UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica Área de Fermentações

Produção de biofilme (membrana de biocelulose) por Gluconacetobacter xylinus em meio de resíduos de frutas e folhas de chá verde

Versão original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Denise Cristina Moretti Vieira

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientadora:

Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna

São Paulo

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica Área de Fermentações

Produção de biofilme (membrana de biocelulose) por Gluconacetobacter xylinus em meio de resíduos de frutas e folhas de chá verde

Versão original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Denise Cristina Moretti Vieira

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientadora:

Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Vieira, Denise Cristina Moretti

V657p Produção de biofilme (membrana de biocelulose) por Gluconacetobacter xylinus em meio de resíduos de frutas e folhas de chá verde / Denise Cristina Moretti Vieira. -- São Paulo, 2013.

176p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Vessoni Penna, Thereza Christina

1. Microbiologia aplicada I. T. II. Vessoni Penna, Thereza Christina, orientador.

660.6 CDD

Denise Cristina Moretti Vieira

Produção de biofilme (membrana de biocelulose) por Gluconacetobacter xylinus em meio de resíduos de frutas e folhas de chá verde

Comissão Julgadora da

Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna
Orientadora / presidente

1°. examinador

2°. examinador

3°. examinador

4°. examinador

São Paulo, _____ de ____.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, especialmente aos meus pais, Norberto Vieira e Manoela Regina Moretti Vieira, e aos meus irmãos, Daniela Regina Moretti Vieira e Norberto Vieira Júnior.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Thereza Christina Vessoni Penna, pela orientação, pela dedicação e pela amizade.

Aos funcionários e colegas do Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelo apoio e colaboração.

À minha família, pelo apoio, pela colaboração, pela compreensão e pela dedicação.

À Bruna Tavares Gomes Sena, aluna de iniciação científica, pela amizade e pela ajuda nas realizações dos experimentos.

A todas as pessoas, que direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo suporte financeiro para a realização da pesquisa.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro para a realização da pesquisa.

RESUMO

Vieira Denise Cristina Moretti. **Produção de biofilme (membrana de biocelulose)** por *Gluconacetobacter xylinus* em meio de resíduos de frutas e folhas de chá verde. 2013. 176 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A biomembrana, que é uma membrana de celulose bacteriana $(C_6H_{10}O_5)_n$ formada na superfície do meio de cultivo durante a fermentação acética, foi obtida através do cultivo associado de *Gluconacetobacter xylinus* (formalmente *Acetobacter xylinum*) e *Saccharomyces cerevisiae* em meio de folhas de chá verde, resíduos de frutas (abacaxi, mamão, laranja), resíduos de vegetais (beterraba), vinho e colágeno em condições estáticas a 28 ± 2°C de 7 a 30 dias de cultivo. Foi incorporado à biomembrana, extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis*, devido as suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e cicatrizantes.

A espessura, o diâmetro e o peso da biomembrana foram mensurados e foram calculados a produtividade, bem como o fator de conversão de açúcar em celulose. A caracterização da biomembrana foi realizada por *Differential Scanning Calorimetric*, espectroscopia infravermelho, Brunauer–Emmett–Teller, resistência à tração e alongamento, microscopia eletrônica (Escola Politécnica - USP) e difração de raio-X. Através destas análises verificou-se que a biomembrana obtida nos diferentes meios de cultivo é composta por celulose, o tamanho médio dos poros variou de 517,9 a 1582,0 nm, a resistência à tração variou de 0,76 a 4,32 kN/m e o índice de cristalinidade entre 75% e 91%, a espessura da biomembranas variou de 0,16 a 6,38 mm.

Foram realizados 576 experimentos, a maior produtividade (8,23 g de celulose/dia) foi atingida no meio de mamão com suco de laranja (suco de mamão: 50% v/v e suco de laranja: 19% v/v) em 7 dias de cultivo. O maior fator de conversão (2,36 g celulose/g de açúcar) foi obtido no meio de chá verde em 25 dias de cultivo. A adição de 1,5% p/v de colágeno ao meio de chá verde dobrou a massa da biomembrana. A incorporação do extrato de calêndula aumentou a flexibilidade, a cristalinidade e as propriedades mecânicas da biomembrana de chá verde.

Palavras-chave: Celulose; Resíduos de fruta; *Camellia sinensis* (chá verde); *Gluconacetobacter xylinus* e *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Vieira Denise Cristina Moretti. **Biofilm production (biocellulose membrane)**, production by *Gluconacetobacter xylinus* in fruits residues and green tea medium. 2013. 176 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The biomembrane, cellulose membrane $(C_6H_{10}O_5)_n$ formed in medium surface, was obtained from an associate culture *Gluconacetobacter xylinus* (formally *Acetobacter xylinum*) and *Saccharomyces cerevisiae* in green tea leaves, fruit residues (pineapple, papaya, orange), vegetables residues (beet), wine and collagen media in static condition , at 28 ± 2 °C in 7 – 30 days cultivation. The *Calendula officinalis* hydroalcoholic extract was incorporated in the Biomembrane, due to its anti-inflammatory, anti-oxidants and cicatrizing proprieties.

The biomembrane thickness, diameter and weight were measured. The productivity and conversion factor from cellulose to sugar were calculated.

The biomembrane caracterization was performed by Differential Scanning Calorimetric, infrared spectroscopy, Brunauer–Emmett–Teller, resistance to tension, elongation, eletrocnic microscopy and raio-X difraction. In these analyses were verified that biomembrane obtained in different media were composed by cellulose, average porous size varied from 517.9 to 1582.0 nm, the resistance to tension varied from 0.76 to 4.32 kN/m and cristalinity index varied from 75% to 91%. The biomembrane thickness varied from 0,16 to 6,38 mm.

It was performed 596 tests, the highest bacterial cellulose yield (8.23 ± 0.58 g cellulose/day) was obtained in papaya with orange (papaya juice: 50% v/v and orange juice: 19% v/v) in 7 cultivation days. The highest conversion factor (2,36 g cellulose/g sugar) was obtained in green tea medium in 25 days. The addition of 1.5% w/v collagen to the green tea media increased 2 times the biomembrane weight. The biomembrane absorption capacity for water and Marigold hydroalcoholic extract (1:1), were from 1.73 to 22 and, from 1.75 to 24 times dry weight, respectively. The Marigold extract improved the green tea biomembrane flexibility, cristalinity, and physical proprieties.

