imperfeição presente na superfície do grânulo de amido, formando cavidades cônicas. A ação contínua da α -amilase causa erosão nos grânulos que podem vir a ser quebrados completamente. Muitos fatores, como por exemplo, a origem do amido, podem afetar o processo de hidrólise, bem como, as características físico-químicas, morfológicas e estruturais. Dentre os parâmetros estruturais, a cristalinidade, o tamanho de grânulos, a

superfície específica disponível, a taxa amilose/amilopectina, a porosidade e o grau de integridade são importantes fatores que regem o processo de hidrólise dos grânulos desse polissacarídeo (JACOBS *et al.*, 1998; TÔRRES, 2014).

3.6 EMBALAGENS SUSTENTÁVEIS

Na indústria alimentícia as embalagens desempenham um papel fundamental graças às suas múltiplas funções. Além de conter o produto, a embalagem é muito importante na conservação, pois atua como barreira de proteção contra deterioração química, física e microbiológica. A Associação Brasileira de Embalagem define embalagem como um recipiente ou envoltura que armazena produtos temporariamente, individualmente ou agrupando unidades. Assim, tem como principal função protegê-lo e estender o seu prazo de vida útil ou tempo de prateleira (*shelf life*), viabilizando sua distribuição, identificação e consumo (JORGE, 2013; FERREIRA *et al.*, 2019).

São muitas as matérias-primas (plástico; vidro; metal; madeira; papel) utilizadas nas embalagens e cada vez mais o avanço nas pesquisas de novos produtos e insumos permite a obtenção de inovações ao mercado consumidor consciente da sustentabilidade. Dentre as matérias-primas citadas, o papel se classifica como material celulósico biodegradável e reciclável. São oferecidos com diversas espessuras e formatos, garantindo boa qualidade de impressão. Nesse grupo estão os sacos e papéis de embrulho, as caixas e cartuchos de papelão liso e as caixas de papelão ondulado (FERREIRA *et al.*, 2019; ABRE, 2022).

Contudo, a celulose vegetal apesar de ser biodegradável tem sua cadeia produtiva atrelada a muitos problemas ambientais. No Brasil, em 2019, foram produzidas 19,7 milhões de toneladas de celulose vegetal, das quais 53,3% foram destinadas à produção de papel (IBÁ, 2020). Apesar da grande contribuição na economia de vários países, a indústria de celulose e papel é considerada uma das principais responsáveis pelo impacto negativo ao meio ambiente. Anualmente, essa indústria utiliza grandes quantidades de madeira, água e energia, além de gerar consideráveis resíduos sólidos e águas residuais que precisam ser tratados (GOPAL *et al.*, 2019; KONG *et al.*, 2020; EPE, 2022).

Preocupados com essa situação, diversos pesquisadores vêm buscando o desenvolvimento de polímeros verdes e cadeia produtiva limpa com o intuito de reduzir os inúmeros impactos ambientais ligados ao setor de embalagens. No Brasil, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) estuda novos materiais que poderão ser transformados em embalagens. Mattoso (2018), em suas pesquisas, desenvolveu um plástico comestível a partir de pectina, romã, ácido cítrico e glicerol. Como principal resultado, ele obteve um material com boas propriedades mecânicas, cor e sabor de romã.

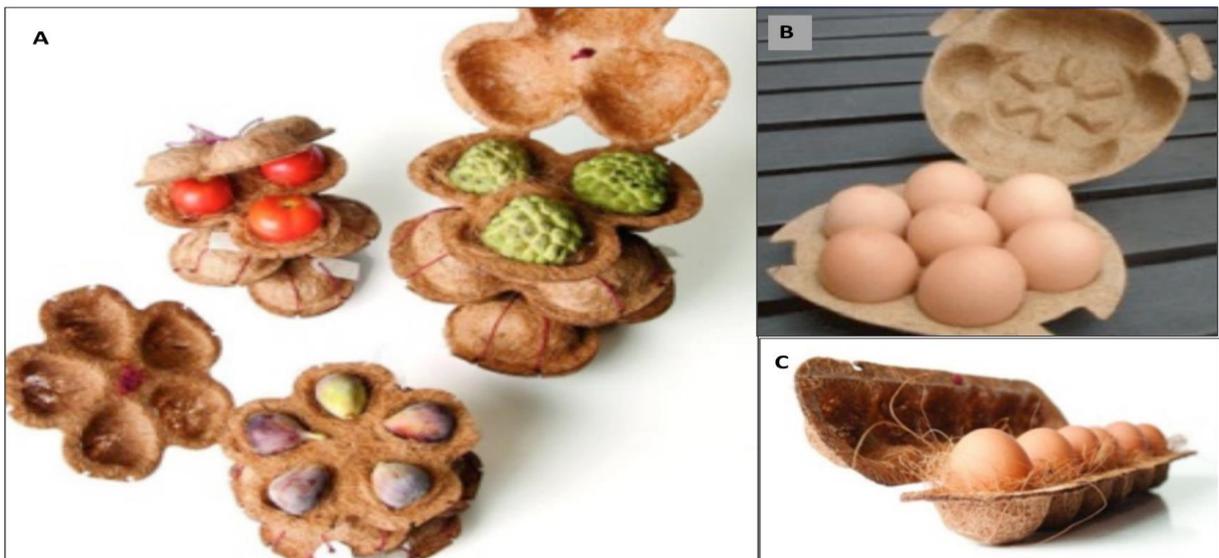
Pesquisadores como Yousefi *et al.* (2013) produziram um papel condutor à base de fibras celulósicas naturais (palha de arroz) e polímeros condutores (polianilina). O novo material apresentou potencial utilização em uma embalagem antiestática ou antimicrobiana.

Vargas *et al.* (2012) exploraram o potencial de palhas de cereais (aveia, milho, colza e cevada) para serem usadas em embalagens biodegradáveis. O processo visava a obtenção da polpa de celulose para uso na fabricação de uma embalagem 100% biodegradável. Nesse estudo, as folhas de papel feitas de polpas celulósicas foram caracterizadas e consideradas adequadas para a produção de embalagens ecológicas.

Em geral, as embalagens feitas à base de materiais biodegradáveis não oferecem riscos ao meio ambiente. Elas são feitas de inúmeros tipos de matérias-primas como: fibra de casca de coco, cogumelos, papel reciclado, fécula de mandioca, bagaço de cana de açúcar, bagaço de milho e celulose bacteriana (YOUSSEF *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2019).

Em 2016, Calegari e Oliveira apresentaram um estudo sobre a aplicação de diversos compósitos a partir de materiais de fontes renováveis como alternativa para o desenvolvimento de novos produtos. Nessa revisão, elas descreveram embalagens (base de fibra de coco e polvilho) para frutas e ovos (Figura 12 A e 12 C) criadas pela a designer Manuela Yamada, da Ybá - design e pesquisa; outro exemplo é uma embalagem para ovos produzida com compósitos a partir da fibra de coco e borracha natural (Figura 12 B) desenvolvida pelo professor Adoniel Amparo, no curso Cultivo Orgânico de Coco (CPT - Centro de Produções Técnicas).

Figura 12 - Embalagens à base de fibra de coco e polvilho para frutas e ovos (A e C); embalagem para ovos produzida com compósitos a partir da fibra de coco e borracha natural (B).



Fonte: YBÁ, (2013); CPT (2022).

3.6.1 Embalagens Utilizando Celulose Bacteriana

Segundo o artista e designer italiano Bruno Munari, “A natureza é a primeira produtora de embalagens do mundo: cada casca ou pele visa proteger seu conteúdo”. Seguindo esse propósito, Ellen Rykkelid em '*Growing Products*' (2015) usou água, cascas de batata, frutas e uma cultura inicial (SCOBY) para sua produção de CB. O filme fino de CB foi lavado, seco e colocado em uma impressora, para então, desenvolver uma embalagem (Figura 13) para batatas fritas (COHEN *et al.*, 2020).

Figura 13 - Embalagem de batatas fritas feita apenas de celulose bacteriana.



Fonte: *Growing Products* (2015).

A CB é um biopolímero extremamente versátil, podendo ser trabalhado e moldado em sua forma pura ou processado e aditivado com materiais de carga, afim de se obter novos compósitos. A embalagem compostável para snacks é um exemplo disso. A base da matéria prima utilizada na embalagem desenvolvida (Figura 14) é uma mistura de celulose bacteriana e cascas de ovo (CAMPOS, 2020).

Figura 14 - A: Solução de celulose bacteriana e casca de ovo. B: Embalagem compostável para snacks.



Fonte: Escola de Design, UEMG (2021).

No cenário atual, já é possível observar empresas e iniciativas pesquisando e produzindo celulose bacteriana com o intuito de desenvolver uma nova geração de materiais naturais e sofisticados para aplicações em produtos de consumo, como por exemplo, embalagens compostáveis (IDEIA CIRCULAR, 2019).

O potencial da CB vai muito além das aplicações existentes, especialmente se ela puder ser produzida de forma barata e em grandes quantidades. Como por exemplo, a empresa indiana, Malai, que apresentou uma coleção de acessórios feitos com um biocompósito formado por uma matriz de CB e por fibras da folha de bananeira como material de reforço (LI *et al.*, 2015; ELLWANGER, 2022).

Para muitos autores, esse tipo de material, extremamente versátil, poderá ser amplamente utilizado no setor de alimentos, farmacêutico, na indústria têxtil, em cosméticos, em materiais funcionais avançados, embalagens, materiais filtrantes, entre outros (LI *et al.*, 2015; ELLWANGER, 2022).

Um estudo desenvolvido Liu *et al.* (2023) avaliou filmes biodegradáveis compostos de quitosana/celulose bacterianas combinadas com curcumina na

preservação de morangos. Como principais resultados os pesquisadores observaram que a adição de curcumina aumentou a hidrofobicidade e permeabilidade ao oxigênio do filme e que, o filme ativo, com 0,5% de curcumina, exibiu boas propriedades de barreira, hidrofobicidade e propriedades mecânicas. Além disso, o filme permitiu uma preservação superior dos morangos em comparação com o filme Polietileno.

Em suas pesquisas, Yang *et al.* (2020) desenvolveu filmes inteligentes de celulose bacteriana/quitina, contendo microesferas ativas naturais de curcumina (Cur). Os pesquisadores observaram que a estrutura 3D da celulose bacteriana pode adsorver a curcumina, liberando seus ativos de forma controlada, melhorando assim o desempenho dos filmes. Nesse estudo, as partículas de Cur reduziram a resistência à tração e aumentaram a permeabilidade ao vapor de água do filme. No entanto, a quitina melhorou a resistência mecânica e as propriedades de barreira dos filmes compósitos. Além disso, os filmes apresentaram boa capacidade antioxidante e atividade antibacteriana.

Outro estudo desenvolvido por Reyes *et al.* (2022) avaliou a produção e caracterização de filmes biocompósitos de celulose bacteriana (kombucha) revestidos com quitosana. Como principais resultados, os pesquisadores observaram que a incorporação dos revestimentos de quitosana não afetou a espessura; entretanto, aumentou a opacidade (75,24%), a solubilidade (64,91%), a atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (6,55 mm) e *E. coli* (8,25 mm), bem como a atividade antioxidante (57,71% e 24,57% de atividade sequestradora de radicais livres). Os resultados sugeriram que os filmes desenvolvidos apresentam potencial aplicação como material de embalagem ativa para alimentos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia será apresentada em três etapas, duas referentes à produção de celulose bacteriana em processos que ressaltam a fonte de carbono e uma referente à aplicação da CB para embalagem alimentícia.

4.1 ETAPA 1: PRODUÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA UTILIZANDO AMIDO

Nesta etapa houve o desenvolvimento da fermentação para obtenção de meio sacarificado a partir dos grãos de arroz e milho na presença do fungo *Aspergillus oryzae* e, posteriormente, produção dos biopolímeros de celulose bacteriana a partir dos hidrolisados.

4.1.1 Os Microrganismos

O fungo *Aspergillus oryzae* foi adquirido da Probióticas Brasil® e utilizado no processo de hidrólise do amido.

A bactéria *Komagataeibacter rhaeticus* foi obtida do acervo de culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco e utilizada para a produção de CB.

4.1.2 Preparação dos Grãos

Dois grãos foram usados como fontes alternativas de carbono. *Zea mays* (flocos de milho) e *Oryza sativa* (arroz parboilizado - tipo II) foram triturados em liquidificador industrial de baixa rotação por 5 minutos e separados de acordo com sua granulometria por meio do uso de peneira com malha 14 mesh. Em seguida, 120,0 g / L dos grãos foram transferidos para dois frascos Fernbach de 1000 mL e esterilizados em autoclave Primatec-CS por 20 minutos a 121 ° C e 1 atm. Por fim, o fungo *Aspergillus oryzae* foi inoculado na concentração de $1,8 \times 10^6$ esporos / mL por 72 horas a 28 ° C.

4.1.3 Preparação do Meio de conservação

O meio de cultura Hestrin-Schramm (HS) utilizado para a conservação e controle da bactéria foi preparado com a seguinte composição: glicose ($C_6H_{12}O_6$; 0 g / L), peptona (5 g / L), extrato de levedura (5 g / L), fosfato dissódico ($Na_2HPO_4 \cdot H_2O$;

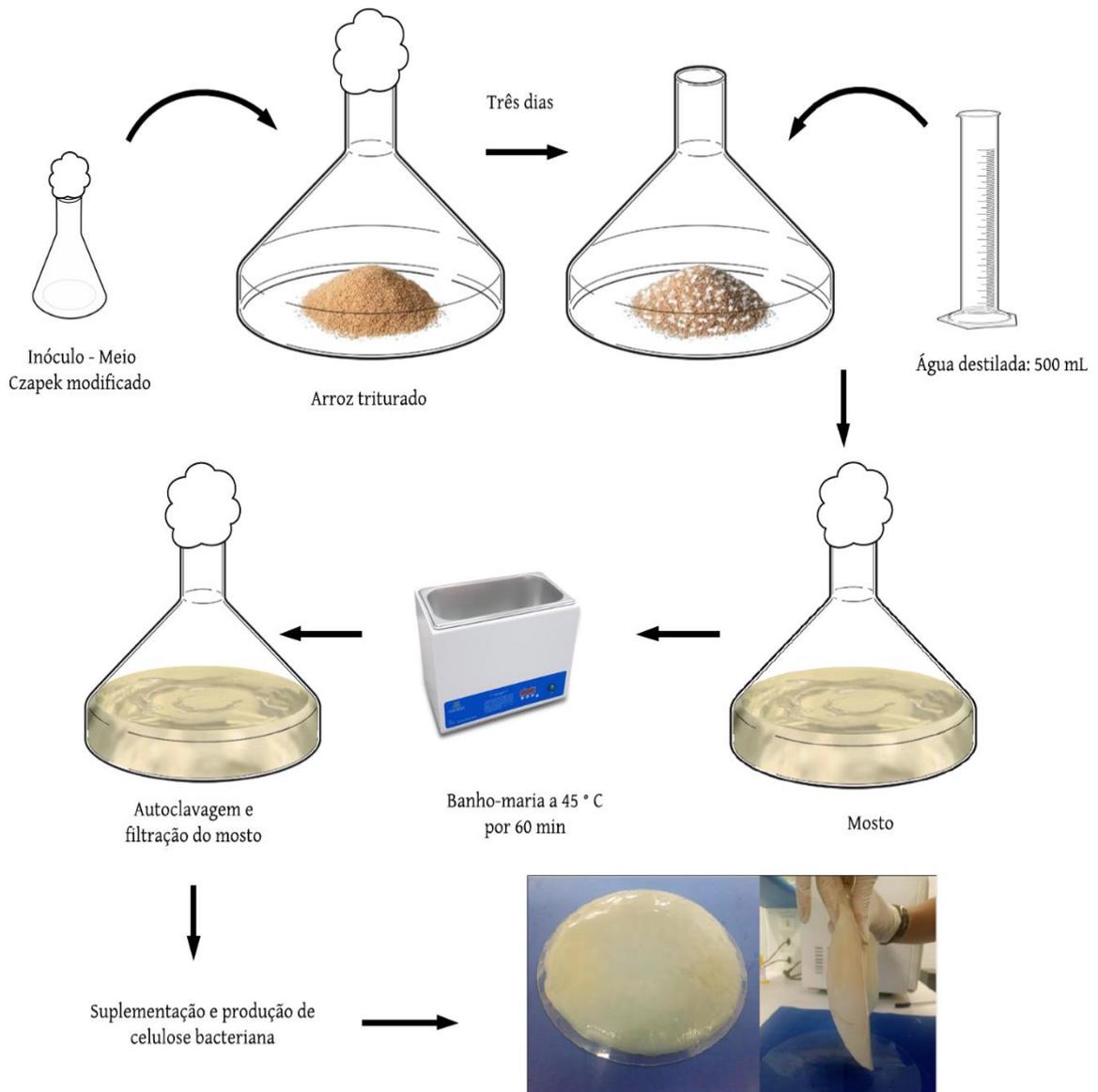
5,1 g / L), ácido cítrico ($C_6H_8O_7$; 1,15 g / L) e água. O meio sólido de conservação da bactéria *Komagataeibacter rhaeticus* teve a mesma composição com a adição de ágar (18 g / L).

4.1.4 Hidrólise do Amido

Para a produção dos meios contendo glicose através da hidrólise do amido (Figura 15), foram preparados dois inóculos de 50 mL, ambos contendo o meio Czapek-Dox (CZ) modificado com flocos de milho ou arroz como fonte de carbono. O meio CZ foi formulado com a seguinte composição: 3,0 g/L de $NaNO_3$, 0,01 g/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g/L de KCl , 1,0 g/L de K_2HPO_4 , 0,5 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 120,0 g/L de flocos de milho moídos ou arroz e água destilada. Os dois meios CZ modificados foram autoclavados por 20 minutos a $121^\circ C$ e 1 atm. O fungo na concentração de $1,8 \times 10^6$ esporos/mL foi então inoculado e incubado por 72 horas a $30^\circ C$ para obtenção do inóculo.

Após o tempo de crescimento, cada inóculo foi adicionado a um frasco Fernbach de 1 L contendo 60 g de flocos de milho ou arroz previamente autoclavados. Após 72 horas de fermentação a $30^\circ C$, 500 mL de água destilada foram adicionados a cada sistema de fermentação. Os sistemas foram então aquecidos a $45^\circ C$ em banho-maria por 60 minutos para otimizar o processo de hidrólise do amido. O amido sacarificado foi autoclavado a $121^\circ C$ por 20 min para esterilização e desativação das enzimas. Em seguida, os mostos foram filtrados e utilizados no preparo dos meios de cultura para a produção da celulose bacteriana.

Figura 15 - Diagrama de produção do meio hidrolisado para produção de celulose bacteriana.



Fonte: A autora (2021).

4.1.5 Produção de Celulose Bacteriana

Os meios alternativos hidrolisados foram suplementados com Na_2HPO_4 (2,7 g/L) e glicose até a concentração de 20 g/L, se necessário, obtendo assim os meios de produção de celulose bacteriana. Por fim, os meios foram esterilizados em autoclave vertical por 20 minutos a 121 ° C e 1 atm.

Para a preparação dos inóculos, 40 mL (10% v / v), foram utilizados 0,6 g/L de células microbianas (*Komagataeibacter rhaeticus*), e, após adição das mesmas, os

meios foram incubados por três dias a 30 ° C. Ao final desse período, o inóculo foi transferido para cada um dos frascos Roux contendo 400 mL do meio de produção e incubado por 30 dias a 30 ° C.

Para fins de comparação, 400 mL do meio líquido HS (controle) foram usados para a cultura de CB padrão. O meio de controle (10% (v / v) de inóculo) foi incubado por 30 dias a 30 ° C. Ao final do tempo de crescimento, a película foi lavada com água destilada. O método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foi usado para identificar a concentração de glicose no meio de arroz e de flocos de milho (MILLER 1959).

4.1.6 Purificação e Secagem

As películas de CB foram lavadas com água destilada e purificadas com solução 0,1 M de NaOH a 80 ° C em banho-maria por 20 minutos, a fim de eliminar resíduos de meio de cultura e células bacterianas retidas. As películas foram lavadas em água destilada até o pH neutro ser alcançado. Por fim, as películas de CB hidratadas foram colocadas em placa antiaderente, secas em freezer a -2 ° C por 72 horas e pesadas. Para estabilização da umidade, os polímeros foram postos em dessecador para perda máxima de água e acompanhamento da massa por pesagem para possibilitar análise de rendimento (Equação 1) entre os meios estudados.

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{Massa seca de CB (g)}}{\text{Meio de cultura (L)}} \quad (\text{Equação 1})$$

4.1.7 Caracterização dos Biopolímeros

4.1.7.1 Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os biopolímeros secos foram montados em um suporte e analisados no espectrômetro Shimadzu IR Tracer-100. O espectro foi obtido na faixa de comprimento de onda de 400 a 4000 cm⁻¹ para caracterizar a estrutura química da biomembrana por meio da identificação de grupos funcionais.

4.1.7.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

As leituras foram realizadas usando um analisador térmico simultâneo (STA 5000, PerkinElmer). Cada amostra foi analisada na faixa de temperatura de 30 a 600 ° C, com uma taxa de aquecimento de 10 ° C / min.

4.1.7.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os biopolímeros foram montados em stubs de cobre usando fita adesiva dupla condutora de carbono e revestidas com uma camada de ouro por 30 segundos (SC-701 Quick Coater, Japão). As microfotografias do MEV foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (TESCAN, MIRA 3, República Tcheca) operando a 10 kV em temperatura ambiente. A qualidade nanométrica das fibras foi determinada a partir do software livre Image J. A escala do software foi calibrada usando a barra de escalas das micrografias presentes nas imagens de MEV.