Keywords: Cellulose; Fruits residues; *Camellia sinensis* (green tea); *Gluconacetobacter xylinus* and *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 . Imagem de <i>G. xylinus</i> (x7000)13					
Figura 2. Via de biossíntese da celulose em A. xylinum a partir da glicose como					
fonte de carbono, conforme proposto por ROSS et al. (1991)14					
Figura 3. Imagens de G. xylinus produzindo celulose. A) Imagem de G. xylinus					
produzindo celulose, B) FESEM imagem de células de G. xylinus produzindo					
nanofibras de celulose acessado em 14 de junho de 2009					
(www.azonano.com/news.asp?newsID=8590)19					
Figura 4. Microscopia ótica da biomembrana de celulose obtida em meio de chá					
verde - Flora microbiana responsável pela produção da BC (G. xylinus e S.					
cerevisiae) com aumento de 10.000 vezes (Autor: Denise Vieira, ano 2010)41					
Figura 5. Medidas do acessório utilizado no teste de punção46					
Figura 6. Biomembrana obtida em meio de chá verde com 100 g/L de sacarose, pH					
inicial: 3,5, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}$ C e					
tempo de cultivo: 10 dias (Autor : Denise Vieira, Ano: 2012)52					
Figura 7. Variação da massa da biomembrana, do fator de conversão de açúcar em					
celulose e da produtividade com o respectivo desvio padrão em função do tempo,					
em meio de chá verde com 100 g/L de sacarose, pH inicial: 3,5 \pm 1, temperatura de					
cultivo: 28 \pm 2°C e volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v)57					
Figura 8. Variação da espessura com o respectivo desvio padrão em função do					
tempo, em meio de chá verde com 100 g/L de sacarose, pH inicial: 3.5 ± 1 ,					
temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}$ C e volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v)58					
Figura 9. Massa da biomembrana, produtividade e fator de conversão de açúcar em					
celulose com os respectivos desvios padrões em função da concentração de					
sacarose, em meio de chá verde, volume de inóculo: 0,150 L (25 $\%$ v/v), pH inicial:					
3.5 ± 1 , temperatura de cultivo: 28 ± 2 °C e tempo de cultivo58					
Figura 10. Espessura da biomembrana com o respectivo desvio padrão em função					
da concentração de sacarose, em meio de chá verde, volume de inóculo: 0,150 L					
(0,25 % v/v), pH inicial: 3,5 \pm 1, temperatura de cultivo: 28 \pm 2°C e tempo de cultivo:					
7 dias 59					

Figura 11. Massa da biomembrana com o respectivo desvio padrão obtida em meio de			
chá verde, utilizando diferentes concentrações de sacarose, em função do tempo, pH			
inicial: 3,5 \pm 1, temperatura de cultivo: 28 \pm 2°C e volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v).			
A) Concentrações de sacarose: 9, 12, 18 e 25 g/L e B) Concentrações de sacarose: 50,			
100 e 128 g/L59			
Figura 12. Produtividade da biomembrana com o respectivo desvio padrão, obtida			
em meio de chá verde, utilizando diferentes concentrações de sacarose em função			
do tempo, pH inicial: 3,5 ± 1, temperatura de cultivo: 28 ± 2°C e volume de inóculo:			
0,150 L (25% v/v). A) Concentrações de sacarose: 9, 12, 18 e 25 g/L e B)			
Concentrações de sacarose: 50, 100 e 128 g/L61			
Figura 13. Fator de conversão de açúcar em celulose, em meio de chá verde,			
utilizando diferentes concentrações de açúcar, em função do tempo, pH inicial:			
$3,5\pm1$, temperatura de cultivo: $28\pm2^{\circ}C$ e volume de inóculo: $0,150$ L (25% v/v). A)			
Concentrações de sacarose: 9, 12, 18 e 25 g/L e B) Concentrações de sacarose:			
50, 100 e 128 g/L62			
Figura 14. Espessura da biomembrana obtida em meio de chá verde e seu			
respectivo desvio padrão, utilizando diferentes concentrações de sacarose, em			
função do tempo, pH inicial: 3.5 ± 1 , temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}$ C e volume de			
inóculo: 0,150 L (25% v/v). A) Concentrações de sacarose: 9, 12, 18 e 25 g/L e B)			
Concentrações de sacarose: 50, 100 e 128 g/L63			
Figura 15. Massa da biomembrana, produtividade e fator de conversão de açúcar			
em celulose com os respectivos desvios padrões, em função da concentração de			
inóculo, em meio de chá verde com 50 g/L de sacarose, pH inicial: 3.5 ± 1 ,			
temperatura de cultivo: 28 ± 2°C e tempo de cultivo: 7 dias64			
Figura 16. Espessura da biomembrana em função da concentração de inóculo, em			
meio de chá verde com 50 g/L de sacarose, pH inicial: 3,5 \pm 1, temperatura de			
cultivo: 28 ± 2°C e tempo de cultivo: 7 dias65			
Figura 17. Massa da biomembrana, produtividade e fator de conversão de açúcar			
com os respectivos desvios padrões em função do pH inicial do meio, em meio de			
chá verde com 50 g/L de sacarose, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v),			
temperatura de cultivo: 28 ± 2°C e tempo de cultivo: 7 dias			

Figura 18. Espessura da biomembrana e seu respectivo desvio padrão em função
do pH inicial do meio, em meio de chá verde com 50 g/L de sacarose, volume de
inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: 28 \pm 2°C e tempo de cultivo: 7
dias66
Figura 19. Biomembrana obtida em meio de abacaxi, 15 dias de cultivo, volume de
inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: 28 \pm 2 °C e pH inicial: 3,5. (Autor:
Denise Vieira, Ano: 2012)67
Figura 20. Biomembrana obtida em meio de mamão com 100 g/L de sacarose, 10
dias de cultivo, pH inicial: 3,5, concentração de suco de laranja: 13%, temperatura
de cultivo: 28 \pm 2°C e volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v).(Autor: Denise Vieira,
Ano: 2012)69
Figura 21. Variação da massa da biomembrana, do fator de conversão de açúcar
em celulose e da produtividade com os respectivos desvios padrões em função do
tempo, em meio de mamão com 100 g/L de sacarose, concentração de suco de
laranja: 13% v/v, pH inicial: 3,5 \pm 1, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v) e
temperatura de cultivo: 28 ± 2°C71
Figura 22. Variação da espessura da biomembrana em função do tempo, em meio
de mamão com 100 g/L de sacarose, pH inicial: 3,5 \pm 1, volume de inóculo: 0,150 L
(25% v/v), concentração de suco de laranja: 13% v/v e temperatura de cultivo: 28 \pm
2°C72
Figura 23. Variação da massa da biomembrana, do fator de conversão de açúcar
em celulose e da produtividade padrões com os respectivos desvios em função da
concentração de suco de laranja, em meio de mamão com 100 g/L de sacarose, pH
inicial: 3,5 \pm 1, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: 28 \pm
2°C e tempo de cultivo: 7 dias73
Figura 24. Variação da espessura da biomembrana com os respectivo desvio
padrão, em função da concentração de suco de laranja em meio de mamão com 100
g/L de sacarose, pH inicial: 3,5 \pm 1, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v),
temperatura de cultivo: 28 ± 2°C e tempo de cultivo: 7 dias74
Figura 25. Biomembrana obtida em meio de colágeno, com concentração de
colágeno de 1,0 % p/v, concentração de sacarose: 100 g/L, pH inicial: 3,5, volume
de inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: 28 \pm 2°C e tempo de cultivo:
10 dias (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)74