4.1.7.4 Difractometria de Raios X (DRX)

Todos os biopolímeros foram analisados em difratômetro (Rigaku) com radiação Cu K α . O índice de cristalinidade foi determinado usando a equação 2 de Segal dada a seguir:

$$CI = ((I_{002} - I_{am})/I_{002}) \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Em que *CI* expressa o grau relativo de cristalinidade, I_{002} é a intensidade máxima (em unidades arbitrárias) da difração de rede 002 e I_{am} é a intensidade da parte amorfa nas mesmas unidades a $2\theta = 18^\circ$.

4.1.8 Análise Estatística

Os dados obtidos nos experimentos, principalmente aqueles relacionados aos rendimentos, foram analisados por meio de técnicas de estatística descritiva e análise de variância para comparar a produção de celulose bacteriana a partir dos hidrolisados e em relação ao meio controle HS. Todos os experimentos relativos à produção de celulose foram realizados em triplicata. Toda a análise dos dados foi realizada no Microsoft Excel ®.

4.2 ETAPA 2: PRODUÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA UTILIZANDO MEIO SALINO E DIFERENTES FONTES DE CARBONO

O foco principal para esta etapa foi a produção da celulose bacteriana utilizando uma solução salina e diferentes fontes de carbono: Glicose, Glicerol, Sacarose, Manitol, Extrato de Levedura, Peptona e Frutose; em seguida, avaliou-se a produtividade e rendimento dos biopolímeros.

4.2.1 O Microrganismo

A bactéria *Glucanoacetobacter hansenii*, UCP1619, depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) foi utilizada como produtora da celulose bacteriana para esta etapa.

4.2.2 Preparação dos Meios de Cultura

Para comparar a produção de CB e obter melhores rendimentos, foram preparados 7 meios de cultura, em triplicata, com diferentes fontes de carbono (Extrato de Levedura, Frutose, Glicerol, Glicose, Manitol, Peptona ou Sacarose). O meio proposto (SOUZA *et al.*, 2020) possui a seguinte composição: Di-hidrogenofosfato de amônio (3,0 g/L), Fosfato dipotássico (1,0 g/L), Sulfato de magnésio hepta-hidratado (0,5 g/L), Cloreto de cálcio di-hidratado (1,5 g/L), Sulfato de ferro II (0,2 g/L), fonte de carbono: manitol, extrato de levedura, glicerol, sacarose, glicose, frutose ou peptona (30,0 g/L) e etanol (1,0 % v/v). Após o preparo de 1400 ml do meio composição salina, 50 ml foi distribuído em cada Erlenmeyer, totalizando 21 reatores de 125 ml de capacidade. O restante do volume, 350 ml, foi destinado ao inóculo com respectiva fonte de carbono. Para cada pré-inóculo foram transferidas três alçadas da cultura previamente crescida em meio sólido (item 4.2.3) e, incubados por 5 dias a 30 ° C para obtenção do inóculo. Após esse tempo, foi transferido 10% (v/v) do inóculo para cada um dos 3 Erlenmeyer de correspondente fonte de carbono. Por fim, os reatores tiveram tempo de crescimento das CB de 30 dias a 30 ° C.

4.2.3 Meio de Conservação e Manutenção

O meio de cultura Hestrin-Schramm (HS) utilizado para a conservação e controle da bactéria foi preparado com a seguinte composição: glicose ($C_6H_{12}O_6$; 20 g / L), peptona (5 g / L), extrato de levedura (5 g / L), fosfato dissódico ($Na_2HPO_4 \cdot H_2O$; 5,1 g / L), ácido cítrico ($C_6H_8O_7$; 1,15 g / L), ágar-ágar (18 g / L) e água.

4.2.4 Purificação e Secagem

As películas de CB foram lavadas com água destilada e esterilizadas em autoclave vertical por 15 minutos a $121^\circ C$ e 1 atm, a fim de eliminar resíduos de meio de cultura e matar qualquer célula bacteriana retida. Após a autoclavação, as películas foram lavadas em água destilada até o pH neutro ser alcançado, e, por fim, colocadas em placas antiaderentes e secas em freezer a $-2^\circ C$ e dispostas em dessecador até o peso constante.

4.2.5 Caracterização dos Biopolímeros

As películas secas foram caracterizadas de acordo com o item 4.1.7.

4.3 ETAPA 3: PROTOTIPAGEM DE EMBALAGEM PARA ALIMENTOS DO TIPO PAPEL UTILIZANDO CELULOSE BACTERIANA

Nesta etapa, um papel utilizando CB foi desenvolvido e caracterizado; em seguida a prototipagem de uma embalagem sustentável.

4.3.1 Produção do Papel de Celulose Bacteriana

Utilizando um frasco Roux com capacidade para 2 L, preparou-se 400 mL de meio salino e fonte de carbono (Sacarose - melhor rendimento entre as CB estudadas na etapa anterior), dos quais 10% (v/v) corresponderam ao inóculo. O meio foi esterilizado em autoclave vertical Primatec (modelo CS) por 20 minutos a $121^\circ C$ em 1 atm. Três seções da cultura (0,6 g/L) previamente cultivadas em meio HS ágar foram transferidas para o pré-inóculo. O pré-inóculo foi incubado por 5 dias a $30^\circ C$. Após esse período, o inóculo foi transferido para o meio de fermentação e incubado por 30 dias a $30^\circ C$. Após a fermentação, a membrana BC foi lavada com água destilada e imersa em água para esterilização em autoclave.

Em um liquidificador, 96,0 g da CB produzida (úmida) foram trituradas juntamente com 100 mL de água destilada por 2 minutos até obter uma pasta. Em um Becker foram adicionados 1,0 g de CaCO_3 e 3,0 g de resina, Poli(acetato de vinila), à massa úmida de CB (100 mL), que foram misturados manualmente. Em uma placa de Petri (d = 14,0 cm), a mistura foi distribuída e levada à estufa, a 50 ° C, por 48 horas até secar.

4.3.2 Caracterização do Papel de Celulose Bacteriana

Os filmes de papel produzidos foram caracterizados de acordo com o item 4.1.7, bem como, através da análise de Microscopia Óptica (MO) para obter detalhes morfológicos da superfície dos filmes, utilizando um microscópio LEICA DM750. A visualização foi feita com lentes objetivas de aumento de 20x.

Para fins comparativos, uma amostra de papel sulfite tipo A4 foi também caracterizada.

4.3.3 Prototipagem da embalagem tipo sachê

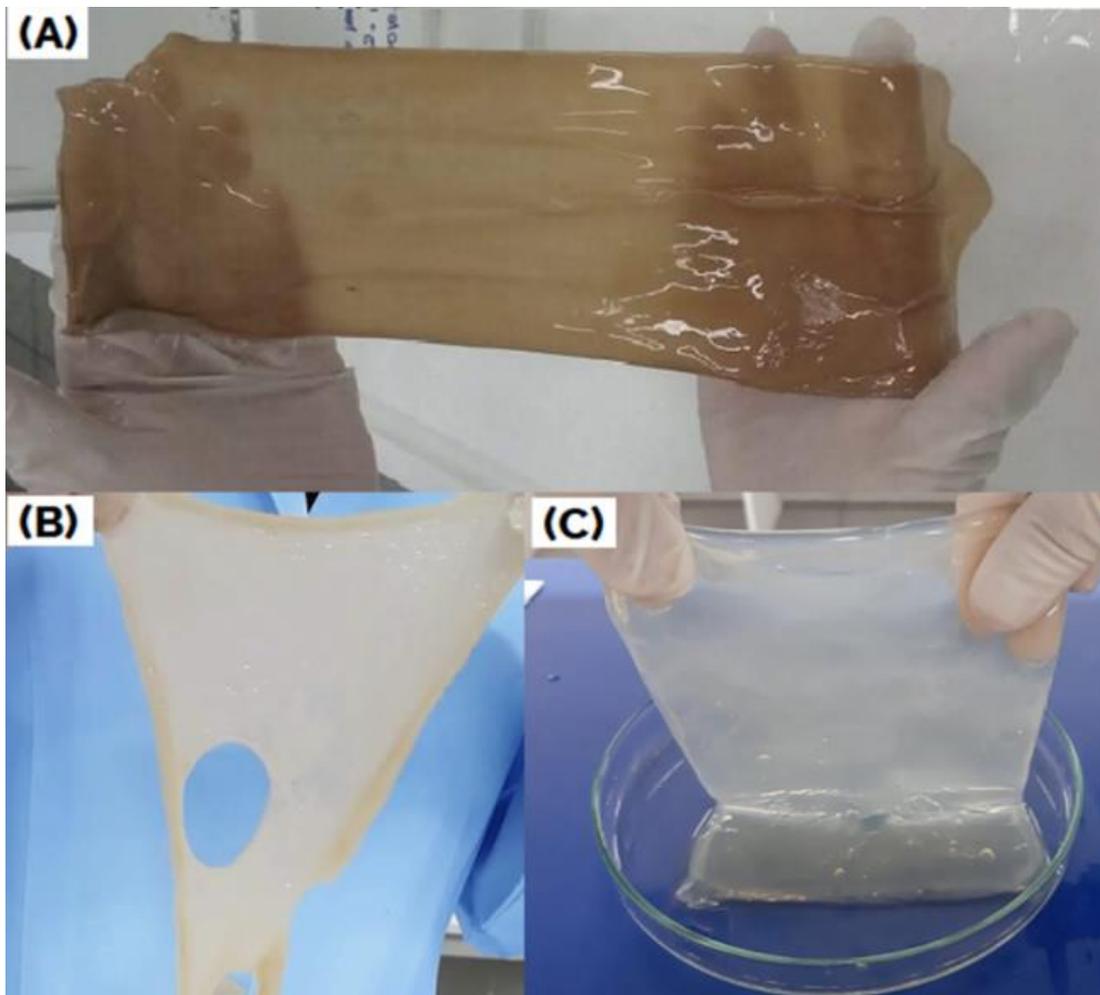
Para realização de alguns testes de impressão e aplicabilidade do Papel de CB, um protótipo de uma embalagem tipo sachê para açúcar foi desenvolvido. Primeiramente foi testada a aderência da tinta de impressão (HP LaserJet P1102w) ao papel de CB. Por fim, o papel de CB foi então moldado e selado com cola e também à quente (simulando as condições de selagem industrial).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ETAPA 1: PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA UTILIZANDO AMIDO

Os biofilmes produzidos, Figura 16, característicos de celulose bacteriana na forma de gel, apresentaram alta retenção de água em sua estrutura porosa. A Figura 16-A mostra o biopolímero produzido em meio HS antes da secagem. Com a CB produzida a partir do meio hidrolisado de milho (Figura 16-B), parte do polímero não se formou como um filme homogêneo. Isso pode ser explicado pelo excesso de amido no meio de cultura, dificultando a polimerização e homogeneidade do biofilme. Na Figura 16-C é possível observar que o aspecto morfológico do biofilme produzido em meio hidrolisado de arroz apresentou formação polimérica homogênea em toda a sua superfície.

Figura 16 - Filmes CB produzidos em meio HS (A), milho (B) e arroz (C).



Fonte: A autora (2021).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, um satisfatório rendimento de CB ($2,80 \pm 0,43\text{g/L}$) foi obtido com o meio contendo arroz hidrolisado como substrato. O arroz hidrolisado além de fornecer fonte básica de carbono, por meio da glicose disponibilizada, enriquece o meio com nutrientes com outras fontes nutricionais como: proteínas, cálcio, fósforo, ferro e vitaminas do complexo B (RATHNA, 2019).

Tabela 6 - Massa e rendimento de filmes de CB desidratados, produzidos em meio alternativo e padrão HS de acordo com a concentração de glicose produzida na hidrólise.

Meio de cultura	Glicose obtida na hidrólise (g/L)	Suplementação (g/L)		CB massa (g)	Rendimento (g/L)	p-values
		C ₆ H ₁₂ O ₆	Na ₂ HPO ₄			
(1) Arroz	27,60 ± 4,51	0	2,70	1,12 ± 0,17	2,80 ± 0,43	$p_{1-2} = 0,001484$
(2) Milho	6,30 ± 1,02	12,87	2,70	0,28 ± 0,01	0,70 ± 0,04	$p_{1-3} = 0,000374$
(3) Meio HS	30,00*	-	-	2,22 ± 0,20	5,83 ± 0,51	$p_{2-3} = 0,000228$

*Meio HS controle; Fonte: A autora (2021).

A hidrólise incompleta do amido presente nos flocos de milho resultou em apenas 26% da glicose obtida com o uso do meio de arroz hidrolisado como fonte de carbono. Esse resultado pode estar associado à morfologia e tamanho dos grânulos do amido presente nos flocos de milho. Como nutrientes importantes são encontrados dentro do floco de milho (LIMA *et al.*, 2017), o método empregado não foi suficiente para extrair esses nutrientes e hidrolisar, de forma eficiente, os polissacarídeos para serem utilizados pelos microrganismos.

Uma comparação da produção de biopolímeros revela a influência do amido no processo. Devido ao excesso de amido remanescente no meio de milho hidrolisado, e, à dificuldade de filtração, parte do amido permaneceu na composição do meio, levando a uma menor produção de CB mesmo com a suplementação de glicose.

Considerando o rendimento dos biopolímeros, a alternativa de produção de baixo custo envolvendo a fermentação do arroz obteve uma eficiência em torno de 50%, quando comparada ao meio controle HS (rendimento de CB $5,83 \pm 0,51 \text{ g/L}$). Observa-se também, analisando os *p-valores*, que as médias de produção de celulose foram estatisticamente diferentes entre si a um nível de confiança de 95%.

Na literatura, a produção média de CB usando o meio de cultura padrão HS é de 3,26 g/L ao final de 14 dias de cultura (SALARI *et al.*, 2019; HESTRIN & SCHRAMM, 1954).

Com base nos resultados da produção, alguns fatores são decisivos para a produção da CB. Durante a hidrólise do arroz pelo fungo, várias substâncias são produzidas a partir de seu metabolismo, como sorbitol, glicerol e xilitol, além de aminoácidos que surgem das proteases sintetizadas por *A. oryzae* (LEE *et al.*, 2014). Esses álcoois, bem como os aminoácidos podem favorecer a fermentação e produção da CB. Portanto, é possível que as bactérias do meio contendo arroz tenham mais nutrientes para a síntese da CB (DUTTA *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2019).

Em suas pesquisas, Cavka *et al.* (2013) produziram CB a partir de hidrolisados residuais de fibras, que são resíduos provenientes de fábricas de celulose que consistem principalmente de celulose e hemicelulose. A hidrólise foi realizada com o fungo *Trichoderma reesei* e a CB foi produzida a partir do hidrolisado resultante utilizando o microrganismo *K. xylinus*. Ao final do estudo, esses autores obtiveram rendimentos de até 11 g/L após sete dias de cultivo.

Também é possível produzir hidrolisados de celulose vegetal a partir de cascas de frutas, como a casca de durião, fruta típica da Ásia, por meio da hidrólise com ácidos minerais. A casca do durião foi hidrolisada com ácido sulfúrico diluído e o produto utilizado como meio de cultura para crescimento de CB (utilizando *K. xylinus*), atingindo rendimento máximo de 2,67 g/L após oito dias de cultivo (LUO *et al.*, 2017).

Outro estudo utilizou a casca de laranja como matéria-prima, na qual duas enzimas (celulase e pectinase) foram utilizadas para hidrólise, obtendo-se filmes de CB com rendimento de 3,16 g/L após oito dias em meio aquoso, utilizando *K. xylinus* como microrganismo produtor (KUO *et al.*, 2017). Em um estudo semelhante, cascas de citros (limão, tangerina, toranja e laranja) foram utilizadas para a obtenção de hidrolisados para a produção de CB, resultando em rendimentos que variaram de 2,06 a 3,92 g de CB por grama de casca após 21 dias de cultivo utilizando o microrganismo *K. hansenii* (GÜZEL & AKPINAR *et al.*, 2018). Assim, há uma boa equivalência de rendimentos entre os hidrolisados produzidos no presente estudo com aqueles descritos na literatura nos últimos anos.

Uzyol e Saçan (2016) utilizam glicose a partir da hidrólise do amido presente em algas marinhas. O processo empregou enzimas comerciais (alfa-amilase) e

hidrólise ácida. Os métodos enzimáticos e ácidos foram utilizados para comparar a eficiência em termos de produção de glicose. No método enzimático, a alfa-amilase (Liquozyme SC 4X) e glucoamilase (Spirizyme Excel) foram utilizadas. O método ácido foi aplicado usando H₂SO₄. Os resultados mostraram que o hidrolisado de algas continha grandes quantidades de glicose, sendo a hidrólise ácida mais eficiente. Com relação ao rendimento de CB a partir da glicose hidrolisada, a melhor produção ocorreu após 14 dias de incubação, obtendo um rendimento máximo de 1,104 g / L.

Outros pesquisadores procuraram otimizar a produção de CB usando amido de arroz orgânico de baixa qualidade (jasmim vermelho, arroz homnil, arroz *riceburry*, arroz jasmim integral e arroz jasmim). O estudo mostrou que o pó de arroz foi hidrolisado com alfa-amilases e glucoamilase, ambas de origem comercial, para converter completamente o amido em açúcar. Esta pesquisa destacou que arroz orgânico de baixa qualidade possui enorme potencial para ser usado como um substrato para a produção de celulose por *Komagataeibacter nataicola* (PHOTPHISUTTHIPHONG & VATANYOOPAISARN, 2020).

5.1.1 Caracterização dos Filmes CB Produzidos Com Amido

5.1.1.1 Análise Termogravimétrica (TGA)

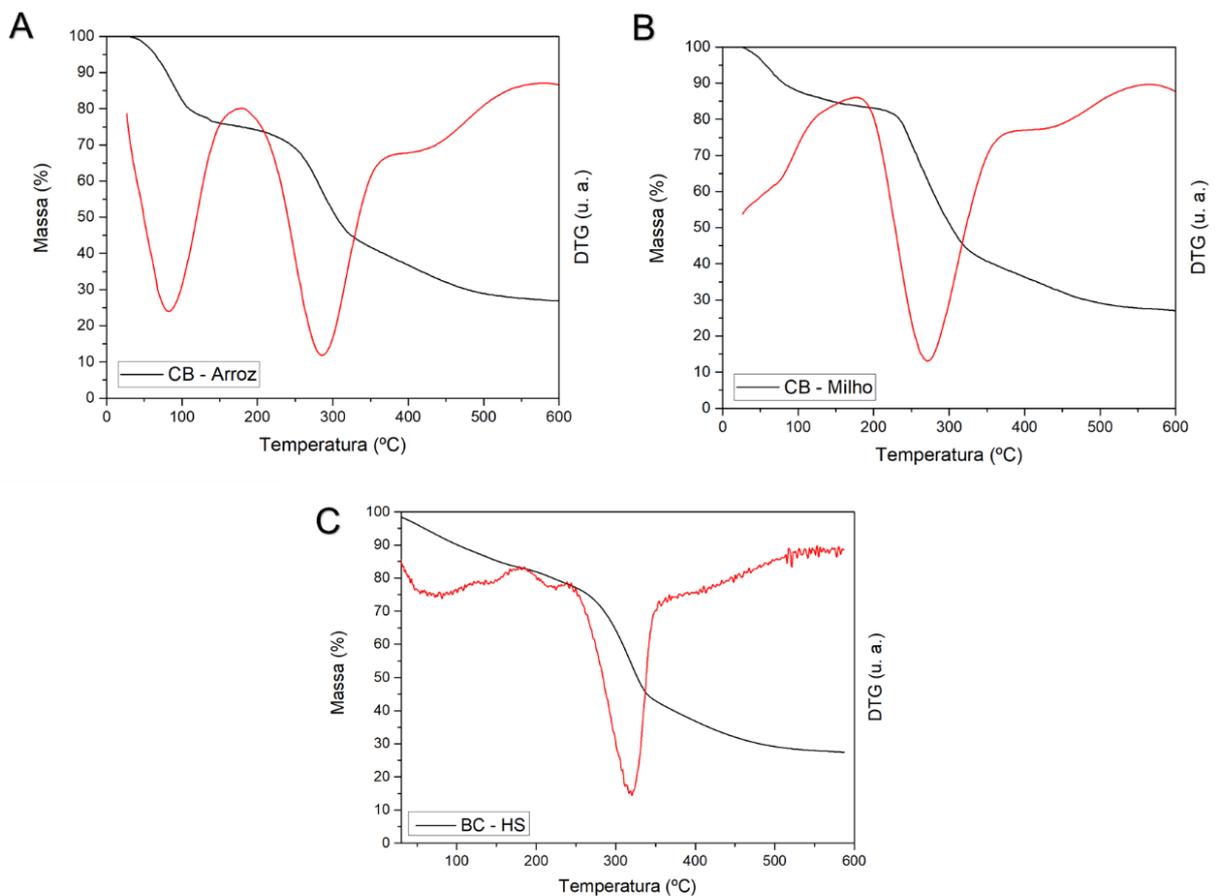
A Figura 17 mostra as curvas da análise TGA / DTG da CB produzida a partir do meio hidrolisado de arroz (Figura 17a), hidrolisado de amido de milho (Figura 17b) e HS (Figura 17c). As amostras do meio com os hidrolisados de milho e arroz obtiveram resultados semelhantes, com dois estágios de decomposição durante as análises (Fig 17 a e b).

O biopolímero de CB produzido pelo meio HS apresentou dois estágios de degradação. A Figura 17 c demonstra uma leve perda de umidade (13 %) próximo a 100 ° C, devido à evaporação de uma pequena quantidade de água remanescente mesmo após o processo de secagem. Na faixa que vai de 280 ° C até 350 ° C ocorre uma perda de massa característica da decomposição térmica da celulose, pelos processos de despolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas, com posterior formação de resíduos carbonáceos, e acima de 350 ° C houve a degradação termo-oxidativa (PACHECO *et al.*, 2012; DE SALVI *et al.*, 2012; DE SALVI *et al.*, 2014).

De forma semelhante, na amostra de CB- Arroz ocorre a redução, de 18%, da massa em 100 ° C, que se refere à perda de água relacionada à desidratação da celulose. Essa diminuição continuou até a temperatura de 170 ° C, atingindo 25% da massa total. Para a CB produzida em hidrolisado de milho, a perda referente a desidratação foi de apenas 12%.

Na segunda degradação (em 230 a 440 ° C), tanto para o CB-arroz como para CB-milho, o decréscimo foi relacionado à degradação da celulose devido à desidratação, despolimerização e decomposição de unidades glicosídicas (DUTTA *et al.*, 2014), com apenas 33% da massa original remanescente em cada biofilme. Esse comportamento foi relatado para biopolímeros de CB analisados na literatura, com perdas de massa de 9 a 12% na fase inicial e 70% no segundo patamar de degradação (DE SALVI *et al.*, 2012; DE SALVI *et al.*, 2014; PACHECO *et al.*, 2017).

Figura 17 - Curvas TGA para filmes CB produzidos em meio HS (C), milho (B) e arroz (A).



Fonte: A autora (2021).

Em suas pesquisas, Cerrutti *et al.*, (2015) avaliaram a produção de nanocelulose bacteriana. Os biopolímeros foram produzidos pela bactéria *Gluconacetobacter xylinus* em condições estáticas usando extrato de bagaço de uva (resíduo mais abundante da indústria vinícola) como fonte de carbono e licor de maceração de milho (subproduto da moagem úmida do milho). Como principais resultados da segunda etapa de degradação, observou-se para a película com 5 dias de crescimento uma temperatura inicial de degradação de 304,5 ° C e uma temperatura máxima 349 ° C. Já para a membrana de 21 dias, essa mesma degradação começou em 314,0 ° C e obteve máxima de 350,0 ° C.

5.1.1.2 Difratomia de Raios-X (DRX)

Na Figura 18 estão apresentados os difratogramas para os filmes CB produzidos em meio de milho, arroz e HS. Para o filme padrão produzido em meio HS, pode-se observar que a membrana apresentou difratograma característico da celulose bacteriana com picos em 14,86°, 17,22° e 23,06°, os quais são normalmente atribuídos à distância existente entre os planos cristalográficos típicos das fases I α e I β da estrutura semicristalina da CB (VAZQUEZ *et al.*, 2013).

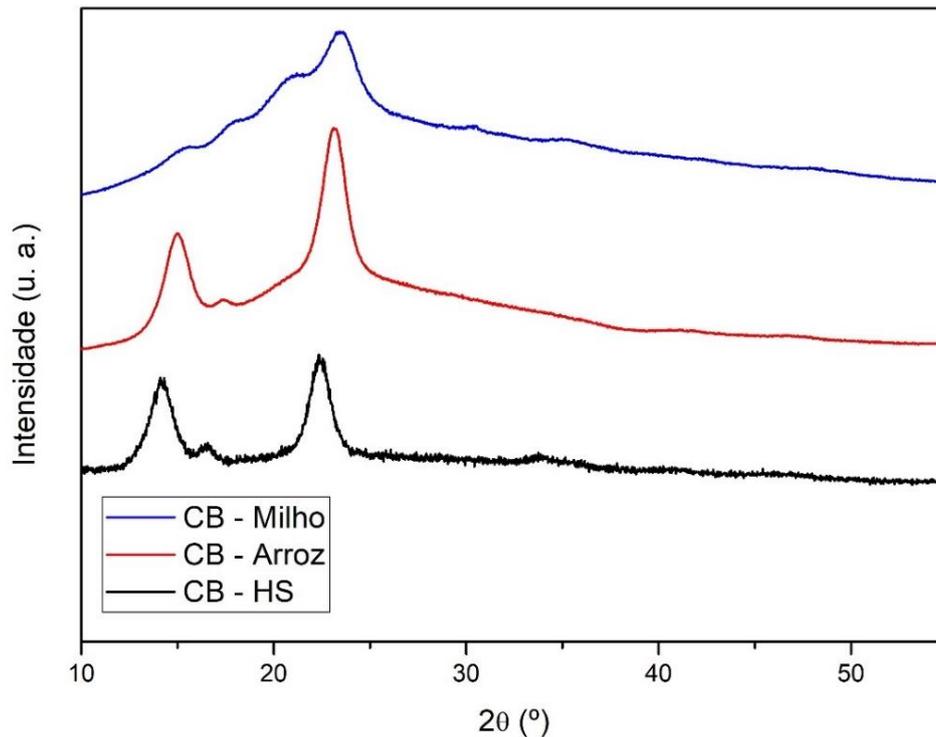
Para as amostras produzidas no meio arroz, os três picos característicos de CB em 2 θ são indicados no gráfico com valores de 15,06°, 17,28° e 23, 20°. Na literatura, Huang *et al.*, 2014 obtiveram na análise DRX, picos em ângulos 2 θ de 14,6, 16,8 e 22,8°, para amostras de CB obtidas a partir do hidrolisado ácido de sabugo de milho.

As amostras produzidas no meio de milho, entretanto, apresentam um diagrama diferente do esperado, com picos em 15,52°, 17,92°, 21,28° e 23,34°. Essa distinção se deve à presença de amido no meio de cultura e, conseqüentemente, à estrutura do polímero produzido. Assim, os picos de baixa intensidade (15,52°, 17,92°, 21,28°) expressam a presença de amido na estrutura polimérica durante a análise (Figura 18).

Os picos das amostras obtidas no meio de milho expressam comportamentos semelhantes aos encontrados na literatura, segundo os quais os picos encontrados a 15°, 17°, 18° e 23° são característicos de amostras de amido de milho nativo, o que indica a aderência do amido presente no meio de cultura na estrutura do biofilme. Os picos para as amostras obtidas utilizando meio hidrolisado de arroz são característicos dos biofilmes obtidos por outros métodos (JOUPIILA & ROOS, 1997;

PACHECO *et al.*, 2012; DE SALVI *et al.*, 2012), indicando picos de CB, que são destacados pelos valores de aproximadamente 15°, 17° e 22°. Assim, é possível confirmar a composição do filme produzido a partir do hidrolisado de arroz.

Figura 18 - Difratomogramas para filmes CB produzidos em meio de milho, arroz e HS.



Fonte: A autora (2021).

O grau de cristalinidade dos biopolímeros foi calculado pela Equação 2. A celulose produzida usando meio HS obteve 79,4% de cristalinidade. Para os meios alternativos, o resultado foi de 55% para o CB produzido nos meios de arroz e milho, indicando baixa cristalinidade em relação aos valores comumente obtidos para o CB, que variam de 80% a 90%. Os diferentes graus de cristalinidade podem estar associados a substâncias do meio de cultura que afetam a organização dos cristais. Essas substâncias podem estar presentes em resíduos agroindustriais e carboidratos (PACHECO *et al.*, 2017; CASTRO *et al.*, 2011).

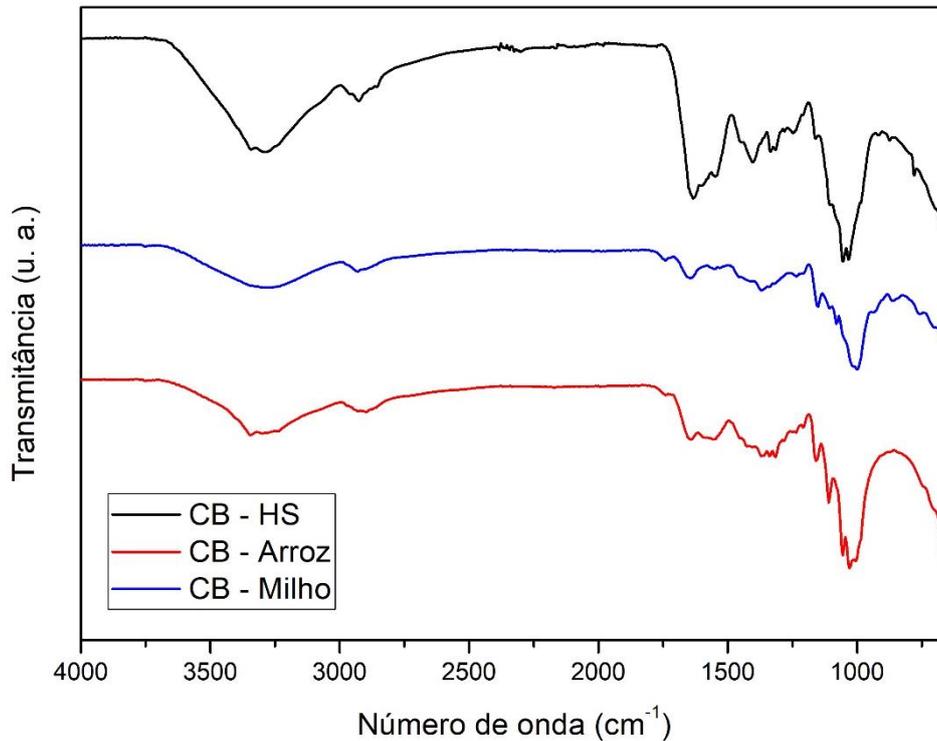
A baixa cristalinidade obtida neste experimento é próxima aos 61,8% para a CB produzida por Salari *et al.*, (2019) com soro de queijo. Goelzer *et al.* (2009) avaliaram a produção e caracterização de nanoesferas de celulose bacteriana a partir de cascas de arroz hidrolisadas. Em seu estudo, as CB foram produzidas com glicose como substrato: BC-GS (CB produzida por fermentação estática); usando casca de arroz/glicose como substrato denominado BC-RBS (CB produzida por

fermentação estática) e (CB produzida por fermentação aerada) BC-RBA. Como principais resultados de DRX, os autores descreveram que o perfil DRX de BC-GS tem picos principais em $14,42^\circ$ e $22,68^\circ$, correspondente ao plano cristalográfico de (101) e (002), respectivamente, demonstrando uma forma cristalina típica de celulose I. Já para a amostra BC-RBS, o padrão de difração contém um pico em $16,82^\circ$ e outros dois em $14,18^\circ$ e $22,78^\circ$. Os autores avaliaram também a influência do substrato na cristalinidade, obtendo uma cristalinidade de 56% para BC-GS e 28% para BC-RBS, demonstrando que a rede de CB formada com casca de arroz como substrato é menos cristalina.

5.1.1.3 Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Através das análises de infravermelho, os grupos funcionais dos biopolímeros de CB foram confirmados em todos os meios de produção (HS, Arroz, milho). A Figura 19 apresenta os espectros correspondentes a essa análise e, o biopolímero produzido a partir do meio HS apresentou uma Banda forte e larga, na região próxima de 3300 cm^{-1} , resultante de associações poliméricas do estiramento do grupo Hidroxila (OH) presentes na estrutura cristalina da celulose, que estão relacionados às pontes de hidrogênio intra e intercadeias. O estiramento de CH de alcanos e estiramento assimétrico CH_2 em torno 2960 cm^{-1} . Os picos nos números de onda 1640 cm^{-1} e 1421 cm^{-1} indicaram os grupos carboxílico e carboxilato. O pico próximo a 1330 cm^{-1} foi atribuído à flexão no plano O-H, enquanto a região em torno 1255 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C-O, que indica a presença de região cristalina dentro da estrutura da CB. O pico na região 1036 cm^{-1} pode estar associado com a vibração de alongamento de éter C-O-C e C-O-H do anel de glicose, que é o monômero da polimerização (GHOZALI *et al.*, 2021).

Figura 19 - Espectros de FTIR para filmes de CB produzidos em meio HS, meio hidrolisado de arroz e meio hidrolisado de milho.



Fonte: A autora (2021).

Para melhor avaliar e complementar os espectros mostrados na Figura 19, a Tabela 7 contém dados relativos às bandas características de cada filme produzido a partir dos hidrolisados de milho e arroz.

Tabela 7 - Principais vibrações características de FTIR para filmes de CB produzidos a partir da hidrólise de amido de milho e arroz.

Posição da Banda (cm ⁻¹)	Características e grupo funcional responsável	Posição da banda encontrada para a celulose produzida (cm ⁻¹)	
		Arroz	Milho
3400-3200	Uma forte e larga banda surge como resultado de associações poliméricas de alongamento do grupo -OH	3345	3280
2960-2850	Alongamento -CH de alcanos e alongamento assimétrico de -CH ₂	2894	2930
1680-1620	CH ₂ -OH deformação	1640	1645
1430-1330	C-OH e CH deformação	1335	1370
1200-1000	C-O (-C-O-H) alongamento	1030	1000
1160-1146	(C-O-C) alongamento; CH deformação	1155	1150
700-400	-OH fora da deformação plana	505	465

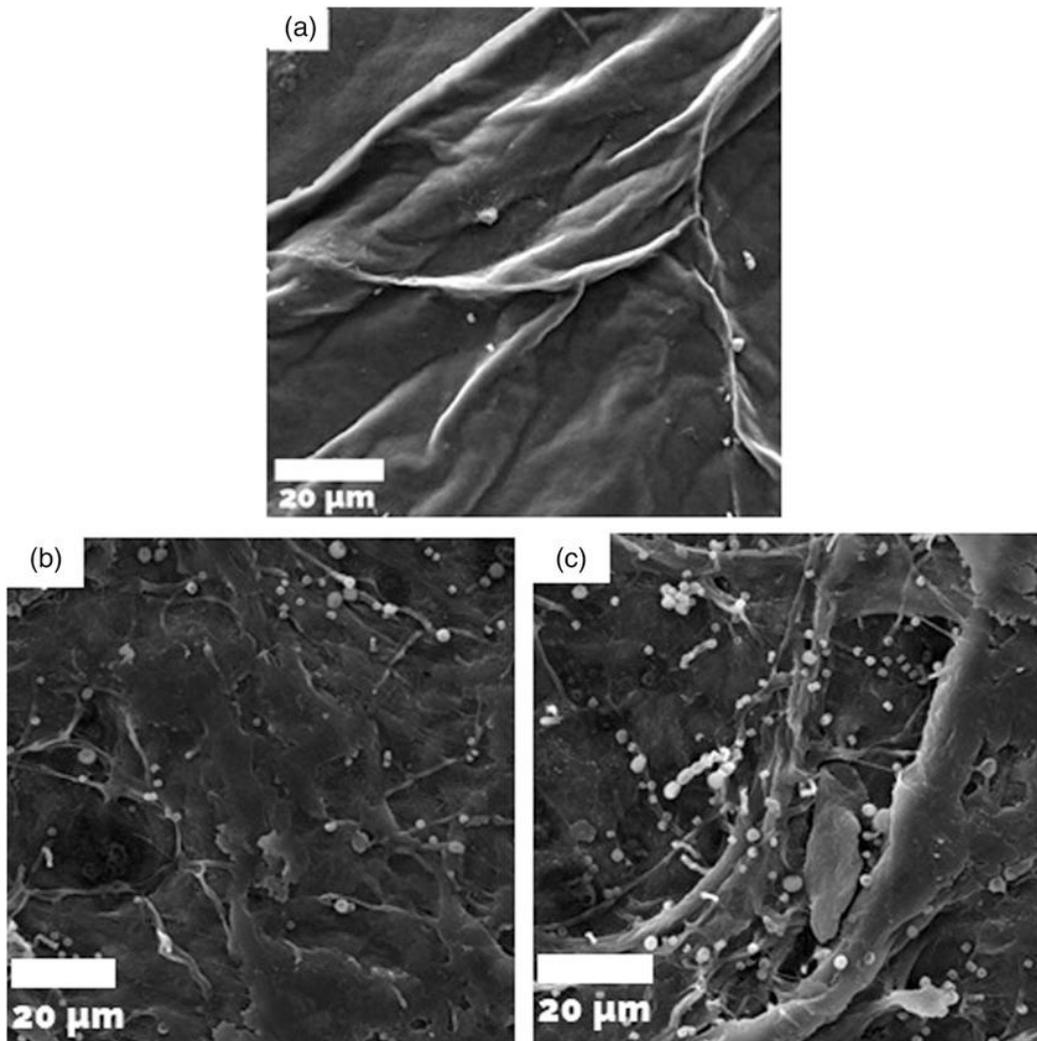
Fonte: GEA *et al.*, (2011); PECORARO *et al.*, adaptada (2007); SASKA *et al.*, (2012).

Em suma, as principais bandas observadas para os biopolímeros produzidos podem ser atribuídas a estiramento do grupo OH, estiramento CH de alcanos e estiramento assimétrico CH₂, bem como, a deformação C-OH e CH, sendo, portanto, características e grupos funcionais responsáveis por caracterizar a CB pura.

5.1.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias da superfície dos filmes de CB produzidos em HS, arroz hidrolisado e meio de milho hidrolisado nas condições estabelecidas no presente estudo são apresentadas na Figura 20. As imagens mostram a dispersão das fibras e a presença de possíveis grânulos de amido (indicado por setas) nas fibras de CB produzidas com o hidrolisado desses carboidratos.

Figura 20 - Micrografias de superfícies de películas de CB produzidas em meio HS (A), arroz hidrolisado (B) e milho hidrolisado (C).



Fonte: A autora (2021).

A estrutura morfológica da CB produzida é definida pelo arranjo aleatório de nanofibrilas não uniformemente distribuídas ao longo da trama no biofilme. Observou-se também, áreas de estruturas fibrilares mais densas, enquanto outras áreas apresentam fibras mais dispersas, tornando a estrutura mais porosa.

Saska *et al.* (2012) afirmam que essa estrutura é própria de processos de produção onde a retirada da água da estrutura 3D resulta na aproximação das nanofibras que seriam agregadas aleatoriamente por meio da formação de ligações de hidrogênio.

A presença de grânulos de amido na superfície da celulose produzida mostra que o processo de hidrólise deve ser otimizado, a fim de obter melhores rendimentos no que diz respeito à produção de glicose e, conseqüentemente, de CB.

Em seus experimentos, Cerrutti *et al.*, (2015) avaliaram a produção de nanocelulose bacteriana a partir de resíduos da indústria do vinho e licor de maceração de milho. Como principais resultados de MEV, a autora observou que a CB obtida em 5 dias era composta por uma rede de microfibrilas 3D altamente reticulada em forma de nanofibras de celulose. Nas micrografias obtidas pelos pesquisadores, observou-se também que alguns resíduos de meio de cultura ainda poderiam ser vistos presos às fibras. Já as películas obtidas após 21 dias pareciam muito mais compactas quando comparadas às CB obtidas após 5 dias, caracterizando microfibrilas densamente coaguladas e comprimidas.

Goelzer *et al.*, 2009 avaliaram a produção e caracterização de nanoesferas de celulose bacteriana a partir de cascas de arroz hidrolisadas. As CB biossintetizadas em meio de casca de arroz /glicose (fermentação estática) possuíam fibras interligadas em uma rede tridimensional reticulada que não podiam ser distinguidas com ampliação de 3000x. O compósito obtido em um reator aerado com casca de arroz gerou microesferas e nanoesferas que foram medidas por AFM. Esses grânulos aparentemente homogêneos com cerca de 900 nm de diâmetro foram encontrados em grande quantidade entre as fibras. Esse estudo, apesar de ter sido realizado em reator aerado, formou nanoesferas com características semelhantes ao realizado por esta tese. No entanto, os pesquisadores associam a formação das nanoesferas a agregados celulares (CB) causados, possivelmente, pela aeração.

5.2 ETAPA 2: PRODUÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA UTILIZANDO MEIO SALINO E DIFERENTES FONTES DE CARBONO

O meio de cultura salino desenvolvido possui enorme versatilidade podendo ser utilizado em testes bioquímicos, bem como na produção de biopolímeros de celulose bacteriana. A formulação utilizada para o crescimento da CB tem sua composição a base de sais, fonte de carbono e etanol. A Figura 21 mostra as imagens dos meios salinos e suas respectivas membranas de CB produzidas. Pode-se observar que a depender da fonte de carbono usada, o meio salino pode ter coloração turva e levemente leitosa após autoclavação na presença de fonte de carbono como: extrato de levedura e peptona. Por outro lado, a utilização da sacarose, por exemplo, como fonte de carbono, poderá gerar CB livres de pigmentos, diminuindo significativamente a coloração indesejada durante o processo de purificação e lavagens. Fator importante na sustentabilidade do processo.

Durante avaliação visual das películas produzidas, observou-se que as CB formadas em meio contendo sacarose, glicose e glicerol permitiram a formação de filmes mais espessos e uniformes (Figura 21). Nos meios contendo manitol, extrato de levedura e frutose, as películas formadas eram menos espessas e frágeis. No entanto, o meio contendo apenas peptona como fonte de carbono não proporcionou condição suficiente para formação da CB, e sim, apenas crescimento bacteriano que foi observado através da turvação do meio de cultura.

Figura 21 - Meios de cultura salino com diferentes fontes carbono e CB coletadas.



Fonte: A autora (2022).

Na Tabela 8 estão apresentados os rendimentos conforme a fonte de carbono utilizada para o crescimento do biofilme de CB. Os ensaios foram realizados em triplicata e a média das produções foi utilizada para o cálculo do rendimento em g/L. Ao final de 30 dias de incubação, o meio salino contendo sacarose obteve o melhor rendimento (5,7 g / L) quando comparado aos demais.

Tabela 8 - Rendimentos em grama por litro das produções de CB conforme a fonte de carbono utilizada.

Estudo das Fontes de Carbono						
Fonte de carbono	Ensaio I	Ensaio II	Ensaio III	Média	Rendimento g/L	Desvio
CB-Manitol	0,019	0,029	0,020	0,023	0,453	0,004
CB-Ext. de Levedura	0,051	0,044	0,036	0,044	0,873	0,006
CB-Glicerol	0,133	0,125	0,128	0,129	2,573	0,003
CB-Sacarose	0,303	0,277	0,278	0,286	5,720	0,012
CB-Glicose	0,237	0,240	0,246	0,241	4,820	0,004
CB-Frutose	0,055	0,054	0,056	0,055	1,100	0,001
CB-Peptona				*		

*Apenas crescimento microbiano sem formação de filme CB; Fonte: A autora (2021).