Figura 26. Variação da massa da biomembrana com o respectivo desvio padrão, em
função da concentração de colágeno em meio de chá verde, com 50 g/L de
sacarose, pH inicial: 3,5 \pm 1, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura de
cultivo: 28 ± 2°C e tempo de cultivo: 7 dias76
Figura 27. Variação da produtividade da biomembrana com o respectivo desvio
padrão, em função da concentração de colágeno, em meio de chá verde, com 50 g/L
de sacarose, pH inicial: 3,5 \pm 1, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura
de cultivo: 28 ± 2°C e tempo de cultivo: 7 dias77
Figura 28. Variação do fator de conversão da biomembrana com o respectivo desvio
padrão, em função da concentração de colágeno, em meio de chá verde, com 50 g/L
de sacarose, pH inicial: 3,5 \pm 1, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura
de cultivo: 28 ± 2°C e tempo de cultivo: 7 dias78
Figura 29. Variação da espessura da biomembrana com o respectivo desvio padrão,
em função da concentração de colágeno em meio de chá, com 50 g/L de sacarose,
pH inicial: 3,5 \pm 1, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: 28 \pm
2°C e tempo de cultivo: 7 dias78
Figura 30. Biomembrana obtida em meio de manitol com chá verde, em 15 dias de
cultivo (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)79
Figura 31. Biomembrana obtida em meio de vinho com 100 g/L de sacarose, pH
inicial: 3,5, concentração de vinho: 33% v/v , volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v),
temperatura de cultivo: 28 ± 2°C e 15 dias de cultivo.(Autor: Denise Vieira, Ano:
2012)80
Figura 32. Variação da massa da biomembrana, do fator de conversão de açúcar
em celulose e da produtividade e seus respectivos desvios padrões em função do
tempo, em meio de vinho com 100 g/L de sacarose, pH inicial: 3.5 ± 1 , concentração
de vinho 33% v/v, temperatura de cultivo: 28 \pm 2°C e volume de inóculo: 0,150 L
(25% v/v)82
Figura 33. Variação da espessura da biomembrana e seu respectivo desvio padrão
em função do tempo, em meio de vinho com 100 g/L de sacarose, pH inicial: 3.5 ± 1.0
concentração de vinho 33% v/v, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v) e temperatura
de cultivo: 28 ± 2°C

Figura 34. Variação da massa da biomembrana, do fator de conversão de açúcar				
em celulose e da produtividade com os respetivos desvios padrões em função da				
concentração de vinho, em meio de vinho, concentração de açúcar: 50 g/L, pH				
inicial: 3,5 ± 1, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/) e tempo de cultivo: 7 dias83				
Figura 35. Variação da espessura da biomembrana com o respectivo desvio padrão,				
em meio de vinho com 50 g/L de sacarose, pH inicial: 3,5 ± 1, volume de inóculo:				
0,150 L (25% v/v) temperatura de cultivo: 28 ± 2°C e tempo de cultivo: 7 dias84				
Figura 36. Biomembrana obtida em meio de laranja com 100 g/L de sacarose, pH				
inicial: 3,5, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: 28 ± 2°C e				
10 dias de cultivo.(Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)85				
Figura 37. Variação da massa da biomembrana, do fator de conversão de açúcar				
em celulose e da produtividade com os respectivos desvios padrões em função do				
tempo, em meio de laranja com 100 g/L de celulose, pH inicial: 3,5 ± 1, concentração				
de suco de laranja: 15% v/v, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v) e temperatura de				
cultivo: 28 ± 2°C85				
Figura 38. Variação da espessura da biomembrana com o respectivo desvio padrão				
em função do tempo, em meio de laranja com 100 g/L de sacarose, pH inicial: 3,5 ±				
1, concentração de suco de laranja: 15% v/v, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v)				
e temperatura de cultivo: 28 ± 2°C87				
Figura 39. Variação da massa da biomembrana, do fator de conversão de açúcar				
em celulose e da produtividade com os respectivos desvios padrões em função da				
concentração de suco de laranja, em meio de laranja com 50 g/L de sacarose, pH				
inicial: 3,5 \pm 1, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: 28 \pm				
2°C e tempo de cultivo: 7 dias88				
Figura 40. Variação da espessura da biomembrana com o respectivo desvio padrão				
em função da concentração de suco de laranja, em meio de laranja com 50 g/L de				
sacarose, pH inicial: 3,5 ± 1, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura de				
cultivo: 28 ± 2°C e tempo de cultivo: 7 dias88				
Figura 41. Biomembrana obtida em meio de beterraba (concentração de suco de				
beterraba equivalente a 9 g/L de sacarose), pH inicial: 3,5, volume de inóculo: 0,150				
L (25% v/v), temperatura de cultivo: 28 ± 2°C e tempo de cultivo: 15 dias.(Autor:				
Denise Vieira, Ano: 2012)89				

Figura 42. Variação da massa da biomembrana com o respectivo desvio padrão em
função do tempo, em meio de beterraba com concentração de suco de beterraba
equivalente a 9 g/L e 18 g/L de sacarose, pH inicial: $3,5 \pm 1$, volume de inóculo:
0,150 L (25% v/v) e temperatura de cultivo: 28 ± 2°C91
Figura 43. Produtividade da biomembrana com o respectivo desvio padrão em
função do tempo, em meio de beterraba com concentração de suco de beterraba
equivalente a 9 g/L e 18 g/L de sacarose, pH inicial: $3,5 \pm 1$, volume de inóculo:
0,150 L (25% v/v) e temperatura de cultivo: 28 ± 2°C92
Figura 44. Fator de conversão com o respectivo desvio padrão em função do tempo,
em meio de beterraba com concentração de suco de beterraba equivalente a 9 g/L e
18 g/L de sacarose, pH inicial: 3,5 \pm 1, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v) e
temperatura de cultivo: 28 ± 2°C93
Figura 45. Espessura da biomembrana com o respectivo desvio padrão em função
do tempo, em meio de beterraba com concentração de suco de beterraba
equivalente a 9 g/L e 18 g/L de sacarose, pH inicial: 3.5 ± 1 , volume de inóculo:
0,150 L (25% v/v) e temperatura de cultivo: 28 \pm 2°C94
Figura 46. Variação da massa da biomembrana, da produtividade e do fator de
conversão com os respectivos desvios padrões em função da concentração de suco
beterraba equivalente à sacarose; pH inicial: 3.5 ± 1 , volume de inóculo: 0.150 L (25)
% v/v), temperatura de cultivo: 28 \pm 2°C e tempo de cultivo: 10 dias94
Figura 47. Variação da espessura da biomembrana em função da concentração de
suco beterraba equivalente à sacarose, pH inicial: 3.5 ± 1 , volume de inóculo: 0.150
L (25% v/v), temperatura de cultivo: 28 \pm 2°C e tempo de cultivo: 10 dias95
Figura 48. Representação da deformação sofrida pela amostra durante o teste de
punção
Figura 49. Microscopia eletrônica de varredura da biomembrana obtida em meio de
colágeno (concentração de colágeno: 1,2% p/v e concentração de sacarose: 50 g/L),
aumento 20.000 X (A) e aumento 5.000 X (B). (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)107
Figura 50. Microscopia eletrônica de varredura da biomembrana obtida em meio de
beterraba (concentração de suco de beterraba: equivalente a 18 g/L de açúcar),
aumento 30.000 X (A) e (B). (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)108

Figura 51. Microscopia eletrônica de varredura da biomembrana obtida em meio de				
mamão (concentração de suco de mamão: 50% v/v, concentração de suco de				
laranja: 19% v/v, concentração de chá verde: 31% v/v e concentração de sacarose:				
50 g/L), aumento 30.000 X (A) e (B). (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)108				
Figura 52. Microscopia eletrônica de varredura da biomembrana obtida em meio de				
vinho (concentração de vinho: 33% v/v, água destilada: 33% v/v, concentração de				
chá verde: 34% v/v e concentração de sacarose: 50 g/L), aumento 1.000 X (A) e				
aumento 5.000 X(B). (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)109				
Figura 53. Microscopia eletrônica de varredura da biomembrana obtida em meio de				
chá verde (concentração de sacarose: 50 g/L), aumento 30.000 X (A) e aumento				
10.000 X(B). (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)109				
Figura 54. Microscopia eletrônica de varredura da biomembrana obtida em meio de				
laranja (concentração de suco de laranja: 25% v/v, concentração de chá verde 75%				
v/v e concentração de sacarose: 50 g/L), aumento 30.000 X (A) e aumento 10.000 X				
(B). (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)110				
Figura 55. Espectroscopia (FTIR) da biomembrana obtida nos diferentes meios de				
cultivo				
Figura 56. Volume do poro em função do diâmetro dos poros da biomembrana				
obtida em meio de chá verde (análise BET)113				
Figura 57. Microscopia eletrônica das biomembranas obtidas em diferentes meios				
de cultivo (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)115				
Figura 58. Curvas de DSC da biomembrana de celulose obtida nos diferentes meios				
de cultivo (A e B: biomembrana obtida em meio de chá verde, C: biomembrana				
obtida em meio de mamão, D: biomembrana obtida em meio de laranja, E:				
biomembrana obtida em meio de beterraba, F: biomembrana obtida em meio de				
vinho e G: biomembrana obtida em meio de chá verde com calêndula)117				
Figura 59. Espectro da difração de Raio-X das biomembranas nos diferentes meios				
de cultivo121				

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Microrganismos produtores de celulose bacteriana12
Tabela 2. Composição meios de cultivos
Tabela 3. Dados dos cultivos realizados em meio de abacaxi com os respectivos
desvios padrões62
Tabela 4. Dados dos cultivos realizados em meio de mamão com os respectivos
desvios padrões70
Tabela 5. Dados dos cultivos realizados em meio de colágeno com os respectivos
desvios padrões75
Tabela 6. Dados dos cultivos realizado em meio de vinho com os respectivos
desvios padrões81
Tabela 7. Dados dos cultivos realizados em meio de laranja com os respectivos
desvios padrões86
Tabela 8. Dados dos cultivos realizados em meio de beterraba com os respectivos
desvios padrões90
Tabela 9. Capacidade de Absorção de Água (CAA), Calêndula (CAC) e de
Transferência (CT) de calêndula da biomembrana de celulose obtida nos diferentes
meios de cultivo99
Tabela 10. Força máxima, distância, área e módulo de elasticidade à punção da
biomembrana obtida nos diferentes meios de cultivo103
Tabela 11. Resistência à tração (média e desvios padrão) e TEA da biomembrana
obtida nos diferentes meios de cultivo
Tabela 12. Porcentagem de alongamento com as respectivas médias e desvios
padrões da biomembrana obtida nos diferentes meios de cultivo106
Tabela 13. Média do tamanho dos poros das biomembranas obtidas em diferentes
meios de cultivo114
Tabela 14. Picos endotérmicos das biomembranas obtidas nos diferentes meios de
cultivo120
Tabela 15. Picos endotérmicos das biomembranas obtidas nos diferentes meios de
cultivo

Tabela 16. Custo do meio de cultivo de chá verde utilizado para obter a
biomembrana de celulose125
Tabela 17. Custo do meio de cultivo de beterraba (concentração de suco de
beterraba equivalente a 18 g/L de sacarose) utilizado para obter a biomembrana de
celulose126
Tabela 18. Custo do meio de cultivo de mamão (concentração de suco de mamão
33% v/v, 17% v/v de suco de laranja) utilizado para obter a biomembrana de
celulose127
Tabela 19. Custo do meio de cultivo de laranja (concentração de suco de laranja
15% v/v) utilizado para obter a biomembrana de celulose128
Tabela 20. Custo do meio de cultivo de vinho (concentração de vinho 33% v/v)
utilizado para obter a biomembrana de celulose129
Tabela 21. Custo do meio de cultivo de colágeno 1,2 p/v utilizado para obter a
biomembrana de celulose130

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

a.C.: Antes de Cristo.

ADP: Adenosina difosfato.

AR: Área da secção retangular da amostra.

A_{sc}: Área sobre a curva.ATP: Adenosina trifosfato.A. xylinum: Acetobacter xylinum.

b: Largura do pico em uma fase específica (hkl).

BCA: Membrana de celulose bacteriana modificada com aloe vera.

Bcs: Bacterial cellulose synthesis (celulose bacteriana sintase)

BCG: Mycobacterium Bovis.

BET: Brunauer-Emmett-Teller.

Biomembrana: Membrana ou película que se desenvolve na superfície do meio de

cultivo, durante a fermentação acética. Também chamada de

celulose bacteriana, membrana de celulose e mãe do vinagre.

CAA: Capacidade de Absorção de Água.

CAC: Capacidade de Absorção de Calêndula.

CB: Celulose bacteriana.

Cd: Peso da biomembrana seca.

CEAGESP: Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo.

Ch: Peso da biomembrana com calêndula.

cm: Centímetro.

CMC: Carboximetilcelulose.

CT: Capacidade de transferência da calêndula.

D: Deslocamento máximo do filme.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

DSC: Differential Scanning Calorimetric (varredura calorimétrica diferencial).

ECM: Matriz extracelular.

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

EPS: Exopolissacarídeos. e-PTFE: Politetrafluoretileno.

F: Força.

FTIR: Espectroscopia infravermelho.

g: Grama.

G. xylinus: Gluconacetobacter xylinus.

c-di-GMP: Guanosina monofosfato.

GTP: Guanosina trifosfato.

G1P: Glicose-1-fosfato.
G6P: Glicose-6-fosfato.

GYP: Meio de cultivo de glicose, extrato de levedura e peptona.

h: Ângulo central do pico.

HBO: Oxigênio hiperbárico .

HS: Hestrin schramm medium (meio hestrin schramm).

lam: Intensidade basal a 2θ.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

IL-1: Interleucina 1.

Intensidade máxima do pico a 2θ.

IPT: Instituto de Pesquisas Tecnológica.

J/m²: Joule/metro quadrado.

Kg: Quilo.

kN/m: Quilonewton /metro.

Kv: Quilovolt.

L: Litro.

Lo: Comprimento original da amostra.

MEV: Microscopia eletrônica de varredura.

mL: Mililitro.

mm: Milímetro.

mm^{2:} Milímetro quadrado.

MOV: Mãe do vinagre.

mPa: Megapascal.

 μ m: Micrômetro.

nm: Nanômetro.

N₀: Número de bactérias no tempo 0.

N_t: Número de bactérias no tempo t.

PIB: Produto Interno Bruto.

PPi: Pirofosfato.

p/v: Peso/volume.

Q.S.P: Quantidade suficiente para.

r: Raio.

RNA: Ácido ribonucleico.

RTG: Regeneração tecidual guiada.

s: Segundo.

S. cerevisiae: Saccharomyces cerevisiae.

SCOBY: Cultura Simbiótica de Bactéria e Levedura.

TEA: Tensile energy absorbed (energia de tensão absorvida).

TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-acetato.

TPR: Tetratric peptide repeat (peptideo de repetição tetrátrico).

UDP-glicose: Uridina difosfato glicose.

USP: Universidade de São Paulo.

UTP: Uridina trifosfato. v/v: Volume/volume.

VS: Versus.

Wd: Peso da biomembrana seca.

Wh: Peso da biomembrana hidratada.

W1a: Peso da membrana com calêndula antes da transferência.W1b: Peso da membrana com calêndula após a transferência.

Símbolos

α: Constante relativa ao tempo de geração.

ΔEpunc: Energia de punção.