Na literatura, pesquisas como as de Mohammadkazemi *et al.*, 2015 utilizaram a *Gluconacetobacter xylinus* PTCC 1734 para fazer um estudo dos efeitos das fontes de carbono e meios de cultura na produção e propriedades estruturais da CB. Os meios utilizados pelos autores foram o Hestrin–Schramm, Yamanaka (composição: Glicose 50 g / L; extrato de levedura 5 g / L; (NH₄)₂SO₄ 5 g / L; KH₂PO₄ 3g / L; MgSO₄.7H₂O 0,05 g / L) e Zhou (composição: glicose 40 g / L; licor de maceração de milho 20 g / L; (NH₄)₂SO₄ 4 g / L; KH₂PO₄ 2 g / L; MgSO₄.7H₂O 0,4 g / L). Os autores também utilizaram cinco fontes de carbono diferentes: xarope de tâmaras, glicose, manitol, sacarose e sacarose de grau alimentício. E chegaram à conclusão que o manitol (rendimento: 5,5 g / L) e a sacarose (rendimento: 6,5 g / L), em meio Hestrin e Schramm, possuíam melhores rendimentos após 7 dias de incubação.

Molina-Ramírez *et al.*, (2017) avaliaram o efeito de diferentes fontes de carbono na produção e estrutura de nanocelulose bacteriana usando a cepa *Komagataeibacter Medellinensis*. Os rendimentos das CB, após 15 dias de fermentação, foram de 2,80, 0,38 e 1,68 g / L usando glicose, frutose e sacarose, respectivamente. Para os pesquisadores ocorreu uma clara inibição da frutose no crescimento celular. Uma possível explicação para esta observação é que o

microrganismo deve usar uma isomerase para converter frutose em glicose antes do início da polimerização. Além disso, os pesquisadores também acreditam que houve hidrólise ácida da sacarose causada pela adição de ácido cítrico ao meio e à alta temperatura durante o processo de esterilização; o que justificaria a segunda maior produção de CB.

Os estudos realizados por Mohammadkazemi e Molina-Ramírez oferecem meios de produção das CB em diferentes fontes de carbono e com rendimentos variados (0,38 a 6,5 g / L). Contudo, ambos os estudos utilizam como base para produções o meio Hestrin e Schramm, que tem parte de sua composição formada por extrato de levedura e peptona. Tais componentes são caros e são também fontes de carbono, além do açúcar que será adicionado como principal fonte de carbono.

Fazendo uma comparação entre o meio salino e um dos meios mais conhecidos, Hestrin e Schramm (composição (%m / v): glicose 2,0%, peptona 0,5%, extrato de levedura 0,5%, dissódio fosfato anidro 0,27% e ácido cítrico monohidratado 0,115%), tem-se um meio complexo (HS), portanto, não é possível saber com exatidão seu percentual de carbono. Pois, formulações que contêm substâncias como extrato de levedura e peptona em sua composição possuem porcentagens de carbono e nutrientes que não são contabilizadas na hora de dosar o percentual final de carbono do meio de cultura. Esse aspecto afeta a repetibilidade dos experimentos realizados, uma vez que cada formulação apresentar-se-á com características próprias (HESTRIN E SCHRAMM, 1954; LIBRETEXTS BIOLOGY, 2022).

No entanto, o meio salino, a depender da fonte de carbono, possui composição controlada e facilmente assimilável por microrganismos do gênero *Gluconacetobacter*, por conter micro e macronutrientes fundamentais ao crescimento e produção da CB. Essa composição pode ser também de suma importância para realização de testes bioquímicos, onde a fonte de carbono assimilada pela bactéria é única e controlada.

Outro fator relevante é com relação aos custos para produção da CB, o meio mais usado (Hestrin-Schramm HS) é caro e inviabiliza a produção em escala industrial. Para se ter uma ideia, a produção de uma única CB utilizando 50 mL de meio Hestrin-Schramm HS custa em média 0,47 reais, enquanto a mesma película, em meio salino, custa apenas 0,18 reais (SILVA, 2022).

Dessa maneira, muitos meios de cultura para produção de CB encontrados na literatura tem sua importância, pois, buscam produzir biopolímeros puros e de forma barata. Utilizando, muitas vezes, resíduos agroindustriais. Esses estudos agregam conhecimento e oferecem, para muitas regiões, a depender de suas necessidades, informações importantes sobre produção de CB.

Logo, o objeto de estudo desta tese oferece um estudo acerca de diversos meios, naturais (a partir do amido de arroz e milho) e sintéticos (sais e fonte de carbono comercial), para produção de CB, trazendo uma contribuição importante para pesquisas que visam otimizar e/ou baratear a produção de celulose bacteriana.

5.2.1 Caracterização de Filmes CB Produzidos em Meio Salino e Diferentes Fontes de Carbono

5.2.1.1 Análise Termogravimétrica (TGA)

A Figura 22 e Tabelas 9 e 10 mostram os principais resultados da análise TGA / DTG da CB produzida a partir do meio salino em diferentes fontes de carbono. As amostras CB dos meios com Glicerol (CB-Glicerol) e Sacarose (CB-Sacarose) obtiveram resultados próximos quanto à temperatura máxima de degradação, com dois ou três estágios de decomposição. Nessas amostras, a redução percentual da massa (até 100 ° C) foi de 3,10 e 2,68 para as CB-Glicerol e CB-Sacarose, respectivamente, correspondendo à perda de água por desidratação da celulose. Na faixa degradativa, CB- Glicerol, a perda de massa se inicia em 268 ° C e continua até a temperatura de degradação máxima, 306,7 ° C, com perda 24,4 % da massa total.

A CB- Sacarose apresentou um primeiro estágio de degradação em torno de 162,0 ° C, o que pode estar atrelado a oxidação da sacarose remanescente das fibras de CB. Um segundo estágio de degradação foi observado, com a perda de 34,0% com temperatura máxima de 300,7 ° C, relacionado à degradação da celulose devido à desidratação, despolimerização, decomposição de unidades glicosídicas e, por fim, a degradação termo-oxidativa, em que acontece a oxidação polimérica em condições estáveis de temperatura e fluxo de oxigênio (DUTTA *et al.*, 2014; MOHAMMADKAZEMI *et al.*, 2015; PADMANABHAN *et al.*, 2022).

As curvas TGA / DTG para CB-Glicose mostraram um resultado com dois estágios de decomposição. Nessa amostra, a redução percentual da massa até

100 ° C foi a menor comparada às demais, apenas 1,13%, correspondendo principalmente à perda de água combinadas às fibras de CB. A partir da faixa degradativa que começou em 198,2 ° C e continuou até a temperatura máxima de 284,5 ° C, houve perda de massa de 28,6%, relacionada à degradação termo-oxidativa, despolimerização e decomposição de unidades glicosídicas. Entre todos os biopolímeros avaliados a CB-Glicose foi a menos estável termicamente.

A partir da Figura 22 e Tabelas 9 e 10, pode-se observar a redução percentual (até 100 ° C) de 3,75% para CB- Extrato de levedura e 3,69% para CB-Manitol, relacionado à degradação da celulose devido à desidratação. O que corresponde a uma maior desidratação entre as celulosas estudadas.

Na faixa degradativa para CB- Extrato de levedura que começou em 259,1 ° C e continuou até uma temperatura máxima de 350,7 ° C, houve 34,2% de perda de massa. Nessa etapa ocorreu a desidratação, despolimerização, decomposição de unidades glicosídicas e degradação termo-oxidativa das fibras poliméricas. Para essa mesma amostra, observou-se dois pequenos patamares a mais de degradação (143,0 e 480,0 ° C) comparada às outras amostras (DUTTA *et al.*, 2014; MOHAMMADKAZEMI *et al.*, 2015; PADMANABHAN *et al.*, 2022). Tal fato, provavelmente está relacionado a complexidade da fonte de carbono utilizada, pois o extrato de levedura tem sua composição formada basicamente por uma mistura de aminoácidos e proteínas (LATEF *et al.*, 2019).

Analisando a principal faixa degradativa da CB- Manitol (Figura 22), houve uma perda percentual de massa de 36,3 % em uma temperatura máxima de degradação de 322,0 ° C, correspondendo à desidratação, despolimerização, decomposição de unidades glicosídicas e degradação termo-oxidativa. De forma geral, o que se observa para estes dois tipos de amostra é que as fontes de carbono, Extrato de levedura e Manitol, proporcionaram aos biopolímeros de CB uma maior estabilidade térmica comparada aos demais.

Em 2015, Mohammadkazemi *et al.* avaliaram a produção de CB utilizando diferentes fontes de carbono e meios de cultura. Como principais resultados, os pesquisadores observaram que o meio HS suplementado com manitol produziram CB com valores de temperatura superiores às demais (390 ° C).

As curvas TGA / DTG para CB-Frutose mostraram um resultado com dois estágios de decomposição. Nessa amostra, a redução percentual da massa até 100 ° C foi 3,46%, correspondendo principalmente à perda de água. A partir da faixa

degradativa que começou em 273,2 ° C e continuou até a temperatura máxima de 315,3 ° C, houve perda de massa de 32,7% relacionada à degradação termo-oxidativa, bem como despolimerização e decomposição de unidades glicosídicas.

Tureck *et al.*, (2021) avaliaram a obtenção e caracterização de celulose bacteriana sintetizada por *Komagataeibacter hansenii* a partir de fontes alternativas de nitrogênio e carbono. Em seus estudos a produção de CB utilizando licor de milho e frutose como fontes de nitrogênio e carbono obteve, a partir da análise de TGA, temperatura máxima de decomposição de 337 ° C.

Para Tureck a temperatura onde a taxa de degradação é máxima mostrou-se entre 318 ° C e 339 ° C, sendo que as mais estáveis termicamente foram CB manitol (339 ° C) > CB frutose (337 ° C) > CB Glicose (333 ° C) > CB sacarose (326 ° C) > CB Glicerol (318 ° C).

A temperatura máxima de decomposição é um critério de estabilidade térmica e tais comportamentos são afetados por alguns parâmetros, como estrutura molecular, cristalinidade e orientação das fibras. Contudo, alguns pesquisadores levam também em consideração a massa residual como critério para estabilidade térmica. Dessa forma, a CB-Glicerol que apresentou maior percentual de resíduo, 49%, é formada a partir de uma fonte de carbono relativamente estável ao calor em comparação às demais (BARUD *et al.*, 2007; PECORARO *et al.*, 2008; DE SALVI *et al.*, 2012; PACHECO *et al.*, 2012; QUAN *et al.*, 2016).

Portanto, estudar minimamente tais parâmetros irá contribuir, por exemplo, na formulação de meios de cultura a fim de se obter materiais com características e aplicações desejadas.

Tabela 9 - Resultados da perda de massa das CB até 100 ° C

Amostra	m_{inicial} (mg)	m_{final} (mg)	Perda (%)
CB-Manitol	2,36	2,27	3,69
CB-Extrato de Levedura	2,80	2,70	3,75
CB-Glicerol	2,32	2,25	3,10
CB-Sacarose	2,91	2,83	2,68
CB-Glicose	2,48	2,45	1,13
CB-Frutose	2,14	2,07	3,46

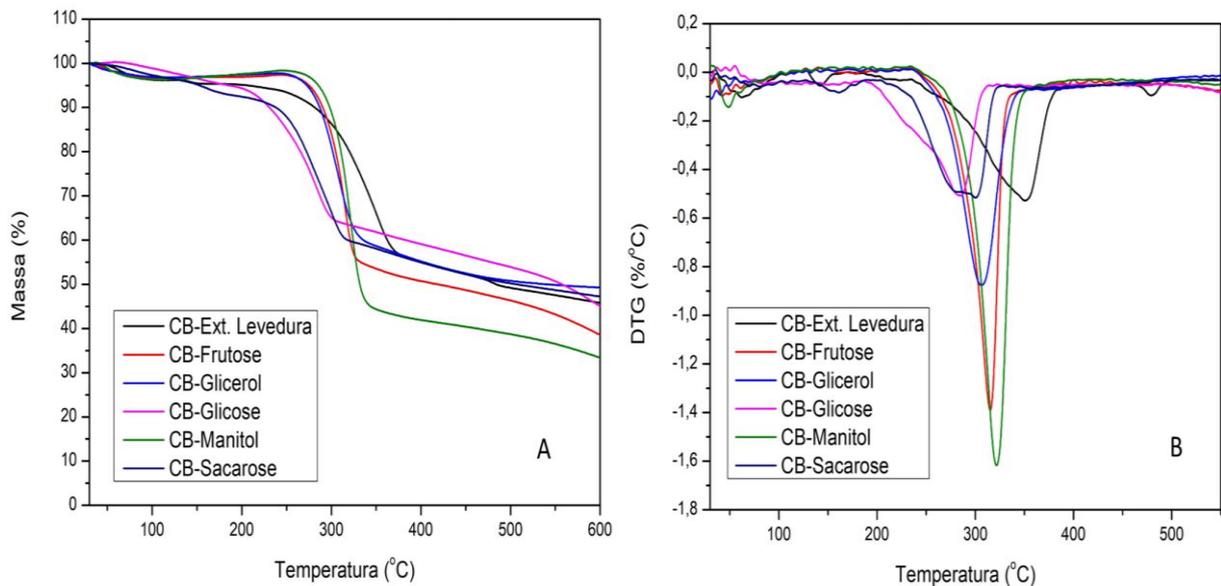
Fonte: A autora (2022).

Tabela 10 - Temperaturas iniciais, finais e máxima para o principal estágio de degradação das CB.

Amostra	Tonset (°C)	Toffset (°C)	Tmáx. (°C)	Resíduo (%)
CB-Manitol	283,3	344,3	322,0	33,4
CB-Extrato de Levedura	259,1	381,7	350,7	45,8
CB-Glicerol	268,0	340,2	306,7	49,3
CB-Sacarose	225,0	324,7	300,7	47,2
CB-Glicose	198,2	312,7	284,5	45,0
CB-Frutose	273,2	332,0	315,3	38,5

Fonte: A autora (2022).

Figura 22 - Curvas TGA / DTG para filmes CB produzidos em meio salino com diferentes fontes de carbono.



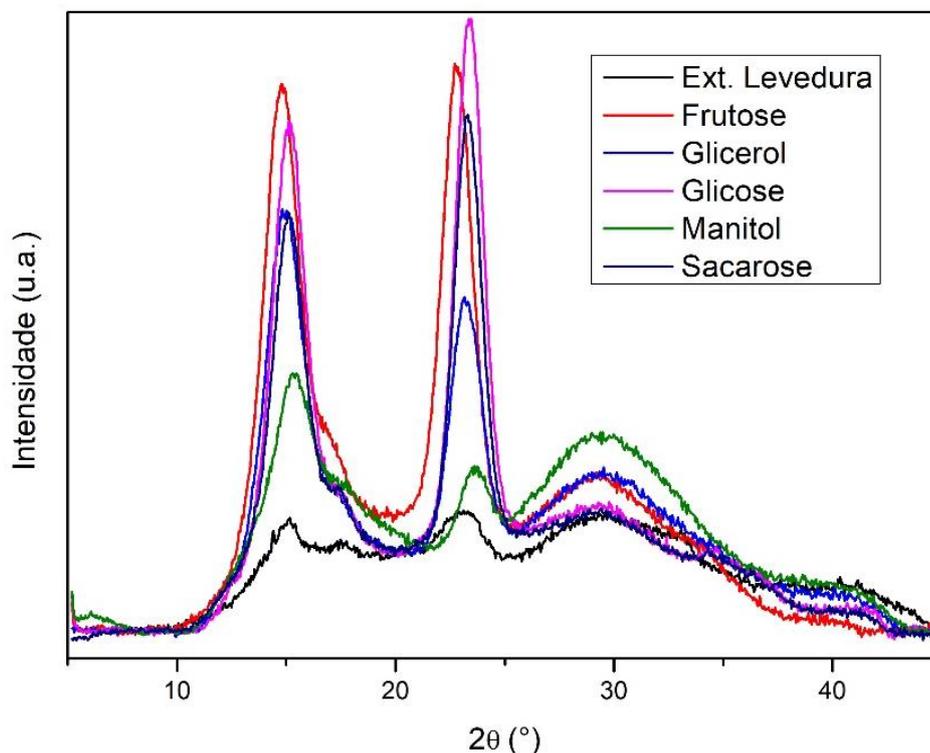
Fonte: A autora (2022).

5.2.1.2 Difractometria de Raios-X (DRX)

A Figura 23 mostra os difratogramas de raios X referentes às biomembranas estudadas. Pode-se observar que as membranas apresentaram picos característicos de celulose bacteriana que são os picos de difração 2θ em torno de $14,9^\circ$, $17,4^\circ$, $23,3^\circ$ e $29,5^\circ$, podendo corresponder aos planos cristalográficos 101, 010, 110 e 122 (PADMANABHAN *et al.*, 2022). Os difratogramas de raios-X para as amostras produzidas em meios com diferentes fontes de carbono mostraram uma estrutura semicristalina. No geral, esses dados sugerem que as amostras de CB possuem perfil típico da estrutura cristalina da celulose tipo I (YASUMURA *et al.*, 2012).

A celulose nativa I é sintetizada pela maioria das plantas e por bactérias acéticas em cultura estática. Panicker *et al.* (2017) revelaram que a celulose I compreende dois subalormorfos chamados celulose I α e I β , essas formas são alocadas para células unitárias triclinicas e monoclinicas, respectivamente (SASKA *et al.*, 2012; VAZQUEZ *et al.*, 2013; MOLINA-RAMÍREZ *et al.*, 2017; KAMAL e ALZUBAIDY, 2019). Os difratogramas da Figura 23 apresentam picos largos e como os biopolímeros foram produzidos a partir de fontes de carbono diferentes, percebe-se diferenças entre as intensidades e configurações desses picos (PADMANABHAN *et al.*, 2022).

Figura 23 - Difratogramas das CB obtidas nos diferentes meios de cultura.



Fonte: A autora (2022).

Os resultados apresentados no DRX foram utilizados para avaliar a fração cristalina dos biopolímeros produzidos a partir do método descrito por Segal *et al.* (1959). A Tabela 11 descreve a fração cristalina das membranas de CB produzidas com diferentes fontes de carbono em meio de cultura salino.

Tabela 11 - Fração cristalina das membranas de CB produzidas com diferentes fontes de carbono.

Fonte de Carbono	Fração cristalina (%)
Ext. Levedura	31
Frutose	66
Glicerol	59
Glicose	58
Manitol	45
Sacarose	44

Fonte: A autora (2022).

De acordo com os valores apresentados na Tabela 11, observa-se que a amostra com maior cristalinidade (66%) foi a CB produzida com meio de cultura utilizando apenas a Frutose como fonte de carbono. O resultado encontrado foi o valor mais próximo ao percentual de 79% para CB-HS, descrita anteriormente (Item 5.1.1.2). Contudo, muitos trabalhos relatam, comumente, um percentual de cristalinidade em torno de 65–79% (AMORIM *et al.*, 2020). Para os biopolímeros CB-Glicerol e CB-Glicose a fração cristalina variou em torno de 59% e 58%, respectivamente. Esse resultado foi semelhante ao obtido por Goelzer *et al.* (2009), onde os pesquisadores produziram CB utilizando meio HS e glicose, obtendo fração cristalina de 56%. Apesar da cristalinidade, para os biopolímeros CB-Glicerol e CB-Glicose, ser relativamente inferior à média encontrada na literatura, ambos os percentuais ainda se encontram dentro da normalidade dos valores encontrados para polímeros de celulose bacteriana.

Os biopolímeros CB-Manitol, CB-Sacarose e CB-Extrato de Levedura apresentaram fração cristalina de 45%, 44% e 31%, respectivamente. O meio cultura tem sua composição formada basicamente por sais, o que poderia se esperar uma alta cristalinidade das CB, no entanto, não foi isso que se observou. Os meios de cultura ofereceram condições para que a organização das fibras de celulose fosse menos ordenada, o que poderia explicar o baixo percentual de cristalinidade. Esse fato pôde ser observado principalmente em três fontes de carbono: Manitol, Sacarose e Ext. Levedura. Esses meios de cultura associados às respectivas fontes de carbono atribuíram aos biopolímeros características, majoritariamente, amorfas. Dessa maneira, de acordo com a aplicação, algumas fontes de carbono (Extrato de levedura), se bem dosadas, poderão oferecer ao meio de cultura condições para produção de CB mais cristalinas, ou não, e termicamente estáveis.