 ΔI : Incremento no seu raio.

 ϵ_p : Deformação à punção.

 σ_{punc} : Tensão de punção.

SUMÁRIO

I١	NTRO	DUÇÃO	1
1	. RE	VISÃO	6
	1.1	Celulose bacteriana (CB)	6
	1.2	Produção de CB	9
	1.3	Usos da membrana de celulose	20
	1.4	Uso dos resíduos	27
	1.5	Chá verde (Camellia sinensis)	30
	1.6	Laranja (Citrus sinensis)	30
	1.7	Mamão (Carica papaya)	32
	1.8	Beterraba (Beta vulgaris)	33
	1.9	Colágeno	34
	1.10	Calêndula	35
	1.11	Produção de vinho e vinagre	38
2	ОВ	JETIVOS	39
	2.1	Objetivo geral	39
	2.2	Objetivos específicos	39
3	RA	CIONAL e JUSTICATIVA	39
4	MA	TERIAL E MÉTODOS	40
	4.1	Microrganismo / inóculo	40
	4.1	.1 Produção do inóculo: cultura mista	41
	4.1	.2 Produção do inóculo: vinagre forte	42
	4.2	Meio de cultivo	42
	4.3	Condições operacionais	44
	4.4	Caracterização da película de celulose	45
	4.5	Descarte do material	50
	4.6	Forma de análise dos resultados	50
5	RE	SULTADOS E DISCUSSÃO	51
	5.1	Meio de cultivo de chá verde (Camellia sinensis)	52
	5.2	Meio de cultivo de abacaxi (Ananas comosus)	67
	5.3	Meio de cultivo de mamão (Carica papaya)	69
	5.4	Meio de cultivo de chá com adição de colágeno	74
	5.5	Meio de cultivo de manitol com chá verde	79

5.6	Meio de cultivo de vinho	80
5.7	Meio de cultivo de laranja (Citrus sinensis)	84
5.8	Meio de cultivo de beterraba	89
5.9 biome	Massa da biomembrana, espessura, produtividade e fator de conve embrana de celulose obtida nos diferentes meios de cultivo	
	Capacidade de Absorção de Água (CAA), Calêndula (CAC) e Capa ansferência (CT)	
5.11	Propriedades mecânicas	102
5.1	1.1 Teste de punção	102
5.1	1.2 Teste de tração e alongamento	105
5.12	Microscopia eletrônica de varredura	107
5.13	Espectroscopia – FTIR	111
5.14	Porosidade	113
5.15	DSC	117
5.16	Difração de Raio-X	121
5.17	Análise de custo	125
6 CO	NCLUSÃO	131
7 RE	FERÊNCIAS	132
ANEXC	DS .	
Cellulos Green t	igo: VIEIRA, D.C.M; SENNA, B. T.G; ISHII, M.; PENNA, T.C.V se production by <i>Acetobacter xylinum</i> and Saccharomyces ceretea and/or fruits and vegetable juice medium. Asian Journal Pharm Science, v3, i. 2, p. 660-668	e <i>visiae</i> in aceutical
2 – Dec	claração sobre a aprovação do comitê de ética	154

INTRODUÇÃO

A celulose ($C_6H_{10}O_5$)_n é um dos mais abundantes biopolímeros encontrados na natureza. A celulose é de grande interesse para a ciência dos materiais, por ter grande potencial, como material de reforçol. É um polissacarideo composto por cadeias lineares não ramificadas, formadas pela união de moléculas de β -glicose (uma hexosana), através de ligações β -1,4-glicosídicas, cuja unidade estrutural de repetição é a celobiose, que é composta por duas moléculas de glicose (BOBBIO e BOBBIO, 2001). A celulose foi primeiramente caracterizada pelo químico francês Anselme Payen, em 1838.

O aumento de demanda gerou a necessidade de se buscar outras fontes de celulose, além da vegetal, para minimizar os danos ao meio ambiente. Pesquisas têm sido desenvolvidas, visando à produção de celulose de origem bacteriana, a partir de resíduos de alimentos e agroindustriais, devido à composição nutritiva que estes resíduos apresentam.

Os polissacarídeos microbianos, como a celulose, podem ser produzidos em condições controladas, a partir de espécies selecionadas de microrganismos, o que evita a variação da estrutura. A busca por novos microrganismos, que sejam capazes de produzir polissacarídeos de interesse econômico e em grandes quantidades, tem sido um desafio enfrentado por grupos de pesquisa de vários países, como Japão, EUA, Canadá, França e Brasil. Embora essa área de pesquisa tenha avançado muito nos últimos tempos, poucos microrganismos produtores de biopolímeros, com potencial de aplicação industrial, foram estudados (SOUZA e GARCIA-CRUZ, 2004).

A celulose de origem vegetal (proveniente das plantas) e a celulose de origem bacteriana são quimicamente semelhantes (cadeias β -1,4-glicanas), porém diferem quanto ao grau de polimerização, que é de 13.000 a 14.000 resíduos de glicose, na celulose vegetal, e de 2.000 a 6.000 na celulose bacteriana (CB). Os resíduos de glicose na CB formam uma rede reticulada de finas fibrilas, com diâmetro menores ou igual a $1\mu m$, com elevada pureza química (livre de lignina e hemicelulose) e cristalinidade. As microfibras, em forma de fitas, conferem à CB propriedades mecânicas peculiares, como elevada força de tensão, elasticidade, durabilidade, elevada capacidade de retenção e absorção de água. A CB é biodegradável,

biocompatível, e não alergênica (MOON et al., 2006; IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000; KLEMM et al., 2001; KLEMM et al., 2006).

As principais cepas de bactérias que produzem celulose durante o seu crescimento celular são as taxomicamente relacionadas aos gêneros *Acetobacter, Agrobacterium, Pseudomonas, Rhizobium* e *Sarcina*.

Atenção especial tem sido dada à cepa de *Gluconacetobacter xylinus* (formalmente *Acetobacter xylinum*), descrita por Brown, em 1886 (JONAS e FARAH, 1998), e que produz grande quantidade de celulose, na forma de película, na interface da superfície-ar, quando é cultivada em laboratório, sob condições estáticas (SILVA, 2003).

As células de *G. xylinus* podem (I) ser encontradas na superfície de plantas, frutas e flores; (II) constituir a microbiota secundária de material vegetal em decomposição; (III) desenvolver a acidificação de sucos de frutas e bebidas alcoólicas, assim como (IV) produzir uma membrana de celulose na interface arlíquido desses sucos, ou na mistura de vegetais e frutas, em cultura estática. A membrana de celulose tem a função de proteger as células do efeito letal da luz ultravioleta e de outros microrganismos, de aumentar a colonização celular, de manter a umidade, prevenindo a desidratação e facilitando a adesão das células em ambiente aeróbico (SPINOSA, 2002; PACHECO, 2004; SETYAWATI et al., 2009).

A síntese de celulose por *Gluconacetobacter xylinus* ocorre entre a membrana externa e a membrana citoplasmática pela celulose-sintase, que está associada aos poros da superfície bacteriana. Durante o crescimento, as células do *G. xylinus* se juntam com as nanofibrilas de celulose para formar uma película. A faixa ótima de pH para a produção de celulose é de 4 a 7 e a faixa ótima de temperatura para o crescimento e a produção de celulose é de 25 a 30°C (CASTRO et al., 2012).