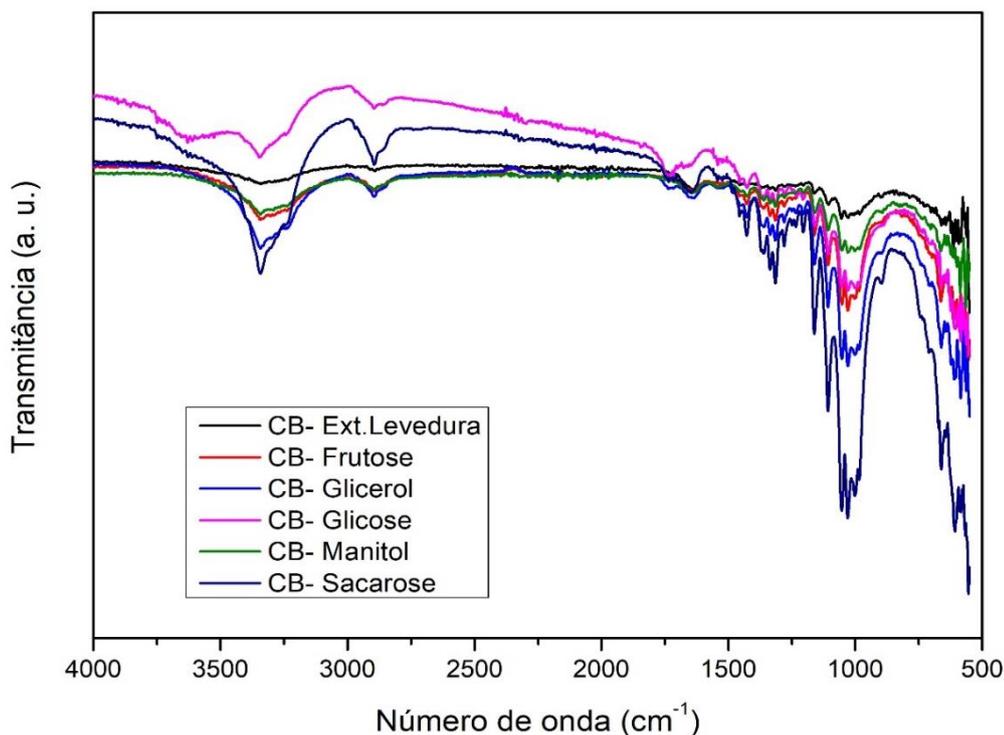
Dentre todas as amostras, a CB-Extrato de Levedura foi a que apresentou menor fração de cristalinidade. Tal característica se deve, provavelmente, pelo fato de o extrato de levedura não ser puramente uma fonte de carbono assimilável e “pobre” para o processo de polimerização, contendo cerca de 40% de aminoácidos, 5 a 7% de nucleotídeos, além de peptídeos, minerais e vitaminas (SILVA, 2006; LATEF *et al.*, 2019).

Na literatura, outros pesquisadores obtiveram percentual de cristalinidade de 53% e 47% para as CB produzidas em meios contendo Manitol e Sacarose, respectivamente. Os mesmos utilizaram o meio de cultura Zhou (Z), composto por glicose, licor de milho, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (MOHAMMADKAZEMI *et al.*, 2015). Logo, esses resultados estão de acordo com as observações apresentadas nessa tese, indicando que os biopolímeros produzidos são afetados pelo tipo, como também, a concentração da fonte de carbono utilizada.

5.2.1.3 Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho foram realizados com a finalidade de determinar os picos característicos das bandas de celulose bacteriana, bem como, a possível ocorrência de novos picos inerentes a interações entre a celulose e os componentes do meio de cultura salino e fontes de carbono. Os espectros dos biofilmes estão apresentados na Figura 24 e mostram semelhanças entre as celulosas produzidas nos diferentes meios de cultura, além da confirmação dos grupos vibracionais pertencentes a estrutura da celulose bacteriana.

Figura 24 - Espectros de infravermelho das membranas de celulose bacteriana produzidas em meio salino com diferentes fontes de carbono.



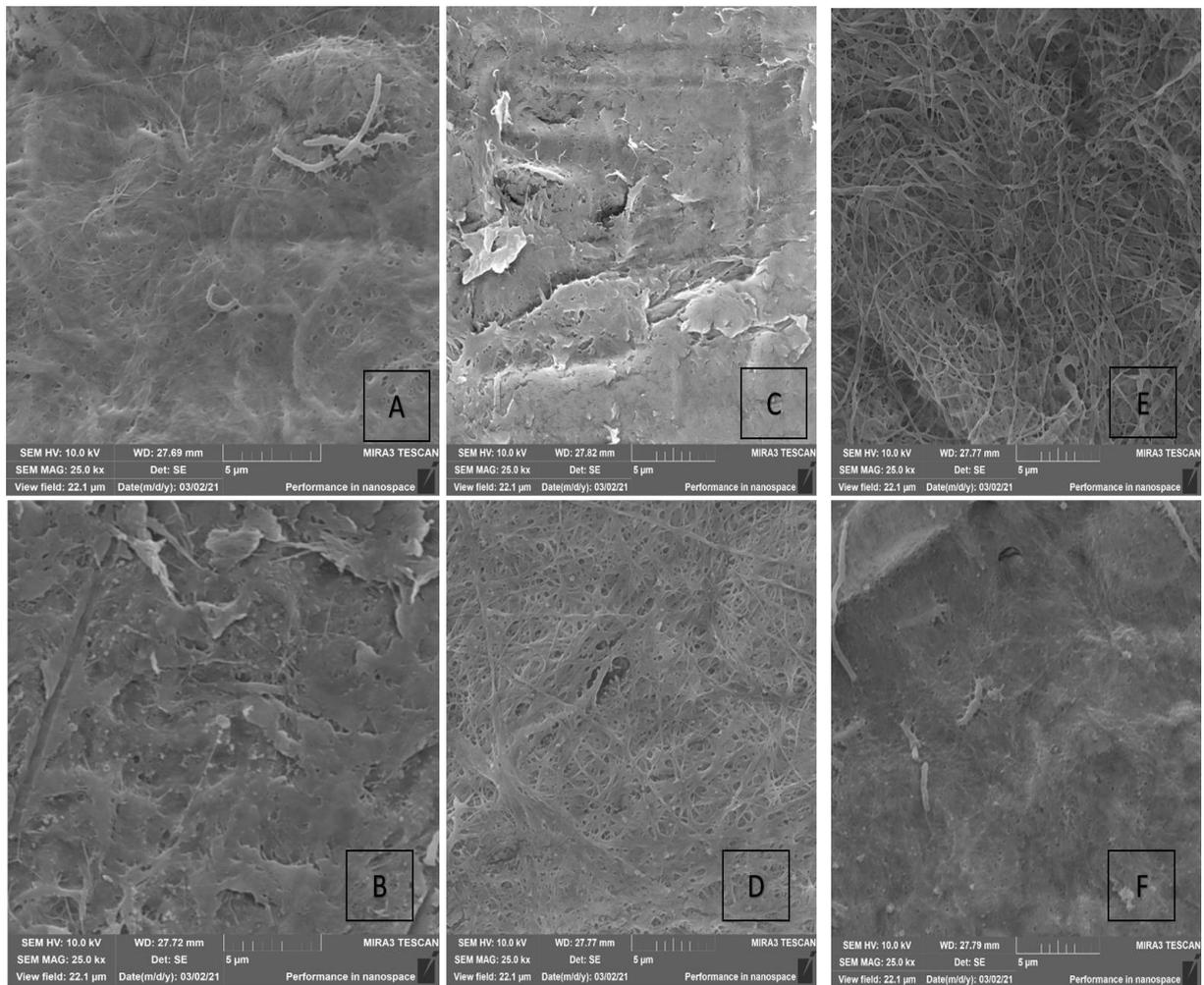
Fonte: A autora (2022).

As principais bandas da CB destacadas nos espectros foram: uma banda intensa na região de 3344 cm^{-1} atribuída ao alongamento vibracional dos grupos hidroxilas (O-H), um pico em 2894 cm^{-1} que corresponde ao estiramento CH de alcanos e estiramento assimétrico (-CH₂-), CH₂-OH a deformação corresponde ao pico 1647 cm^{-1} , picos nas regiões de 1427 cm^{-1} e 1313 cm^{-1} referentes às ligações C-OH e C-H; nas regiões de 1160 cm^{-1} e 1109 cm^{-1} o estiramento dos grupos C-O e C-OH, além de uma banda em 1052 cm^{-1} atribuída ao alongamento das ligações C-O-C e C-OH (MOLINA-RAMÍREZ *et al.*, 2017; REVIN *et al.*, 2018). De forma geral, em pesquisas de caracterização de CB, bandas vibracionais semelhantes foram também identificadas nos trabalhos de Saska *et al.* (2012), Gea *et al.* (2011) e Pecoraro *et al.* (2008).

5.2.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização morfológica das diferentes amostras de CB foi realizada utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura, gerando um conjunto de micrografias selecionadas da superfície dos biopolímeros, conforme a Figura 25.

Figura 25 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura das membranas de celulose bacteriana. CB-Manitol (A); CB-Extrato de Levedura (B); CB-Glicerol (C); CB-Sacarose (D); CB-Glicose (E); CB-Frutose (F).



Fonte: A autora (2022).

Para cada fonte de carbono, a dispersão das fibras celulósicas e a adesão interfacial entre elas são mostradas. Contudo, é possível observar que as CB produzidas em meio contendo Glicose (Figura 25-E) e Sacarose (Figura 25-D) possuíam áreas de estruturas fibrilares mais dispersas, tornando a estrutura, aparentemente, mais porosa. Por outro lado, os demais biopolímeros apresentaram nanofibras mais densas e compactas. É possível observar também, que os filmes CB-Glicerol e CB-Extrato de Levedura apresentaram estruturas menos homogêneas, com a possível formação de agregados ou falhas na superfície desses filmes.

Nas micrografias, Figura 25-A e Figura 25-F, é possível perceber a presença de alguns bacilos bacterianos presos à estrutura nanofibrilar. A presença das células bacterianas na rede de CB é comum e o processo de esterilização será decisivo na inativação desse microrganismo.

Em suas pesquisas, Molina-Ramírez *et al.* (2017) avaliaram o efeito de diferentes fontes de carbono na estrutura das *nanocelulose*. Eles observaram que a porosidade e dispersão das fibras CB frutose foi menor do que as membranas produzidas em meio contendo glicose ou sacarose.

Os resultados encontrados por Molina-Ramírez *et al.* corroboram com as principais observações obtidas nesta tese, de que as fontes de carbono sacarose e glicose geraram, visivelmente, biopolímeros com fibras menos compactadas e de maior porosidade. Tal fato, no entanto, encontra-se em maior evidência na CB-Glicose, que também apresentou uma boa dispersão das fibras dentro da matriz polimérica, sem agregados perceptíveis.

5.3 ETAPA 3: PROTOTIPAGEM DE EMBALAGEM PARA ALIMENTOS DO TIPO PAPEL UTILIZANDO CELULOSE BACTERINA

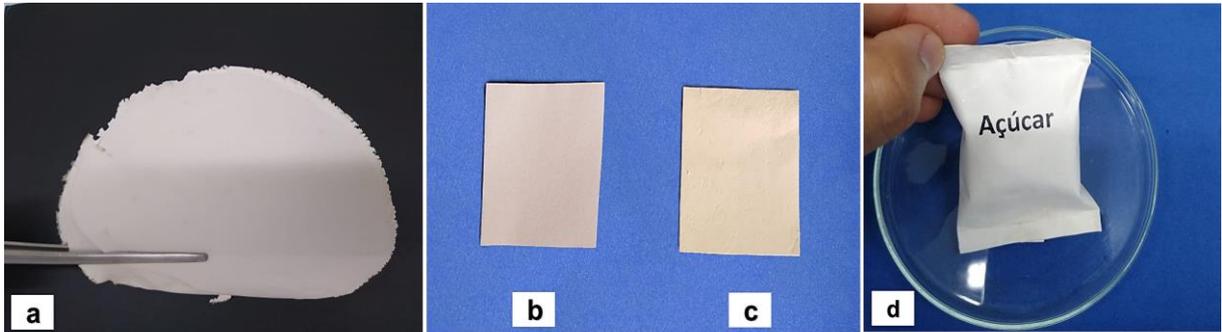
Em virtude de suas propriedades, a CB vem sendo produzida, estudada e indicada como matriz para elaboração de novos materiais, como por exemplo, o papel que pode ser utilizado na confecção de “embalagens verdes”. Na Figura 26-a e Figura 26-c temos um material piloto denominado CB papel, que pode ser comparado, visualmente, ao papel sulfite (Figura 26-b). Na Figura 26-d é possível observar um protótipo de uma embalagem feita a partir de CB mais aditivos. A impressão obteve boa aderência ao papel de CB, sem descorar ou manchar, conferindo à embalagem características promissoras e diversas aplicabilidades no setor de embalagens alimentícias, por exemplo.

O CB papel apresentou gramatura de 139 g/m², já o Papel comum (sulfite), calculado pelo método padronizado (NBR NM-ISO 536/2000 ABNT), foi de 75 g/m². Um dos papéis de embalagem de uso extensivo é o papel “kraft”, com gramatura predominantemente entre as 70 e as 180 g/m². Além da utilização como matéria-prima para fabricação de cartão ondulado e para sacos de papel, o papel “kraft” pode ser utilizado para envolvimento direto de produtos ou combinado com outros materiais para obter boa resistência mecânica e proteção contra umidade (CAMPOS, 2011).

Outros autores, durante o desenvolvimento de um papel bioativo antimicrobiano feito de CB, obtiveram um papel com gramatura de 70 g/m², que corresponde ao peso em gramas por metro quadrado de CB, cargas e aditivos. (BURUAGA-RAMIRO C *et al.*, 2020).

Segundo Donini *et al.* (2010), uma produção de celulose bacteriana equivalente a 1 hectare de eucalipto em sete anos poderia ser produzida em aproximadamente 22 dias. À face do exposto, substituir a celulose oriunda do setor florestal teria enormes implicações econômicas, sociais e ambientais. Haja vista as inúmeras aplicações da CB e seu caráter sustentável.

Figura 26 - Papel Comum (B), CB Papel (A e C) e protótipo de embalagem feita a partir de CB (D).



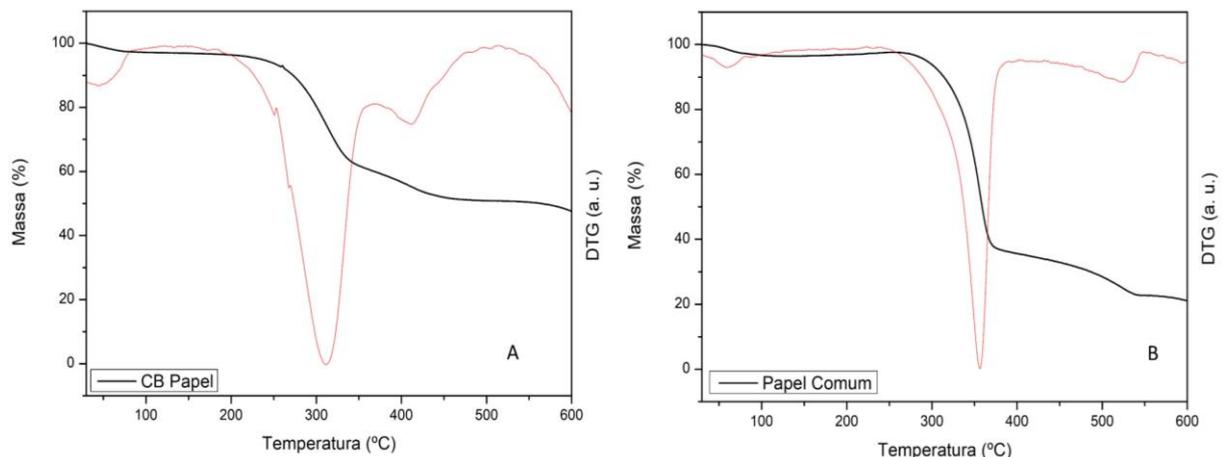
Fonte: A autora (2022).

5.3.1 Caracterização do Papel de Celulose Bacteriana

5.3.1.1 Análise Termogravimétrica (TGA)

A Figura 27 e Tabela 12 mostram principais resultados para a análise TGA / DTG das amostras CB Papel e Papel Comum.

Figura 27 - (A) Curvas de TGA e DTG para CB Papel; (B) Curvas de TGA e DTG para Papel Comum.



Fonte: A autora (2022).

Avaliando os termogramas, podemos observar uma diminuição da perda de umidade em temperaturas próximas a 100 ° C para as amostras CB Papel e Papel

Comum. Nessa temperatura, os papéis tiveram perdas de aproximadamente 3,4% de água relacionada a umidade presente em ambos os materiais.

Ao analisarmos o CB Papel, observamos a faixa degradativa que começou em 257,8 ° C e continuou até a temperatura máxima de 311,8 ° C; havendo cerca de 25,5% de perda de massa relacionada à degradação termo-oxidativa, bem como despolimerização e decomposição de unidades glicosídicas presentes na CB. A terceira região em torno de 412 ° C está associada à decomposição e carbonização do polímero poli (acetato de vinila). Essa resina é responsável por colar as fibras de CB, o que é uma prática normalmente utilizada em alguns papéis (ABU-SAIED *et al.*, 2012; GOMAA *et al.*, 2018).

No Papel comum a faixa degradativa começou em 314 ° C e continuou até a temperatura máxima de 356,6 ° C; durante esse nível de degradação houve uma perda de massa em torno de 46,0% relacionada à degradação termo-oxidativa, bem como despolimerização e decomposição de unidades glicosídicas também presentes na celulose vegetal. Por fim, a terceira região em torno de 524 ° C pode estar associada à decomposição de frações de lignina ou outros aditivos/resíduos. Kumar *et al.* (2017) avaliou termograficamente papéis de escrita/impressão. Em parte de sua pesquisa, os pesquisadores observaram alguns picos extras na faixa de temperatura de 400 a 500 ° C. Esse tipo de comportamento pode ser explicado pela presença de algumas impurezas ou de ingredientes inorgânicos durante o revestimento do papel no processo de fabricação.

Tabela 12 - Dados das temperaturas iniciais (Tonset), temperaturas finais (Toffset) e Temperaturas máximas de degradação (Tmáx) dos filmes Papel comum e CB Papel.

Resultados das Análises Termogravimétricas - TGA				
Perda de Umidade (Até 100 ° C)				
Amostra	m _{inicial} (mg)	m _{final} (mg)	Perda (%)	
Papel Comum	2,37	2,29	3,38	
CB Papel	2,88	2,78	3,47	
Principal Faixa Degradativa				
	T _{onset} (° C)	T _{offset} (° C)	T _{máx} (° C)	Resíduo (%)
Papel Comum	314,0	375,8	356,6	21,1
CB Papel	257,8	349,3	311,8	47,6

Fonte: A autora (2022).

De forma geral, o papel tradicional que utilizamos é constituído principalmente por celulose, frações de hemicelulose, CaCO_3 , CaSO_4 , aglutinantes, resinas e materiais de revestimento (FARDIM, 2002; CORDEIRO, 2018;). Tais diferenças, entre os comportamentos térmicos, podem ser explicadas pelo fato de que o CB Papel possui como base uma celulose mais pura, quando comparada ao Papel Comum de composição complexa (BURHENNE *et al.*, 2013; SKOČAJ, 2019).

Alguns aditivos, como por exemplo, o poli (acetato de vinila) e o carbonato de cálcio poderão oferecer certa estabilidade térmica às fibras de celulose (ABU-SAIED *et al.*, 2012; GOMAA *et al.*, 2018). Gao *et al.* (2013) relatou que a energia de ativação dos nanocompósitos aumenta com a adição de CaCO_3 . Ou seja, o carbonato aumenta ligeiramente a estabilidade térmica da matriz polimérica através das interações com os grupos OH. Apesar da menor estabilidade térmica observada no CB Papel, que teve uma diferença de $56,2^\circ\text{C}$, tal fato não inviabiliza a aplicação do CB Papel em novas embalagens sustentáveis. Pois, alguns processos, como por exemplo a selagem, não exigem temperaturas extremas.

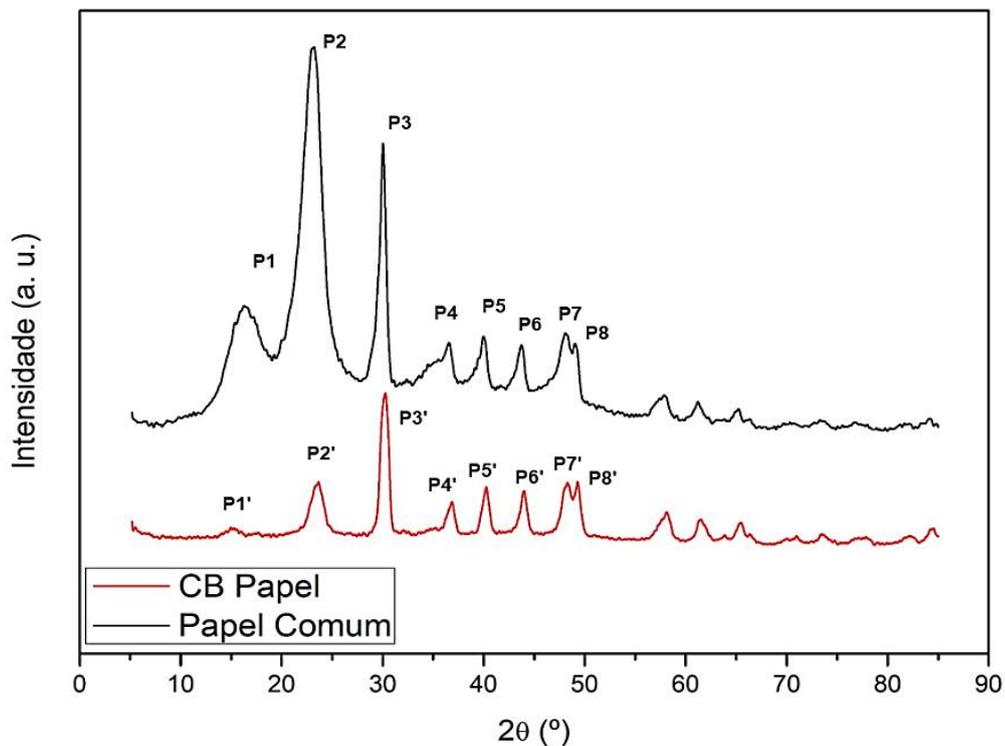
Segundo Merabtene *et al.* (2022), a temperatura é crucial para o emaranhamento das cadeias poliméricas durante o processo de selagem em embalagens flexíveis de papel. Esses pesquisadores detalharam também que materiais à base de papel tinham uma janela de selagem maior, até uma temperatura de 220°C , antes do material começar a ficar marrom. Portanto, a estabilidade térmica encontrada no CB Papel é suficiente para aplicação em embalagens flexíveis e sustentáveis.