A membrana de celulose, sintetizada pela bactéria *G. xylinus*, é estudada desde os anos 1960. Na década de 1980, foi desenvolvida uma membrana de celulose pura, microfibrilar, através de um processo fermentativo; desde então, tem sido considerada um material com grande potencial de aplicação. A CB foi primeiramente utilizada como alimento (polpa de coco) pelos indígenas asiáticos. Atualmente, é utilizada como substituta da pele (REBELLO et al., 2001), curativo de feridas cirúrgicas das papilas mamárias de vacas, curativo para cirurgias periodontais (NOVAES JÚNIOR et al., 1993), reconstrução vascular (KLEMM et al., 2001), substituta da dura-máter (MELLO et al., 1996), torniquetes, cobertura de

stent, papéis eletrônicos, aditivo de tintas, fibra alimentar, sobremesas dietéticas, embalagem para alimentos, membrana iônica de ultrafiltração, diafragma de altofalantes, meio de cultura para células mamárias, biocombustível, entre outras aplicações em estudo.

A membrana de celulose, por ser biocompatível, inerte, atóxica, ter estrutura e resistência adequada, ser seletivamente permeável e ter custo acessível, vem sendo amplamente estudada na regeneração tecidual guiada (RTG) *in vivo*. A RTG utiliza o processo de cicatrização natural do organismo, proporcionando resultado mais próximo ao real, e requer uma barreira física, porque, quando ocorre uma lesão tecidual, a área ao redor é gradualmente preenchida por tecido fibroso, impossibilitando o reparo pelo tecido original. Dessa forma, ao se inserir uma membrana junto à lesão, previne-se o crescimento de tecidos fibrosos (TABATA, 2001).

Os curativos de celulose bacteriana têm grande potencial de aplicação, no processo de cicatrização, sendo utilizados em diversas situações, tais como queimaduras superficiais e profundas, dermoabrasões mecânicas ou a *laser*, escaras de decúbito, úlceras de estase venosa e arteriais (KLEMM et al., 2001).

A CB também é um biopolímero promissor para a incorporação de agentes antimicrobianos (CASTRO, 2005; SULEWSKI et al., 1991), devido as suas propriedades, como elevada cristalinidade, adequada resistência à tração, durabilidade, elevada capacidade de absorção e retenção de água, somadas ao fato de ser biodegradável, biocompatível, não tóxica e não alergênica (KLEMM, 2001).

O alto custo das fontes de carbono como manitol e frutose, associado com sua baixa produtividade, limita a produção industrial e a aplicação comercial da CB, uma vez que tornam o custo de produção elevado e praticável somente para produtos com alto valor agregado. Porém, o custo da produção da celulose bacteriana pode ser reduzido, drasticamente, pelo uso de resíduos de alimentos como meio de cultivo (KUROSUMI et al., 2009).

Os meios de cultivo comumente utilizados para a produção de CB por *Gluconacetobacter sp.* são meios nutricionalmente ricos, contendo extrato de levedura e polipeptona (FONTANA et al., 1997; HESTRIN e SCHRAMM, 1954).

O meio sintético tem muitas vantagens em relação ao meio complexo, incluindo melhor controle e monitoramento do processo, mais facilidade de ampliação de escala, e de recuperação e purificação do produto (ZHANG e

GREASHAM, 1999); porém, o meio complexo tem custo mais baixo, o que aumenta a viabilidade econômica da produção de celulose bacteriana por *Gluconacetobacter sp.*

A maior parte das frutas é vendida e consumida como alimento. Porém, são desprezadas as frutas que estão danificadas ou fora do tamanho padrão. Algumas são processadas para fazer geleia, pastas e molhos. Quando as frutas não podem ser consumidas, por causa da sua baixa qualidade, causada pelo mau tempo e por outros desastres naturais, são vendidas por preços baixos ou se tornam resíduos.

O principal destino desses resíduos tem sido o descarte. Só no Brasil, 13 milhões de toneladas de comida/ano são desperdiçadas por supermercados e feiras livres. Na Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), 100 toneladas/dia de frutas e vegetais são desperdiçadas, sendo que entre 30% e 50% destes alimentos ainda estavam em boas condições para o consumo. Estes frutos descartados são abundantes em açúcares, como glicose e frutose, que podem ser bioconvertidos em produtos úteis. Tem sido reportado que as bactérias ácido-acéticas, como *G. xylinus*, podem assimilar vários açúcares e produzir celulose bacteriana. Embora a água de coco seja conhecida por produzir celulose bacteriana, o potencial de outras frutas que podem produzir CB ainda é pouco divulgado (ADEJOYE et al., 2006; BAE e SHODA, 2004; ISHIHARA et al., 2002; VERSCHUREN et al., 2000; KUROSUMI et al., 2009).

A CB pode ser obtida através do chá verde (*Camellia sinensis*), também conhecido como banchá, que é uma das principais bebidas consumidas no extremo Oriente há milhares de anos. É considerado um produto benéfico para a saúde, por conter uma alta porcentagem de polifénois (um potente agente antimicrobiano e antioxidante), catequinas, metilxantinas, magnésio, potássio, ácido fólico e vitaminas (C, K, B1 e B2). Este chá tem potencial de proteger contra doenças cardiovasculares e metabólicas, impede as células saudáveis de se transformarem em células cancerosas e, localmente, tem a habilidade de induzir a apoptose das células cancerosas da boca.

Devido as suas propriedades físicas e químicas a CB pode ser usada como veiculo carreador de fitoterápicos, como a *Calendula officinalis* (Asteraceae),que é uma planta nativa do Egito, sendo cultivada como uma planta ornamental e medicinal desde a Antiguidade. Possui atividade colerética, anti-inflamatória, analgésica, antitumoral, antibacteriana, diurética, cicatrizante, sedativa e

imunomodulatória. O chá das flores da calêndula, quando ingerido, tem efeito antiespasmódico, expectorante e antiabortivo. Externamente, o chá de calêndula é usado para tratar feridas, feridas de câncer e icterícia. As tinturas, os géis, as infusões, os cremes e os unguentos de calêndula são usados mundialmente como anti-inflamatório e cicatrizante para pele e mucosa. A flor da calêndula contém flavonoides, óleos essenciais, sesquiterpenos, triterpenos e saponinas. Os componentes da calêndula com ação anti-inflamatória são: o faradiol (anéis aromáticos A, D e E), o arnidiol e o calenduladiol.

Este trabalho teve como objetivo: a) Obter a biomembrana de celulose a partir de meio de cultivo de folhas de chá verde (banchá), suco (resíduo) de frutas (laranja, mamão e abacaxi) e legume (beterraba), vinho e colágeno, visando reduzir o custo de produção da celulose bacteriana e aproveitar frutas e vegetais que seriam descartados; b) Incorporar extrato hidroalcoólico de calêndula à biomembrana, agregando propriedades cicatrizantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e analgésicas à biomembrana, para sua futura aplicação no tratamento de feridas e queimaduras; c) Avaliar a influência da concentração inicial de açúcar, da adição do suco de fruta e legume ao meio de chá de verde e da concentração inicial de inóculo na massa da biomembrana (g de celulose), na produtividade (g de celulose/dia) e no fator de conversão de açúcar em celulose (g de celulose/g de açúcar); d) Avaliar a influência da adição de colágeno ao meio de chá verde na formação da biomembrana, e) Caracterizar a biomembrana.

1. REVISÃO

1.1 Celulose bacteriana (CB)

A celulose $(C_6H_{10}O_5)_n$ é um homopolissacarídeo neutro de cadeia longa, composto por cadeias lineares, não ramificadas, formadas pela união de moléculas de β -glicose (uma hexosana) através de ligações β -1,4-glicosídicas, cuja unidade estrutural de repetição é a celobiose, formada pela união de duas moléculas de glicose (BOBBIO e BOBBIO, 2001). Cada resíduo de glicose está rotacionado a aproximadamente 180° em relação ao resíduo vizinho. A cadeia glicana pode ter de 2.000 a mais de 25.000 resíduos de glicose. A hidrólise total da celulose produz moléculas de glicose, enquanto que a hidrólise parcial produz moléculas de celobiose A celulose foi primeiramente isolada e caracterizada pelo químico francês Anselme Payen, em 1838 (RAVEN et al., 2001; BROWN et al., 1996).

A celulose é o mais abundante biopolímero encontrado na natureza e de grande importância na economia global (RECOUVREUX et al., 2005). O aumento da demanda gerou a necessidade de buscar outras fontes de celulose, além da fonte vegetal, para minimizar os danos ao meio ambiente. Pesquisas têm sido desenvolvidas, visando à produção de celulose de origem bacteriana, aproveitando os subprodutos e os resíduos de alimentos e agroindustriais. Devido à sua ampla aplicação, a celulose vem sendo caracterizada como uma nova *commodity* bioquímica, tendo importante valor comercial (VANDAMME et al., 1998; SILVA, 2003, RUKA, 2012).

A CB é um produto extracelular, que foi descrito por Louis Pasteur como "uma película gelatinosa e escorregadia". A porção sólida, que é semelhante a um gel, é menor que 1% e é extremamente pura, porque não contém lignina nem outras substâncias misturadas à celulose (IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000).

A CB, também conhecida como mãe do vinagre (película de celulose formada na superfície do meio de cultivo durante a fermentação acética) era usada antigamente na Europa para produção do vinagre. Brown cultivou a película ("planta" ou "mãe" do vinagre), que apareceu na superfície da cerveja, em condições estéreis, e a identificou como tendo constituição química e reatividade semelhante à celulose da parede celular das plantas. Microscopicamente, as bactérias estavam envolvidas em uma estrutura de filme transparente. A espécie de bactéria identificada foi a

mesma encontrada nas frutas e nos vegetais em decomposição (IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000).

A celulose vegetal e a CB são quimicamente semelhantes (cadeias β -1,4 glicanas), mas diferem quanto ao grau de polimerização, 13.000 a 14.000 celulose vegetal e 2.000 a 6.000 CB (JONAS e FARAH, 1998) e quanto ao diâmetro das redes reticuladas, que, na CB, é de aproximadamente 1 centésimo do diâmetro das fibras de celulose de origem vegetal (El-NAGGAR, 2007).

A CB possui estrutura cristalina, microfibrilas em forma de fita (as duas unidades de celobiose estão dispostas em paralelo, conferindo às moléculas de celulose uma orientação plana) e o diâmetro das redes reticuladas são menores que 100 Angstroms. Estas características conferem à CB propriedades peculiares, como: elevada pureza química (livre de lignina e hemicelulose), alta força de tensão, elevada cristalinidade, elevada capacidade de retenção e absorção de água, elasticidade, durabilidade, além disso, é biodegradável, biocompatível, atóxica e não alergênica (MOON et al., 2006; IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000; KLEMM et al., 2006).

A fermentação para a produção da CB é normalmente realizada em condições estáticas, em torno de 28 a 30°C. O meio se torna turvo e, depois de um período, uma película aparece na superfície. A espessura da película aumenta com o tempo, podendo atingir 25 mm após 4 semanas (IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000).

É importante salientar que, durante o processo de formação da película, a celulose é formada somente nas áreas próximas da superfície e não em todo o meio de cultivo. Enquanto o sistema for mantido imóvel, a película se mantém suspensa na parede interna do frasco por coesão. A espessura da película estabiliza-se, se for usado um frasco de boca cônica, ou se o recipiente onde o meio de cultivo estiver fermentando, for agitado. Nestas duas situações a película, que esta se formando na superfície do meio de cultivo, vai para o fundo do frasco e uma nova película começa se formar na superfície do meio de cultivo. As bactérias contidas na película podem ser facilmente removidas, através da imersão da película em soluções alcalinas diluídas em água (IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000).

O processo para a produção de CB por *Gluconacetobacter sp* utiliza métodos de cultivo estáticos, nos quais a película é formada na superfície do meio de cultivo. Com o objetivo de melhorar a produtividade, Yoshinaga et al. (1997) estudaram a

produção de CB em culturas agitadas, porém eles não obtiveram uma película e a sua aplicação se limitou à produção de papel.

Os meios de cultivo comumente utilizados para produção de CB por *Gluconacetobacter sp* são meios complexos, ou meios nutricionalmente ricos, contendo extrato de levedura e polipeptona (FONTANA et al., 1997; HESTRIN e SCHRAMM, 1954).

As moléculas de celulose são sintetizadas no interior das células e excretadas para fora da célula. A protofibrila de celulose, com cerca de 2 a 4 nm de diâmetro, é estruturada na forma de fita com 80 x 4 nm. A produção da celulose aumenta quase que exponencialmente com o tempo, quando as culturas são conduzidas em condições agitadas e a quantidade suficiente de oxigênio é fornecida. Nestas condições, o crescimento da população de *Gluconacetobacter sp* obedece à lei de crescimento bacteriano (IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000).

$$N_t = N_0 e^{\alpha t}$$

Sendo: N_t e N_0 o número de bactérias no tempo t e 0, respectivamente, e α , constante relativa ao tempo de geração

$$\alpha \ = (1/\tau) \mbox{ ln 2}$$
 , $\tau = \mbox{ 220 - 230 min}$

A formação da membrana ocorre da seguinte forma: no estágio inicial, a bactéria aumenta sua população, captando o oxigênio dissolvido no meio produzindo celulose na fase líquida, o que causa turbidez no meio de cultivo. Quando o oxigênio dissolvido no meio diminui, somente as bactérias próximas à superfície do meio de cultivo continuam a produzir celulose. A população bacteriana na superfície do meio não aumenta exponencialmente, mas atinge um equilíbrio. As células, que estão abaixo da superfície, não estão "mortas", apenas inativas. Portanto, elas podem ser reativadas e usadas para inocular novas culturas. Em relação ao crescimento da membrana em condições estáticas, uma tendência, geralmente observada, é que a espessura, a massa e a produção de celulose aumentem bruscamente, após o período de indução e tendam a diminuir após uma semana ou 10 dias (IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000).

Iguchi, Yamanaka e Budhiono (2000) verificaram que a concentração de sacarose acima de 1% não influenciou a produção de celulose. A frutose, gerada pela hidrólise da sacarose, não foi detectada, sendo provavelmente convertida em

outras substâncias. Observaram também que a glicose difunde gradualmente para o interior do meio. O oxigênio não chega ao interior do meio de cultivo, sendo consumido pelas reações celulares (IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000).

Embora a CB seja obtida na forma de um gel altamente higroscópico, a sua textura é única e diferente dos hidrogéis típicos. O gel de CB é constituído por microfibrilas e não por segmentos de cadeia molecular, como o ágar ou a gelatina, que podem assumir uma forma termodinamicamente estável (IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000).