Durante as degradações termogravimétricas pode-se observar diferenças significativas entre os percentuais de resíduos (Tabela 12). Esse fato está associado aos aditivos incorporados a papéis, que agem melhorando as propriedades, bem como diminuição dos custos, na forma de cargas de enchimento. Segundo Rodolfo *et al.* (2006), Carbonatos de cálcio, em baixas concentrações, podem ser definidos como cargas funcionais, que conferem um determinado grau de reforço, enquanto em altos teores atuam como carga de enchimento em compostos. Sendo assim, cerca de 40 % do resíduo para o CB Papel se deve ao carbonato utilizado.

5.3.1.2 Difractometria de Raios-X (DRX)

As avaliações de DRX dos biomateriais (CB Papel e Papel Comum) foram realizadas para assegurar a integridade dos materiais utilizados. A Figura 28 mostra os Difratogramas para os filmes de papel utilizando celulose vegetal e o papel produzido utilizando celulose bacteriana. É possível notar claramente a presença de dois picos iniciais da celulose e a seis picos associados ao carbonato de cálcio que é um aditivo comum do papel. Os picos P3 (30,2°), P3' (30,0°), P4 (36,8°), P4' (36,6°), P5 (40,2°), P5' (39,9°), P6 (43,9°), P6' (43,7°), P7 (48,3°), P7' (48,1°), P8 (49,3°), e P8' (49,0°) correspondem a (104), (110), (013), (202), (018) e (116) planos de CaCO_3 , respectivamente, enquanto os picos P1 (16,3°), P1' (16,3°), P2 (23,6°) e P2' (23,2°) estão associados a celulose vegetal do papel sulfite e a celulose bacteriana presente no papel desenvolvido em laboratório, respectivamente. A celulose é composta de domínios cristalinos e amorfos, sendo, portanto, um material semicristalino, onde os difratogramas apresentam picos largos. (DASARI *et al.*, 2016).

Figura 28 - Difratogramas de DRX para as amostras CB Papel e Papel Comum.



Fonte: A autora (2022).

O percentual de cristalinidade para a amostra Papel Comum foi de 61,29%, enquanto a cristalinidade do papel produzido a partir da CB apresentou 86,42%. Essa diferença de percentual pode ser explicada, primeiramente, pelo fato de que a nanocelulose tem maior cristalinidade frente a celulose vegetal e, segundo, pelos aditivos de carga comuns ao papel, como por exemplo, o carbonato de cálcio (PECORARO *et al.*, 2008; CHAWLA *et al.*, 2009; MOON *et al.*, 2011; YOUSEFI *et al.*, 2013; CAMPANO *et al.*, 2018).

Alguns aditivos comuns ao papel podem influenciar, de forma significativa, no percentual final de cristalinidade. Imani *et al.*, 2022 avaliou a obtenção de um filme superhidrofóbico a partir de celulose e carbonato de cálcio derivados de componentes do papel ou resíduos. Os pesquisadores verificaram que a presença de partículas de carbonato de cálcio no compósito aumentava a cristalinidade da celulose.

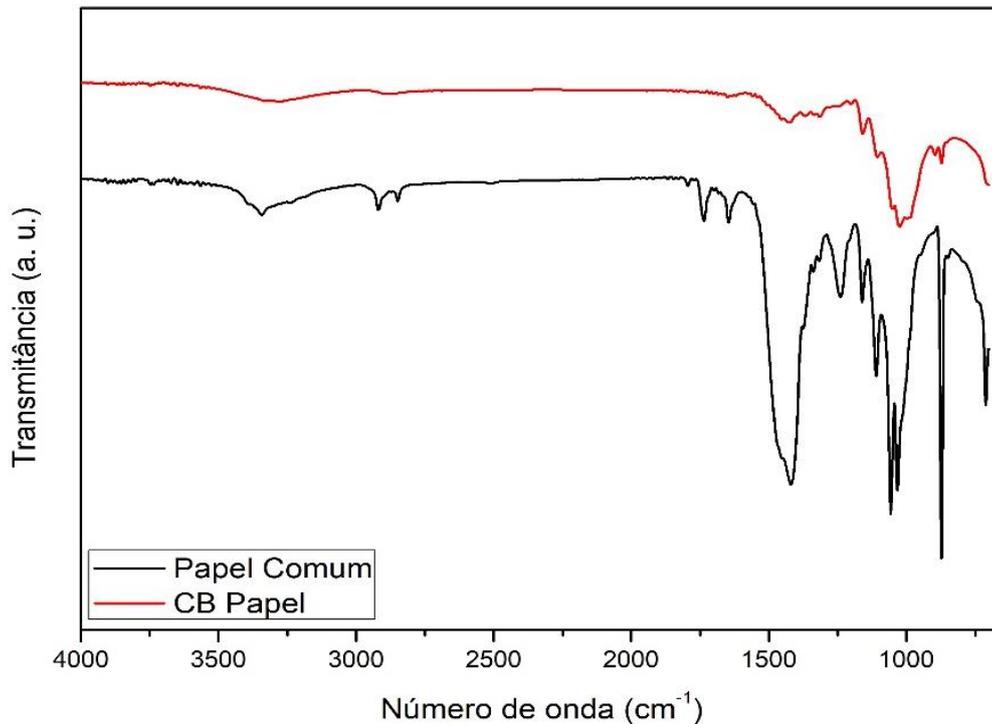
5.3.1.3 Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Nos espectros de FTIR das amostras CB Papel e Papel Comum (Figura 29), as bandas atribuídas à calcita podem ser observadas em 1418 cm^{-1} , 874 cm^{-1} e 712 cm^{-1} , sendo em menor intensidade para o CB Papel (MATEI *et al.*, 2019). Essas três absorções são atribuídas respectivamente à ligação simples modo de estiramento assimétrico de CO, ao modo de estiramento simétrico de CO ligação simples e aos modos de flexão OCO (deformação no plano) da calcita, um dos polimorfos do carbonato de cálcio (HAJJI *et al.*, 2015).

A banda larga que surge em 3327 cm^{-1} é resultado de associações poliméricas de estiramento do grupo OH da celulose e o pico em 2891 cm^{-1} é atribuído à vibração de alongamento assimétrico de C-H no anel piranose. A presença das bandas de absorção em torno de 1500 a 1700 cm^{-1} confirmam a presença do grupo carboxila ($-\text{COO}$). As bandas em torno de 1300 cm^{-1} e 1400 cm^{-1} são atribuídas à vibração em tesoura de metil ($-\text{CH}_2$) e ao grupo hidroxila ($-\text{OH}$), respectivamente. A banda em torno de 1050 cm^{-1} a 1100 cm^{-1} é devido ao estiramento (CH-O-CH) (ISCA *et al.*, 2016; WEI *et al.*, 2017).

A diferença de intensidade entre os gráficos pode estar associada à diminuição das ligações de hidrogênio, ocasionada pela quebra das ligações da estrutura cristalina das cadeias de CB durante o processo de preparo da pasta para fabricação do CB Papel (MOHKAMI & TALAEIPOUR, 2011).

Figura 29 - Espectros de FTIR das amostras CB Papel e Papel Comum.



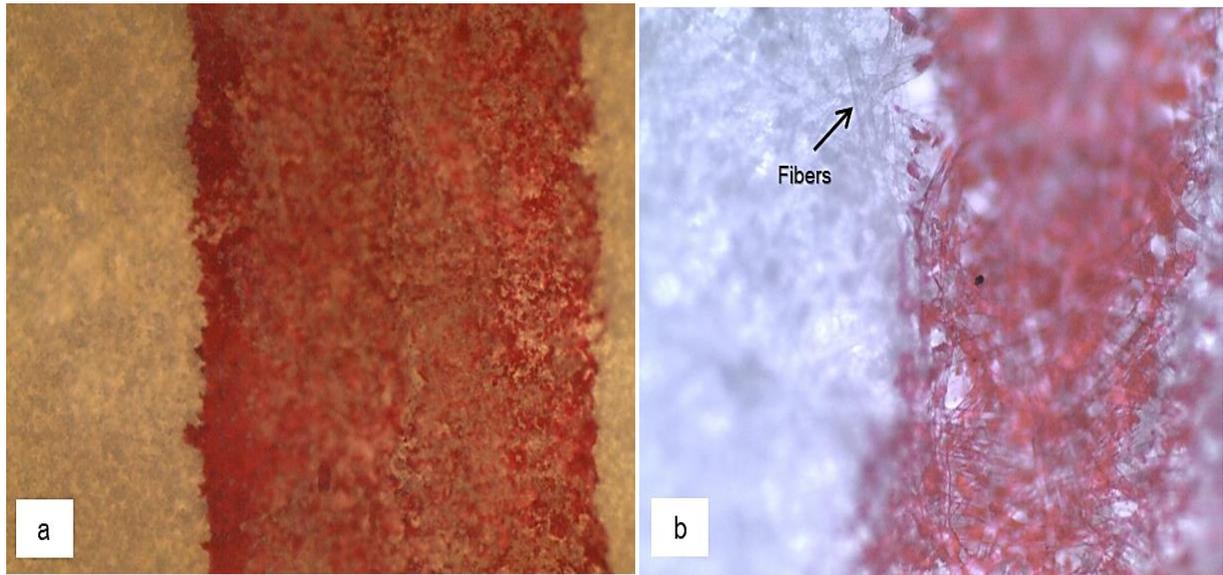
Fonte: A autora (2022).

5.3.1.4 Microscopia Óptica (MO)

A análise microscópica foi realizada com lentes objetivas de aumento 20x. Ambos os papéis receberam tinta de caneta esferográfica vermelha na superfície. A dispersão do pigmento foi observada nas imagens micrográficas.

As imagens microscópicas do CB Papel (Figura 30-a) e do Papel Comum (Figura 30-b), apresentam filmes homogêneos com morfologias semelhantes. Porém, na amostra de Papel Comum é possível visualizar as fibras, visto que foi produzido com celulose vegetal, enquanto o papel produzido com membrana CB possui fibras nanométricas que não podem ser observadas no microscópio óptico (HUSSAIN *et al.*, 2019).

Figura 30 - Imagens de microscopia óptica do CB Papel (a) e Papel Comum (b), com lentes objetivas para aumento de 20x.



Fonte: A autora (2022).

5.3.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

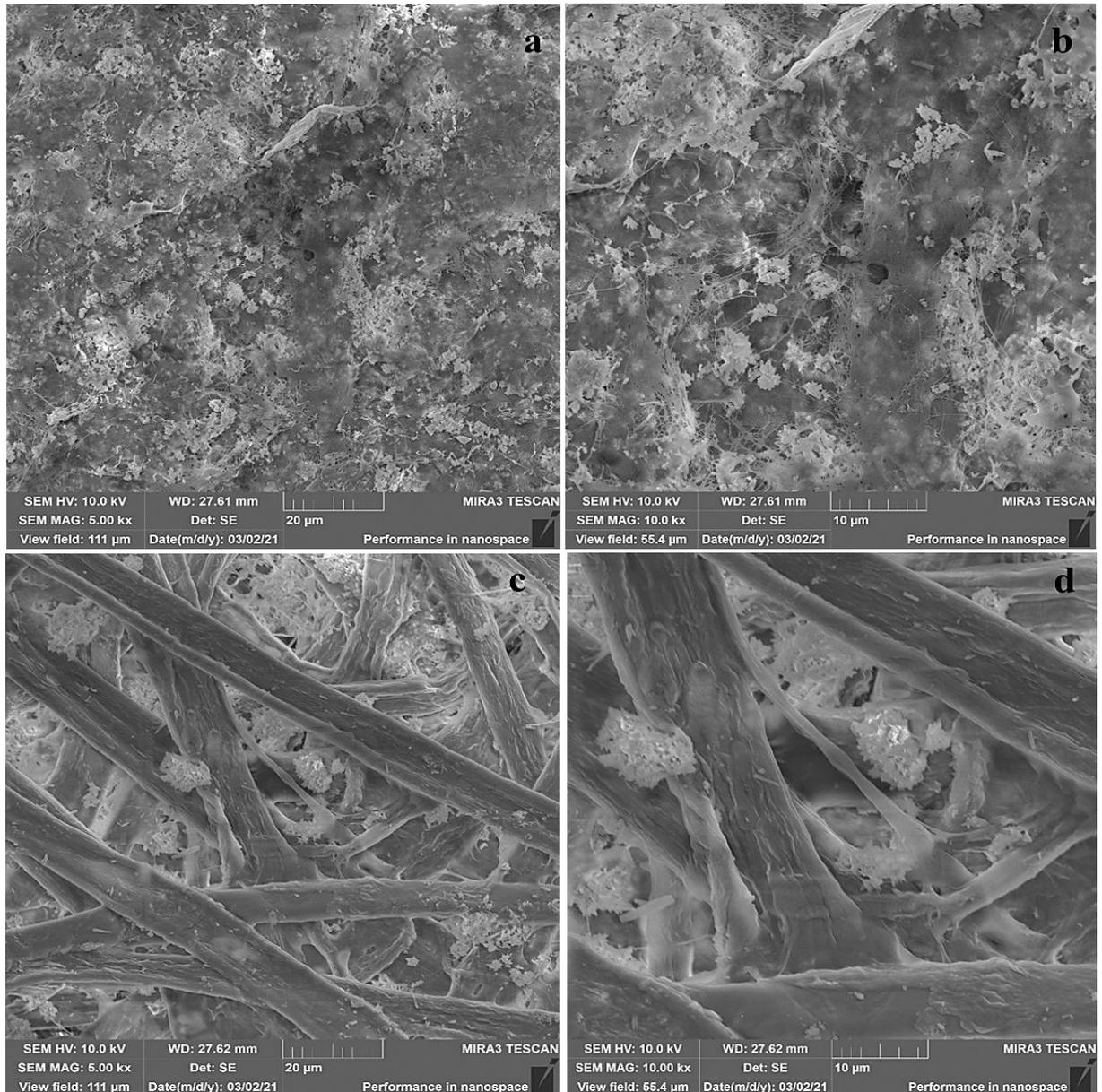
Observações realizadas por microscopia eletrônica de varredura ampliam a morfologia típica dos dois tipos de papel e a estrutura das fibras, com destaque especial para a diferença de dimensão entre as fibras do Papel CB e do Papel comum. É possível notar uma estrutura típica formada por feixes vasculares, conforme mostrado nas micrografias da Figura 31. A morfologia fibrosa do Papel Comum é feita de grandes fibras não rasgadas com porosidade irregular e distribuição aleatória. Já o papel feito a partir da celulose bacteriana possui fibras em caráter nanométrico, e contendo porosidade irregular e distribuição aleatória das fibras. O aparecimento de muitas manchas brancas incorporadas às fibras está relacionado aos enchimentos, calcita, de ambos os papéis analisados (HAJJI *et al.*, 2015).

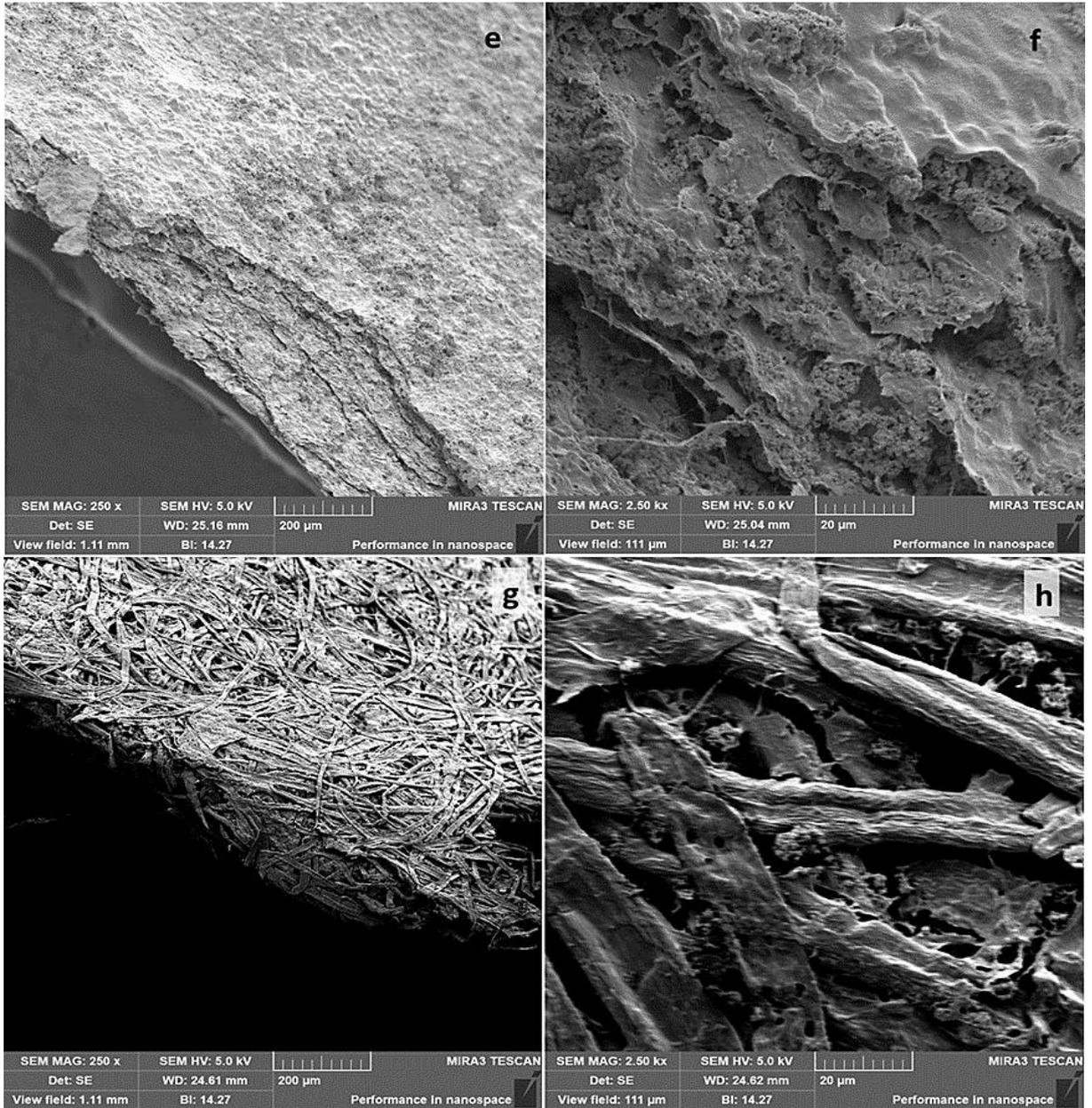
Observações realizadas por microscopia eletrônica de varredura na seção transversal dos filmes ampliam a morfologia típica dos dois tipos de papeis e a estrutura das fibras. Nas imagens Figura 31-e e Figura 31-f da seção transversal do papel produzido com CB é possível observar que as fibras em caráter nanométrico ficaram pouco evidenciadas. Tal fato pode estar relacionado aos enchimentos de calcita e da resina poli (acetato de vinila).

Nas imagens Figura 31-g e Figura 31-h da seção transversal do papel Comum, é possível notar uma estrutura típica de uma amostra de papel, contendo

fibras de madeira entre as quais são encontrados volumes de vazios, normalmente preenchidos por ar e materiais de carga (YU *et al.*, 2006). De forma geral, as maiores diferenças dizem respeito ao caráter nanométrico das fibras de CB e micrométrico das fibras de celulose vegetal.

Figura 31 - Micrografias do CB Papel (a e b), Papel Comum (c e d) e Micrografias com vistas de topo e seção transversal das amostras CB Papel (e e f) e Papel Comum (g e h).





Fonte: A autora (2022).

6 CONCLUSÃO

Durante a primeira etapa do estudo, o processo de hidrólise do amido pelo fungo *Aspergillus oryzae* ofereceu uma nova alternativa para a produção de CB a partir de grãos e tubérculos, uma vez que a glicose presente nos mesmos não está disponível para microrganismos produtores de celulose e, portanto, não há energia para a produção de CB.

A hidrólise do amido de arroz e milho disponibilizou a glicose como fonte de carbono nas fermentações, possibilitando a utilização de meios alternativos para a produção de CB. Os resultados mostraram um rendimento máximo de $2,80 \pm 0,43$ g / L de CB obtida com o meio de arroz hidrolisado.

Além disso, a celulose bacteriana produzida nos meios de arroz e milho apresentaram cristalinidade em torno de 55%. Através da análise de IV foi possível confirmar os grupos funcionais existentes na celulose bacteriana sem a presença de quaisquer contaminantes oriundo do processo de produção. Já com relação a análise termogravimétrica, os polímeros formados a partir dos meios alternativos apresentaram maior estabilidade térmica. Na análise da microscopia eletrônica de varredura, observou-se uma estrutura morfológica com orientação aleatória de nanofibrilas em ambos os filmes poliméricos.

Os meios propostos (hidrolisados de amido: arroz e milho) possibilitaram a produção de CB eliminando a necessidade de glicose sintética (Comercial), reduzindo o custo de produção de biopolímeros.

Na segunda etapa dos experimentos, a produção de CB foi realizada utilizando uma solução salina e fontes de carbono (Glicose, Glicerol, Sacarose, Frutose, Peptona, Extrato de Levedura ou Manitol). O rendimento máximo de $5,72 \pm 0,01$ g / L de CB foi obtido com o meio contendo Sacarose.

As avaliações por DRX mostram difratogramas com picos largos, e percentuais de cristalinidade que variaram de 31% (Extrato Levedura) a 66% (Frutose) a partir da fonte de carbono. Já a análise de IV confirmou os grupos funcionais existentes na celulose bacteriana. Com relação à avaliação termogravimétrica, as fontes de carbono Extrato de levedura e Manitol proporcionaram aos biopolímeros de CB temperaturas máximas de degradação superiores. No entanto, a CB-Glicerol gerou maior percentual de resíduo ao final do processo termogravimétrico.

A partir das micrografias, observou-se que as CB produzidas em meio contendo Glicose e Sacarose possuíram áreas de estruturas fibrilares mais dispersas em comparação às demais.

O meio de cultura salino desenvolvido possui enorme versatilidade podendo ser utilizado em testes bioquímicos, bem como na produção de biopolímeros de celulose bacteriana, e essa formulação, de composição controlada, poderá ser dosada com diferentes fontes de carbono a fim de se obter materiais com características e aplicações desejadas.

Após a produção da CB, a terceira etapa do estudo trouxe uma aplicação para CB de melhor rendimento (CB-Sacarose: 5,72 g / L). Sendo assim, uma “embalagem sustentável” foi prototipada.

O CB papel, base da nova embalagem, apresentou gramatura de 139 g/m² e obteve uma boa estabilidade térmica; o percentual de cristalinidade para a amostra Papel Comum foi de 61,29%, enquanto a cristalinidade do CB Papel foi de 86,42%. As características do protótipo desenvolvido proporcionaram à embalagem boas características para aplicação desejada.

De forma geral, os resultados encontrados trouxeram alternativas à celulose vegetal com o intuito de reduzir os inúmeros impactos ambientais ligados ao setor de embalagens, oferecendo novos ânimos a uma geração de materiais naturais e sofisticados.

REFERÊNCIAS

- ABDEL LATEF, A. A. H. *et al.* Extracts from Yeast and Carrot Roots Enhance Maize Performance under Seawater-Induced Salt Stress by Altering Physio-Biochemical Characteristics of Stressed Plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 38, n. 3, 2 set. 2019.
- ABRE. **Associação Brasileira de Embalagem- ABRE**, 2022.
- ABU-SAIED, M.; KHALIL, K. A.; AL-DEYAB, S. S. Preparation and Characterization of Poly Vinyl Acetate Nanofiber Doping Copper Metal. **Int. J. Electrochem. Sci.**, v. 7, p. 2019–2027, 2012.
- ADNAN, A. *et al.* Glycerol as a cheaper carbon source in bacterial cellulose (BC) production by *Gluconacetobacter xylinus* DSM46604 in batch fermentation system. **Malaysian Journal of Analytical Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1131–1136, 2015.
- AL-ABDALLAH, W.; DAHMAN, Y. Production of green biocellulose nanofibers by *Gluconacetobacter xylinus* through utilizing the renewable resources of agriculture residues. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 11, 5 nov. 2013.
- ALBUQUERQUE, R. M. *et al.* Production of a bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) blend activated with clove essential oil for food packaging. **Polymers and Polymer Composites**, v. 29, n. 4, 20 maio 2021.
- ALMEIDA, A. P. C. *et al.* Crosslinked bacterial cellulose hydrogels for biomedical applications. **European Polymer Journal**, v. 177, ago. 2022.
- ALMEIDA, D. M. *et al.* Minerals consumption by *Acetobacter xylinum* on cultivation medium on coconut water. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, 2013.
- AMORIM, J. D. P. *et al.* Bacterial Cellulose Production Using Fruit Residues as Substrat to Industrial Application. **Chemical Engineering Transactions**, v. 74, p. 1165–1170, 2019.
- ANDRADE, F.; P. R.; D. F. G. F. M. Bacterial Cellulose: properties, production and applications. Em: A. LEJEUNE, T. D. (Ed.). **Nova Science Publishers**. [s.l: s.n.]. p. 427–458.
- AZEREDO, H. M. C. *et al.* Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 3, 18 fev. 2019.
- BAE, S. O.; SHODA, M. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 1, 25 abr. 2005.
- BAE, S.; SHODA, M. Bacterial Cellulose Production by Fed-Batch Fermentation in Molasses Medium. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 5, 1 out. 2004.

BARUD, H. S. *et al.* Thermal characterization of bacterial cellulose–phosphate composite membranes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, n. 3, p. 815–818, 7 mar. 2007.

BISSWANGER, H. Enzyme assays. **Perspectives in Science**, v. 1, n. 1–6, maio 2014.

BROWN, A. J. XLIII. —On an acetic ferment which forms cellulose. **J. Chem. Soc., Trans.**, v. 49, n. 0, 1886.

BURHENNE, L. *et al.* The effect of the biomass components lignin, cellulose and hemicellulose on TGA and fixed bed pyrolysis. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 101, maio 2013.

BURUAGA-RAMIRO, C. *et al.* Development of an antimicrobial bioactive paper made from bacterial cellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 158, set. 2020.

CACICEDO, M. L. *et al.* Self-assembly of carrageenin-CaCO₃ hybrid microparticles on bacterial cellulose films for doxorubicin sustained delivery. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 13, n. 3, 1 jul. 2015.

CALEGARI, E. P.; OLIVEIRA, B. F. DE. Compósitos a partir de materiais de fontes renováveis como alternativa para o desenvolvimento de produtos. **Sustainability in Debate**, v. 7, n. 1, p. 140–155, 30 abr. 2016.

CAMPANO, C. *et al.* Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review. **Cellulose**, v. 23, n. 1, 18 fev. 2016.

CAMPOS, E. DA S. **Curso Básico de Fabricação de Celulose e Papel**. 2011. Disponível em: <https://www.eucalyptus.com.br/artigos/outros/2011_Curso_Fabricacao_Celulose_Papel.pdf>. Acesso em: 24 abr. 2023

CAMPOS, J. C. **Embalagens compostáveis para snacks**. Disponível em: <<http://ed.uemg.br/category/premiacao/>>. Acesso em: 19 dez. 2022.

CARVALHO, L. L. M. DE. **Estudo da hidrólise e fermentação de resíduos de milho (zea mays) para produção de etanol de segunda geração**. Maceió: Universidade Federal de Alagoas, 2016.

CASTRO, C. *et al.* Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, fev. 2011.

CAVKA, A. *et al.* Production of bacterial cellulose and enzyme from waste fiber sludge. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, 2013.

CAZÓN, P.; VELÁZQUEZ, G.; VÁZQUEZ, M. Bacterial cellulose films: Evaluation of the water interaction. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 25, p. 100526, set. 2020.

CERRUTTI, P. *et al.* Production of bacterial nanocellulose from wine industry residues: Importance of fermentation time on pellicle characteristics. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 14, p. n/a-n/a, 10 abr. 2016.

CHAO, Y.; SUGANO, Y.; SHODA, M. Bacterial cellulose production under oxygen-enriched air at different fructose concentrations in a 50-liter, internal-loop airlift reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 6, 1 jun. 2001.

CHAWLA, P. R. *et al.* Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 2, n. 47, p. 107–124, 2009.

CHENG, Z. *et al.* Green synthesis of bacterial cellulose via acetic acid pre-hydrolysis liquor of agricultural corn stalk used as carbon source. **Bioresource Technology**, v. 234, jun. 2017.

COHEN, N.; SICHER, E.; UĞUR YAVUZ, S. Designing with microbial cellulose to feed new biological cycles ¹. **International Journal of Food Design**, v. 4, n. 2, p. 155–171, 1 ago. 2020.

COIMBRA, C. G. DE OLIVEIRA. **Produção de Celulose Bacteriana Por Gluconacetobacter Xylinus e Elaboração de Filmes Comestíveis**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

CORDEIRO, J. A. **A Indústria Nacional de Papel e Celulose e Seus Impactos de Produção: Um Estudo de Caso Para a Cidade de Rio Branco – Ac. BELÉM – PA**: Universidade Federal do Pará, 2018.

CORRADINI, E. *et al.* **Amido Termoplástico**. São Carlos, SP: [s.n.], 2007.

COSTA, A. F. DE S. *et al.* Production of Paper Using Bacterial Cellulose and Residue from the Sugar and Alcohol Industry. **Chemical Engineering Transactions**, v. 79, p. 85–90, 1 abr. 2020.

COSTA, A. F. S. *et al.* Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* Using Corn Steep Liquor As Nutrient Sources. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 17 out. 2017.

COSTA, J. A. V. **Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL em Fermentação Semissólida de Farelo de Arroz**. Doutorado em Engenharia de Alimentos— Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1996.

CPT. **Embalagem ecológica é novidade na comercialização de ovos**. Disponível em: <<https://www.cpt.com.br/noticias/embalagem-ecologica-novidade-comercializacao-ovos>>. Acesso em: 2 dez. 2022.

DANTAS, É. MARA.; AQUINO, L. C. L. DE. Fermentação em Estado Sólido de Diferentes Resíduos Para a Obtenção de Lipase Microbiana. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 81–87, 2010.

DASARI, M. *et al.* Calligraphic solar cells: acknowledging paper and pencil. **Journal of Materials Research**, v. 31, n. 17, 14 set. 2016.

DAYAL, M. S. *et al.* Effect of media components on cell growth and bacterial cellulose production from *Acetobacter acetii* MTCC 2623. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, abr. 2013.

DE AMORIM, J. D. P. *et al.* Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 3, 23 maio 2020.

DE SALVI, D. T. B. *et al.* Self-supported bacterial cellulose/boehmite organic–inorganic hybrid films. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 63, n. 2, 31 ago. 2012.

DE SALVI, D. T. B. *et al.* Preparation, thermal characterization, and DFT study of the bacterial cellulose. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 118, n. 1, 24 out. 2014.

DONINI, Í. A. N. *et al.* Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v. 35, n. 4, p. 165–178, 2010.

DORS, G. C.; PINTO, R. H.; BADIALE-FURLONG, E. Influência das condições de parboilização na composição química do arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, mar. 2009.

DUARTE, E. B. *et al.* Celulose bacteriana: propriedades, meios fermentativos e aplicações. **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2019.

DULF, F. V.; VODNAR, D. C.; SOCACIU, C. Effects of solid-state fermentation with two filamentous fungi on the total phenolic contents, flavonoids, antioxidant activities and lipid fractions of plum fruit (*Prunus domestica* L.) by-products. **Food Chemistry**, v. 209, out. 2016.

DUNGANI, R. *et al.* Agricultural Waste Fibers Towards Sustainability and Advanced Utilization: A Review. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 15, n. 1–2, 15 dez. 2015.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, mar. 2003.

DUTTA, N. *et al.* Improved production of reducing sugars from rice husk and rice straw using bacterial cellulase and xylanase activated with hydroxyapatite nanoparticles. **Bioresource Technology**, v. 153, fev. 2014.

ECKERT, C. T. *et al.* Maize ethanol production in Brazil: Characteristics and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, fev. 2018.

ELLWANGER, E. R. A. **Produção de Filme de Celulose Bacteriana Com Resíduo Cervejeiro para Aplicação em Embalagens de Alimentos**. Belo Horizonte: Universidade do Estado de Minas Gerais, 2022.

ELYASI FAR, B. *et al.* Microbial Alpha-Amylase Production: Progress, Challenges and Perspectives. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 10, n. 3, p. 350–358, 11 maio 2020.

EPE. **A indústria de Papel e Celulose no Brasil e no Mundo**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-650/Pulp%20and%20paper_EPE+IEA_Portugu%C3%AAs_2022_01_25_IBA.pdf>. Acesso em: 2 jan. 2023.

ESCOLA DE DESIGN, U. **Embalagens Compostáveis para Snacks**. Disponível em: <<http://ed.uemg.br/category/premiacao/>>. Acesso em: 20 abr. 2023.

EVANS, B. R. *et al.* Palladium-bacterial cellulose membranes for fuel cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, n. 7, jul. 2003.

FARDIM, P. **Superfície da Fibra e a Química da Parte Úmida; Papel e Química de Superfície - Parte I**. [s.l: s.n.].

FERREIRA, D.; SILVA, P.; MADEIRA, T. F. Embalagens Verdes: Conceitos, Materiais e Aplicações. **Revista Americana de Empreendedorismo e Inovação**, v. 1, n. 2, p. 28–39, 2019.

FERREIRA, S. M. *et al.* Produção de Açúcares Redutores por Hidrólise Ácida E Enzimática De Farinha De Arroz. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 4, p. 383–390, 2013.

GAO, H. *et al.* Comparison of bacterial nanocellulose produced by different strains under static and agitated culture conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 227, jan. 2020.

GARDNER, D. J. *et al.* Adhesion and Surface Issues in Cellulose and Nanocellulose. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v. 22, n. 5–6, jan. 2008.

GEA, S. *et al.* Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, out. 2011.

GHOZALI, M.; MELIANA, Y.; CHALID, M. Synthesis and characterization of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* using liquid tapioca waste. **Materials Today: Proceedings**, 2021. v. 44, p. 2131–2134.

GIACOBBO, F. C. N. **Híbridos de milho submetidos a diferentes temperaturas de secagem em dietas suplementadas com ou sem enzimas para frangos de corte**. Marechal Cândido Rondon: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2020.

GOELZER, F. D. E. *et al.* Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 2, p. 546–551, mar. 2009.

GOMAA, M. M. *et al.* Crosslinked PVA/SSA proton exchange membranes: correlation between physicochemical properties and free volume determined by positron annihilation spectroscopy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, n. 44, p. 28287–28299, 2018.

GOMES, R. J. *et al.* Komagataeibacter intermedius V-05: An Acetic Acid Bacterium Isolated from Vinegar Industry, with High Capacity for Bacterial Cellulose Production in Soybean Molasses Medium. **Food Technology and Biotechnology**, v. 59, n. 4, p. 432–442, 1 nov. 2021a.

GOPAL, P. M.; SIVARAM, N. M.; BARIK, D. Paper Industry Wastes and Energy Generation from Wastes. Em: **Energy from Toxic Organic Waste for Heat and Power Generation**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 83–97.

GOTTSCHALK, L. *et al.* **Produção de Celulose Bacteriana e suas Aplicações**. 1. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

GROWING PRODUCTS. **Embalagem para batatas fritas**. Disponível em: <growingproducts.tumblr.com>. Acesso em: 14 dez. 2022.

GÜZEL, M.; AKPINAR, Ö. Production and Characterization of Bacterial Cellulose from Citrus Peels. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 8, 15 ago. 2019.

HA, J. H. *et al.* Production of bacterial cellulose by a static cultivation using the waste from beer culture broth. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 25, n. 4, 16 jul. 2008.

HAJJI, L. *et al.* Conservation of Moroccan manuscript papers aged 150, 200 and 800years. Analysis by infrared spectroscopy (ATR-FTIR), X-ray diffraction (XRD), and scanning electron microscopy energy dispersive spectrometry (SEM-EDS). **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 136, fev. 2015.

HASSAN, E. *et al.* The Characterization of Bacterial Cellulose Produced by Acetobacter xylinum and Komgataeibacter saccharovorans under Optimized Fermentation Conditions. **British Microbiology Research Journal**, v. 9, n. 3, 10 jan. 2015.

HAZAA, M. M. *et al.* High Production of Kojic Acid Crystals by Isolated Aspergillus oryzae var. effusus NRC14. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 9, n. 3, p. 1714–1723, 2013.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose*. **Biochemical Journal**, v. 58, n. 2, 1 out. 1954.

HORII, F.; HIRAI, A.; YAMAMOTO, H. Microstructural analysis of microfibrils of bacterial cellulose. **Macromolecular Symposia**, v. 120, n. 1, jul. 1997.

HSIEH, Y.-C. *et al.* An estimation of the Young's modulus of bacterial cellulose filaments. **Cellulose**, v. 15, n. 4, 21 ago. 2008.

HU, Y.; CATCHMARK, J. M. In vitro biodegradability and mechanical properties of bioabsorbable bacterial cellulose incorporating cellulases. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 7, jul. 2011.

- HUANG, Y. *et al.* Recent advances in bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 21, n. 1, 27 fev. 2014.
- HUBBE, MARTIN. *et al.* Cellulosic nanocomposites, review. **BioResources**, v. 3, n. 3, p. 929–980, 2008.
- HUSSAIN, Z. *et al.* Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review. **Cellulose**, v. 26, n. 5, 7 mar. 2019.
- IBÁ. **INDUSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES- IBÁ**. Disponível em: <<https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-iba-2020.pdf>>. Acesso em: 2 mar. 2021.
- IDEIA CIRCULAR. **Biofabricação de embalagens circulares**. Disponível em: <<https://ideiacircular.com/biofabricacao-de-embalagens/>>. Acesso em: 20 abr. 2023.
- IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose—a masterpiece of nature’s arts. **Journal of Materials Science**, v. 35, n. 2, 2000.
- IMANI, M. *et al.* Achieving a Superhydrophobic, Moisture, Oil and Gas Barrier Film Using a Regenerated Cellulose–Calcium Carbonate Composite Derived from Paper Components or Waste. **Sustainability**, v. 14, n. 16, p. 10425, 22 ago. 2022.
- ISCA, C. *et al.* Paper preservation with polyamidoamines: a preliminary study. **Cellulose**, v. 23, n. 2, 9 abr. 2016.
- JANG, W. D. *et al.* Bacterial cellulose as an example product for sustainable production and consumption. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 5, set. 2017.
- JIN, F.-J. *et al.* Advances in Genetic Engineering Technology and Its Application in the Industrial Fungus *Aspergillus oryzae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 23 fev. 2021.
- JORGE, N. **Embalagens para Alimentos**. 1. ed. [s.l: s.n.]. v. 1, 2013.
- JOUPPILA, K.; ROOS, Y. H. The physical state of amorphous corn starch and its impact on crystallization. **Carbohydrate Polymers**, v. 32, n. 2, fev. 1997.
- JOZALA, A. F. *et al.* Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, 8 mar. 2016.
- JUNG, H.-I. *et al.* Production and Characterization of Cellulose by *Acetobacter* sp. V6 Using a Cost-Effective Molasses–Corn Steep Liquor Medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 2, 4 set. 2010.
- KADIER, A. *et al.* Use of Industrial Wastes as Sustainable Nutrient Sources for Bacterial Cellulose (BC) Production: Mechanism, Advances, and Future Perspectives. **Polymers**, 30 set. 2021. v. 13, n. 19, p. 3365.
- KARIM, K. M. R. *et al.* Purification of an alpha amylase from *Aspergillus flavus* NSH9 and molecular characterization of its nucleotide gene sequence. **3 Biotech**, v. 8, n. 4, p. 204, 29 abr. 2018.

KLEMM, D. *et al.* Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 22, 30 maio 2005.

KLEMM, D. *et al.* Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 24, 6 jun. 2011.

KOBAYASHI, T. *et al.* Genomics of *Aspergillus oryzae*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 71, n. 3, 23 mar. 2007.

KONG, L. *et al.* Evaluating energy efficiency improvement of pulp and paper production: Case study from factory level. **Journal of Cleaner Production**, v. 277, p. 124018, dez. 2020.

KOOLMAN, J. R. K.-HEINRICH. **Color Atlas of Biochemistry**. 2nd. ed. [s.l: s.n.].

KUMAR, R. *et al.* Analysis of writing/printing paper via Thermogravimetric Analysis: application in forensic science. **Australian Journal of Forensic Sciences**, v. 51, n. 1, 2 jan. 2019.

KUO, C.-H. *et al.* Hydrolysis of Orange Peel with Cellulase and Pectinase to Produce Bacterial Cellulose using *Gluconacetobacter xylinus*. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 1, 31 jan. 2019.

KUROSUMI, A. *et al.* Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, mar. 2009.

LAGE, C. F. DE A. *et al.* Características e processamento do grão de milho e sua utilização no concentrado de bezerros em aleitamento. **Nutritime Revista Eletrônica**, v. 14, n. 5, p. 7026–7031, 2017.

LAVOINE, N. *et al.* Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 2, out. 2012.

LEE, D. *et al.* Metabolomic Profiles of *Aspergillus oryzae* and *Bacillus amyloliquefaciens* During Rice Koji Fermentation. **Molecules**, v. 21, n. 6, 14 jun. 2016.

LEE, K.-Y. *et al.* More Than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Biosynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, n. 1, jan. 2014.

LI, Z. *et al.* Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 120, p. 115–119, abr. 2015.

LIBRETEXTS BIOLOGY. **Culture Media**. Disponível em: <https://bio.libretexts.org/Courses/Prince_Georges_Community_College/PGCC_Microbiology/08%3A_Microbial_Growth/8.04%3A_Culturing_Bacteria/8.4.02%3A_Culture_Media>. Acesso em: 20 abr. 2023.

LIMA, H. L. S. *et al.* Bacterial Cellulose Production by *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 Using Sisal Juice - An Agroindustry Waste. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 3, p. 671–680, jul. 2017.

LIMBERGER, V. M. *et al.* Modificação química e física do amido de quirera de arroz para aproveitamento na indústria de alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 1, 2008.

LIN, S.-B. *et al.* Adding enzymatically modified gelatin to enhance the rehydration abilities and mechanical properties of bacterial cellulose. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2195–2203, dez. 2009.

LUO, M.-T. *et al.* Efficient Using Durian Shell Hydrolysate as Low-Cost Substrate for Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter xylinus*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 4, 20 dez. 2017.

MACHADO, R. T. A. *et al.* *Komagataeibacter rhaeticus* grown in sugarcane molasses-supplemented culture medium as a strategy for enhancing bacterial cellulose production. **Industrial Crops and Products**, v. 122, out. 2018.

MANEERUNG, T.; TOKURA, S.; RUJIRAVANIT, R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 1, abr. 2008.

MANOUKIAN, O. S. *et al.* Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Em: **Encyclopedia of Biomedical Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2019.

MATEI, C. *et al.* Calcium carbonate as silver carrier in composite materials obtained in green seaweed extract with topical applications. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 93, n. 2, 4 fev. 2019.

MATHEUS, J. R. V. *et al.* Filmes biodegradáveis e agentes de reforço vegetais: Um enfoque em estudos brasileiros sob a ótica da economia circular. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e49210918278, 31 jul. 2021.

MATTOSO, L. H. C. **Frutas e legumes são matéria-prima de plásticos que protegem alimentos e são comestíveis. Pesquisa FAPESP.** Disponível em: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/ciencia-do-brasil-visivel-no-mundo/>>. Acesso em: 2 jan. 2023.

MCNAMARA, J. T.; MORGAN, J. L. W.; ZIMMER, J. A Molecular Description of Cellulose Biosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, n. 1, 2 jun. 2015.

MEFTAHI, A. *et al.* The effects of cotton gauze coating with microbial cellulose. **Cellulose**, v. 17, n. 1, 21 fev. 2010.

MERABTENE, M. *et al.* Heat sealing evaluation and runnability issues of flexible paper materials in a vertical form fill seal packaging machine. **BioResources**, v. 17, n. 1, p. 223–242, 15 nov. 2021.

MIKKELSEN, D. *et al.* Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 2, ago. 2009.

MOHAMMADKAZEMI, F.; AZIN, M.; ASHORI, A. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, mar. 2015.

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; DRZAL, L. T. (EDS.). **Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites**. [s.l.] CRC Press, 2005.

MOHKAMI, M.; TALAEIPOUR, M. Investigation of the chemical structure of carboxylated and carboxymethylated fibers from waste paper via XRD and FTIR analysis. **Bioresources**, n. 6, p. 1988–20003, 2014.

MOLINA-RAMÍREZ, C. *et al.* Effect of Different Carbon Sources on Bacterial Nanocellulose Production and Structure Using the Low pH Resistant Strain *Komagataeibacter Medellinensis*. **Materials**, v. 10, n. 6, 11 jun. 2017.

MOON, S.-H. *et al.* Comparisons of physical properties of bacterial celluloses produced in different culture conditions using saccharified food wastes. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 11, n. 1, fev. 2006.

NAKAYAMA, A. *et al.* High Mechanical Strength Double-Network Hydrogel with Bacterial Cellulose. **Advanced Functional Materials**, v. 14, n. 11, nov. 2004.

NASCIMENTO, E. S. DO. **Filmes nanocompósitos à base de celulose bacteriana e nanocristais de celulose**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2018.

NORO, N.; SUGANO, Y.; SHODA, M. Utilization of the buffering capacity of corn steep liquor in bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 199–205, 1 abr. 2004.

PACHECO, G. *et al.* Development and characterization of bacterial cellulose produced by cashew tree residues as alternative carbon source. **Industrial Crops and Products**, v. 107, nov. 2017.

PADMANABHAN, S. K. *et al.* Sustainable Production of Stiff and Crystalline Bacterial Cellulose from Orange Peel Extract. **Sustainability**, v. 14, n. 4, 16 fev. 2022.

PASSOS, M. **Valorização biotecnológica do hidrolisado fosfórico de amido de mandioca: produção de biomassa e astaxantina utilizando a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous***. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2000.

PECORARO, É. *et al.* Bacterial Cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: Preparation, Properties and Applications. Em: **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. [s.l.] Elsevier, 2007.

PHOTPHISUTTHIPHONG, Y.; VATANYOOPAISARN, S. The Production of Bacterial Cellulose from Organic Low-Grade Rice. **Current Research in Nutrition and Food Science Journal**, v. 8, n. 1, 30 abr. 2020.

PINTO, A. C. R. D. T. **Caracterização do secretoma de *Aspergillus oryzae* crescido em estado sólido de bagaço de cana**. Brasília: Universidade de Brasília, 2012.

PONTES, B. R. B. **Preparação e caracterização de termoplásticos a partir de amido de arroz**. São Carlos: Universidade de São Paulo, 29 maio 2012.

PRABHAKAR, M. N.; REHMAN SHAH, A. UR; SONG, J.-I. Improved flame-retardant and tensile properties of thermoplastic starch/flax fabric green composites. **Carbohydrate Polymers**, v. 168, jul. 2017.

QUAN, C.; GAO, N.; SONG, Q. Pyrolysis of biomass components in a TGA and a fixed-bed reactor: Thermochemical behaviors, kinetics, and product characterization. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 121, p. 84–92, set. 2016.

RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M.; KUMBHAR, J. V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 6, 11 mar. 2015.

RATHNA PRIYA, T., *et al.* Nutritional and functional properties of coloured rice varieties of South India: a review. **Journal of Ethnic Foods** 6, 11. 2019.

REVIN, V. V. *et al.* Isolation and Characterization of the Strains Producing Bacterial Cellulose. **Microbiology**, 10 jan. 2020. v. 89, n. 1, p. 86–95.

REVIN, Victor *et al.* Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, nov. 2018. v. 49, p. 151–159.

RODOLFO JR., A.; NUNES, L. R.; ORMANJI, W. **Tecnologia do PVC** . 2. ed. [s.l.] Revista e ampliada, 2006. v. 1

RÖMLING, U. Molecular biology of cellulose production in bacteria. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 4, maio 2002.

RUKA, D. R.; SIMON, G. P.; DEAN, K. M. Bacterial Cellulose and its Use in Renewable Composites. Em: **Nanocellulose Polymer Nanocomposites**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. p. 89–130.

RYNGAJŁŁO, M. *et al.* Comparative genomics of the *Komagataeibacter* strains—Efficient bionanocellulose producers. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 5, 26 maio 2019.

SAIBUATONG, O.; PHISALAPHONG, M. Novo aloe vera–bacterial cellulose composite film from biosynthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, jan. 2010.

SALARI, M. *et al.* Preparation and characterization of cellulose nanocrystals from bacterial cellulose produced in sugar beet molasses and cheese whey media. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, fev. 2019.

SASKA, S. *et al.* Bacterial cellulose-collagen nanocomposite for bone tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 41, 2012.

SATO, L. K.; REIS, J. G. M. DOS. Estudo da produção de arroz brasileira e o papel do estado Mato Grosso do Sul. **Agrarian**, v. 13, n. 50, 23 nov. 2020.

SEDERAVIČIŪTĖ, F.; BEKAMPIENĖ, P.; DOMSKIENĖ, J. Effect of pretreatment procedure on properties of Kombucha fermented bacterial cellulose membrane. **Polymer Testing**, v. 78, p. 105941, set. 2019.

SEVERO, M. G.; MORAES, K. DE; RUIZ, W. A. Modificação enzimática da farinha de arroz visando a produção de amido resistente. **Química Nova**, v. 33, n. 2, 2010.

SHAH, N. *et al.* Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, nov. 2013.

SHI, Z. *et al.* Utilization of bacterial cellulose in food. **Food Hydrocolloids**, v. 35, mar. 2014.

SHULER, M. L.; KARGI, FIKRET. **Bioprocess Engineering Basic Concepts**. 2. ed. Upper Saddle River: [s.n.], 2002.

SILVA, VANESSA KARLA. **Extrato de Levedura (*Saccharomyces Cerevisiae*) e Prebiótico na Dieta Pré-Inicial Para Frangos de Corte Criados em Diferentes Temperaturas**. Jaboticabal. São Paulo: Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, 2006.

SILVA, T. R. S. DA. **Desenvolvimento de hidrogéis de celulose bacteriana para a cultura de células e permeação de biomoléculas**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

SILVA, M. G. **Produção de Nanocompósitos de Celulose Bacteriana/Fe Para Degradação de Solução de Corantes Têxteis Por Processos Oxidativos Avançados**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2022.

SILVA, M. L. T.; BRINQUES, G. B.; GURAK, P. D. Desenvolvimento e caracterização de bioplásticos de amido de milho contendo farinha de subproduto de broto. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, 2020.

SILVA, S. M. F. **Filmes compósitos de celulose bacteriana e goma de cajueiro para aplicação em alimentos**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2018.

SINGH, H. *et al.* Influence of heat–moisture treatment and annealing on functional properties of sorghum starch. **Food Research International**, v. 44, n. 9, nov. 2011.

SKOČAJ, M. Bacterial nanocellulose in papermaking. **Cellulose**, v. 26, n. 11, 14 jul. 2019.

SOUZA, K. C. DE *et al.* Kinetic Study of a Bacterial Cellulose Production by *Komagataeibacter Rhaeticus* Using Coffee Grounds and Sugarcane Molasses. **Materials Research**, v. 24, n. 3, 2021.

SOUZA, K. CARVALHO DE *et al.* **Meio De Cultura À Base de Sais e Fonte de Carbono Simples Para Produção de Celulose Bacteriana e Usos**. Brasil, 2020.

STUMPF, T. R. *et al.* In situ and ex situ modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 82, jan. 2018.

SUGIHARTO, S. A review of filamentous fungi in broiler production. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 64, n. 1, jun. 2019.

TANG, W. *et al.* The influence of fermentation conditions and post-treatment methods on porosity of bacterial cellulose membrane. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 1, 20 jan. 2010.

THE INTERNATIONAL GENETICALLY ENGINEERED MACHINE (IGEM). **Choice of organism**. Disponível em: <<http://2018.igem.org/Team:DTU-Denmark/Results-choosing-organism>>. Acesso em: 19 set. 2021.

TÔRRES, Y. J. S. S. **Estudo da Hidrólise Enzimática do Amido do Mesocarpo de Babaçu**. São Luís - Ma: Universidade Federal Do Maranhão, 2014.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. ; C. C. L. **Microbiologia** . [s.l: s.n.].

TRACHE, D. *et al.* Recent progress in cellulose nanocrystals: sources and production. **Nanoscale**, v. 9, n. 5, 2017.

TROVATTI, E. *et al.* Gluconacetobacter sacchari: An efficient bacterial cellulose cell-factory. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, ago. 2011.

TSOUKO, E. *et al.* Bacterial Cellulose Production from Industrial Waste and by-Product Streams. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, 1 jul. 2015.

TURECK, B. C. *et al.* Obtaining and characterization of bacterial cellulose synthesized by Komagataeibacter hansenii from alternative sources of nitrogen and carbon. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 26, n. 4, 2021.

TURINI, C. DA S. *et al.* Enzymatic hydrolysis of carbohydrates in by-products of processed rice. **Ciência Rural**, v. 51, n. 11, 2021.

TYAGI, N.; SURESH, S. Production of cellulose from sugarcane molasses using Gluconacetobacter intermedius SNT-1: optimization & characterization. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, jan. 2016.

UL-ISLAM, M. *et al.* Production of bacterial cellulose from alternative cheap and waste resources: A step for cost reduction with positive environmental aspects. **Korean Journal of Chemical Engineering**, 2 jun. 2020. v. 37, n. 6, p. 925–937.

URBINA, L. *et al.* By-products of the cider production: an alternative source of nutrients to produce bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 24, n. 5, 29 maio 2017.

UZYOL, H. K.; SAÇAN, M. T. Bacterial cellulose production by Komagataeibacter hansenii using algae-based glucose. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 12, 16 abr. 2017.

V. GADHAVE, R.; MAHANWAR, P. A.; GADEKAR, P. T. Starch-Based Adhesives for Wood/Wood Composite Bonding: Review. **Open Journal of Polymer Chemistry**, v. 07, n. 02, 2017.

VARGAS, F. *et al.* Cellulosic Pulps Of Cereal Straws As Raw Material For The Manufacture Of Ecological Packaging. **Bioresources**, v. 7, n. 3, p. 4161–4170, 2012.

VASCONCELOS, G. M. D. DE *et al.* Produção e caracterização de celulose pela *Gluconoacetobacter hansenii* em meio contendo glicose ou manitol. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 25, n. 4, 2020.

VAZQUEZ, A. *et al.* Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by *Gluconoacetobacter xylinus*. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 2, 7 jun. 2013.

VIEIRA, D. A. DE P.; FERNANDES, N. C. DE A. Q. **Microbiologia Geral**. Inhumas: [s.n.]. v. 1, 2012.

VÍTOR, L. A. D. **A Eficiência da Hidrólise do Amido de Mandioca (Manihot Esculenta Crantz), em Diferentes Tempos de Ações Enzimáticas, Visando A Produção de Etanol**. Palmas (TO): Universidade Federal do Tocantins, 2018.

VITTA, SATISH.; THIRUVENGADAM, VIJAYABASKARAN. Multifunctional bacterial cellulose and nanoparticle-embedded composites. **Current science**, n. 102, p. 1398–1405, 2012.

VOON, W. W. Y. *et al.* Bio-cellulose Production by *Beijerinckia fluminensis* WAUPM53 and *Gluconoacetobacter xylinus* 0416 in Sago By-product Medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, n. 1, 19 jan. 2019.

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

WEI, C. *et al.* Electrothermochromic paper fabricated by depositing polypyrrole on one side. **Cellulose**, v. 24, n. 11, 2 nov. 2017.

WÖSTEN, H. A. B. Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 59, out. 2019.

WU, S.-C.; LI, M.-H. Production of bacterial cellulose membranes in a modified airlift bioreactor by *Gluconoacetobacter xylinus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 4, out. 2015.

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

XIAO, X. *et al.* Classification and analysis of corn steep liquor by UPLC/Q-TOF MS and HPLC. **Talanta**, v. 107, mar. 2013.

XU, Y. *et al.* Biosynthetic strategies to produce xylitol: an economical venture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 13, 17 jul. 2019.

YAMADA, Y. *et al.* Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 58, n. 5, 2012.

YAN, Z. *et al.* Biosynthesis of bacterial cellulose/multi-walled carbon nanotubes in agitated culture. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, nov. 2008.

YANG, Y. K. *et al.* Cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 under agitated condition. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 3, p. 312–317, jan. 1998.

YBÁ - DESIGN E PESQUISA. **Criando embalagens com fibra de coco**. Disponível em: <<http://www.amenidadesdodesign.com.br/2013/04/botia-criando-com-fibra-de-coco.html>>. Acesso em: 14 dez. 2022.

YONEMOTO, P. G.; CALORI-DOMINGUES, M. A.; FRANCO, C. M. L. Efeito do tamanho dos grânulos nas características estruturais e físico-químicas do amido de trigo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, dez. 2007.

YOON, S. H. *et al.* Electrically Conductive Bacterial Cellulose by Incorporation of Carbon Nanotubes. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 4, 1 abr. 2006.

YOUSEFI, H. *et al.* Comparative study of paper and nanopaper properties prepared from bacterial cellulose nanofibers and fibers/ground cellulose nanofibers of canola straw. **Industrial Crops and Products**, v. 43, maio 2013.

YOUSSEF, A. M.; EL-SAMAHY, M. A.; ABDEL REHIM, M. H. Preparation of conductive paper composites based on natural cellulosic fibers for packaging applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1027–1032, ago. 2012.

YU, L.; DEAN, K.; LI, L. Polymer blends and composites from renewable resources. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 6, jun. 2006.

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

ZMEJKOSKI, D. *et al.* Bacterial cellulose-lignin composite hydrogel as a promising agent in chronic wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, out. 2018.

APÊNDICE A



Article

Polymers and
Polymer Composites

Production of bacterial cellulose biopolymers in media containing rice and corn hydrolysate as carbon sources

Polymers and Polymer Composites
2021, Vol. 29(9) 5146-51474
© The Author(s) 2021
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/09673912211059706
journals.sagepub.com/home/ppc

Karina C de Souza¹, Gabriela R dos Santos¹, Felipe CS Trindade¹,
Andréa Fernanda de S Costa^{2,3}, Yeda MB de Almeida¹, Leonie A Sarubbo^{3,4} and
Glória M Vinhas¹

Abstract

Bacterial cellulose (BC) is a promising option for ecologically viable processes. In this work, BC was produced using starch hydrolysate (rice and corn flakes) as carbon sources. The starch was hydrolyzed by fungus for glucose production. A maximum yield of 2.80 ± 0.43 g/L of BC was obtained with the hydrolyzed rice medium. Moreover, BC produced in the rice and corn media had crystallinity of around 50%. Fourier-transform infrared spectrometry confirmed the functional groups in BC as well as the absence of contaminants from production process. The thermogravimetric analysis revealed that the polymers formed with alternative media had greater thermal stability. Scanning electron microscopy revealed a morphological structure with the random arrangement of nanofibrils in a non-uniform manner distributed in the weave of both polymeric films. The biofilms produced in different media had similar properties to those of films obtained with a conventional medium, revealing that the polymeric characteristics are not modified.

Keywords

Bacterial cellulose, *Komagataelbacter rhaeticus*, rice, corn

Received 24 March 2021; accepted 17 October 2021

Introduction

Bacterial cellulose (BC) is a biodegradable, non-toxic polysaccharide with considerable liquid retention capacity and important properties for applications in the medical field and tissue engineering.¹⁻³ This biopolymer has similar characteristics to cellulose polymer of a vegetable origin, but it differs in terms of the degree of polymerization and purity and has more stable, resistant nanofibers with an ultra-fine reticular structure, high crystallinity, tensile strength, elasticity, and durability.^{4,5}

Cellulose can be produced by algae, fungi, protozoa, and prokaryotic organisms.⁶ Among the producers of BC, bacteria of the genus *Komagataelbacter* (recently reclassified from the genus *Gluconacetobacter* based on the phylogenetic, phenotypic, ecological, and chemotaxonomic characteristics of the 16S rRNA sequence) are gaining prominence in the production of this biopolymer of considerable scientific value.^{7,8} The production of pure cellulose nanofibrils by bacteria of the genus *Komagataelbacter* occurs through the consumption of glucose in the medium, which is metabolized into cellulose by the microorganisms.⁹ Glucose can be obtained from different sources; it may be a free sugar or may be obtained through the hydrolysis of polysaccharides, such as starch. In the microbial hydrolysis of starch, filamentous fungi are the most adaptable to growth on solid substrates, can grow in environments with low humidity, and have high enzymatic activity for the hydrolysis of starch in glucose molecules.¹⁰⁻¹³

During the metabolic process, the components of the medium are assimilated by the microorganisms either through degradation or polymerization, resulting in the synthesis of specific metabolites. This metabolic process requires carbon, hydrogen, oxygen, nitrogen, and elements such as iron and zinc, which can be found in various agro-industrial byproducts.

¹Center for Exact and Natural Sciences, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil

²Agreste Region Academic Center, Federal University of Pernambuco (UFPE/CAA), Caruaru, Pernambuco, Brazil

³Advanced Institute of Technology and Innovation (IATI), Recife, Pernambuco, Brazil

⁴Catholic University of Pernambuco (UNICAP), Recife, Pernambuco, Brazil

Corresponding author:

Glória M Vinhas, Center for Exact and Natural Sciences, Federal University of Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, Recife, Pernambuco 50740-540, Brazil.

Email: gloria.vinhas@ufpe.br



Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review

Julia Didier Pedrosa de Amorim¹ · Karina Carvalho de Souza¹ · Cybelle Rodrigues Duarte¹ · Izabelle da Silva Duarte¹ · Francisco de Assis Sales Ribeiro¹ · Gislaine Santos Silva¹ · Patrícia Maria Albuquerque de Farias¹ · Andreas Stingl¹ · Andrea Fernanda Santana Costa^{2,3} · Glória Maria Vinhas¹ · Leonie Asfora Sarubbo^{3,4}

Received: 16 January 2020 / Accepted: 10 March 2020
 © Springer Nature Switzerland AG 2020

Abstract

Cellulose is the main structural component of plant cell walls. Cellulose is a fibrous, water-insoluble substance and is considered to be the most abundant bio-derived polymer on earth. From an industrial perspective, plant cellulose has been the mainstay of the wood industries for the past 100 years. The hierarchical organization and semicrystalline nature of cellulose found in plant fibers allows the extraction of nanofibers and nanocrystals using mechanical and chemical top-down de-structuring strategies. Bacterial cellulose has also been increasingly investigated. Bacterial cellulose is composed of cellulose nanofibers secreted extracellularly by some bacteria; bacterial cellulose is therefore obtained using bottom-up synthesis. The unique nanofibrillar structure of bacterial cellulose confers excellent physical and mechanical properties such as high porosity, high elastic modulus and high crystallinity. Research on nanocellulose is accelerating due actual fossil fuel issues such as CO₂ emissions, plastic pollution and lack of renewable energy. Nanocellulose materials are non-toxic, biodegradable and recyclable, with no adverse effects on health and the environment. Here, we review cellulose production methods, properties and applications, focusing on the food industry, biomedical materials and electronic devices. We compare vegetal nanocellulose and bacterial cellulose. The increase in the number of publications on nanocellulose is also discussed.

Keywords Nanocellulose · Plant nanocellulose · Bacterial cellulose · Nanomaterials · Biotechnology · Nanotechnology

Introduction

Plants and wood are natural biocomposites consisting of microfibril cellulose. Along with pectin, lignin and hemicellulose, cellulose accounts for 35–50% of the biomass of plants (Rinaldi and Schuth 2009). It is the most abundant polymer on Earth and is non-toxic, making it the strongest candidate for feedstock in the production of natural polymeric materials that can replace petroleum-based polymers, offering the advantages of renewability and biocompatibility (Gama et al. 2012). Cellulose can be used for the production of chemicals and monomers through catalytic processes (Rose and Palkovits 2011), and these monomers can be employed in the production of biopolymers with usefulness in different industries, like oral delivery systems (Javanbakht and Shaabani 2019), food packaging application (Ebrahimi et al. 2019) and photoelectrochemical cells production (Suresh et al. 2019). Indeed, significant progress has been made in the production of

✉ Leonie Asfora Sarubbo
leonie.sarubbo@unicap.br

¹ Centro de Ciências Exatas e Naturais, Departamento de Ciência dos Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Moraes Rêgo, n. 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco CEP: 50670-901, Brazil

² Centro de Comunicação e Design, Centro Acadêmico da Região Agreste, Universidade Federal de Pernambuco, BR 104, Km 59, s/n - Nova Caruaru, Caruaru, Pernambuco CEP: 50670-90, Brazil

³ Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI), Rua Joaquim de Brito, n. 216, Boa Vista, Recife, Pernambuco CEP: 50070-280, Brazil

⁴ Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, Recife, Pernambuco CEP: 50050-900, Brazil



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 012400 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: Brasil

Telefone: (81)2126 8959

Fax: (81)2126 8959

Email: patentes_dine.propesq@ufpe.br