Iguchi, Yamanaka e Budhiono (2000) descreveram que, morfologicamente, as fibras de celulose estão dispostas em finas camadas, uma sobre a outra, que formam uma membrana e que o elevado valor do módulo de Young (até 30 GPa) da CB é devido à alta densidade de pontes de hidrogênio interfibrilas e ao pequeno diâmetro das fibrilas.

Saibuatong et al. (2010) desenvolveram uma membrana nanoestruturada composta por CB e gel de aloe vera (BCA), através da suplementação do meio de cultivo com gel de aloe vera, durante a biossíntese da CB. Estudaram a estrutura morfológica dos poros, a força de tensão, a capacidade de absorção de água, a cristalinidade e a permeabilidade ao vapor de água da membrana modificada e compararam com a CB típica. A adição de 30% v/v do gel de aloe vera no meio de cultivo aumentou significativamente as propriedades mecânicas, a capacidade de absorção de água, a taxa de transmissão de vapor de água e o índice de cristalinidade. A adição acima de 30% v/v do gel de aloe vera inibiu a formação da membrana, mas formou uma membrana de estrutura mista com propriedades inferiores. Devido à natural biocompatibilidade da CB e do gel aloe vera, e das suas excelentes propriedades físicas, o BCA tem grande potencial de aplicação nas áreas médicas.

1.2 Produção de CB

Por muito tempo, foi considerado que as bactérias viviam de forma isolada. No entanto, nas últimas décadas, observou-se que ocorre não apenas associação, como também comunicação entre elas. Esse tipo de comportamento comunitário permite a formação de uma estrutura multicelular complexa, denominada biofilme (FUQUA et al., 1996). O estudo das interações entre bactérias pode ter impacto

significante no desenvolvimento de produtos de interesse biotecnológico, como, por exemplo, na indústria de alimentos (produção de fermentados e de iogurtes), na prevenção de doenças, em problemas de corrosão na indústria petroleira e naval, no tratamento de água e efluentes e na agricultura (SUNTHERLAND, 2001; COSTERTON et al., 1999; O'TOOLE et al., 2000; XAVIER et al., 2003).

O biofilme pode ser constituído por apenas uma espécie de bactéria ou por várias espécies. A predominância, na maioria dos ambientes, é do biofilme formado por múltiplas espécies, como, por exemplo, as placas bacterianas encontradas em nossos dentes. Os biofilmes constituídos de uma única espécie existem em uma variedade de infecções e implantes médicos (O'TOOLE et al., 2000). Esta observação tem requerido atenção especial por parte de vários pesquisadores da área médica, uma vez que a formação do biofilme confere resistência a agentes antimicrobianos, implicando em infecções de difícil tratamento. Como consequência, o tratamento de tais infecções requer altas dosagens de antibióticos e, em determinados casos, estas se tornam crônicas (COSTERTON et al., 1999).

As bactérias aeróbicas produzem uma película para manter sua posição na superfície do meio de cultivo, para proteger as células do efeito letal da luz ultravioleta, dos outros microrganismos e dos íons de metais pesados, para aumentar a colonização celular, para reter a umidade, prevenindo a desidratação, e para a adesão das células em um ambiente aeróbio; esta película também facilita a difusão dos nutrientes (SETYAWATI et al., 2009; IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000).

O'toole et al. (2000) sugerem que as bactérias iniciam a formação da membrana em resposta aos sinais ambientais, tais como disponibilidade e tipo de nutrientes, temperatura, pH e oxigênio. Os organismos que formam membranas em meio rico em nutrientes, quando em situações de escassez, se desprendem da membrana e retornam a viver isoladamente, provavelmente em busca de novas fontes de nutrientes. Essas condições variam amplamente entre os organismos. As bactérias associadas em uma película possuem vantagens nutricionais, proteção e facilidade de comunicação (WATNICK e KOLTER, 2000).

A formação do biofilme tem sido investigada, em nível molecular, em algumas espécies bacterianas (GENEVAUX et al., 1996). Em estudos realizados por O'toole e Kolter (1998), foram analisadas culturas com organismos mutantes, deficientes na produção de biofilme. Esses estudos demonstraram que a interação inicial da

bactéria com uma superfície é mediada por pilos e flagelos. Em contato com a superfície, as bactérias utilizam pilos para locomoverem-se até encontrarem outras bactérias, formando colônias e iniciando a produção de exopolissacarídeos (EPS). Em estudos realizados por Costerton et al. (1999), verificou-se que, durante a fase em que vivem associadas em um biofilme, as bactérias expressam genes que não são observados quando estas vivem de forma isolada.

Os expolissacarídeos secretados por bactérias possuem papel fundamental na estrutura do biofilme bacteriano e têm demonstrado relação com a virulência de algumas bactérias (COSTERTON et al., 1999). Embora os expolissacarídeos, como o alginato, goma xantana, goma curdlana, gelana, succinoglicana, entre outros sejam os componentes da matriz extracelular mais estudados, existe grande variedade de expolissacarídeos que permanece não caracterizada (SUNTHERLAND, 2001). A celulose tem sido identificada como um dos EPS da matriz extracelular, que é produzido por várias espécies de bactérias, durante a formação dos biofilmes (SPIERS et al., 2003; ZOGAJ et al., 2001).

Os polissacarídeos microbianos, como a celulose, podem ser produzidos sob condições controladas e com espécies selecionadas, evitando-se os problemas de variação da estrutura. A busca por novas variedades de microrganismos, que produzam polissacarídeos de interessante econômico e em grandes quantidades, tem sido um desafio enfrentado por vários grupos de pesquisa de vários países, como Japão, EUA, Canadá, França e Brasil. Embora essa área de pesquisa tenha avançado muito nos últimos tempos, é fato reconhecido que apenas poucos microrganismos foram completamente estudados dentre a vasta gama de microrganismos produtores de biopolímeros com potencial de aplicação industrial (SOUZA e GARCIA-CRUZ, 2004).

Muitas bactérias são capazes de produzir celulose, principalmente as cepas taxomicamente relacionadas aos gêneros *Acetobacter, Agrobacterium, Pseudomonas, Rhizobium e Sarcina* (Tabela 1).

Tabela 1. Microrganismos produtores de CB

Microrganismo (gênero)	Celulose Obtida	Função biológica
Acetobacter	Película extracelular,	Manter o microrganismo em ambiente
	fitas de celulose	aeróbico
Achromobacter	Fibrilas de celulose	Floculação em águas residuais
Aerobacter	Fibrilas de celulose	Floculação em águas residuais
Agrobacterium	Fibrilas curtas	Fixar nos tecidos das plantas
Alcaligenes	Fibrilas de celulose	Floculação em águas residuais
Pseudomonas	Fibrilas não distintas	Floculação em águas residuais
Rhizobium	Fibrilas curtas	Fixar nos tecidos das plantas
Sarcina	Celulose amorfa	Desconhecido
Zoogloea	Sem definição	Floculação em águas residuais

Referência: JONAS e FARAH, 1998

Atenção especial tem sido dada às cepas de Gluconacetobacter xylinus (Figura 1) do gênero Acetobacter, da família Acetobacteriaceae, que foram primeiramente descritas por Brown em 1886 (JONAS e FARAH, 1998). Elas produzem ácido acético na presença de oxigênio. A faixa ótima de temperatura de reprodução está entre 15 e 34°C. Outra propriedade interessante das cepas de Gluconacetobacter xylinus é a tolerância a condições ácidas, sendo capazes de crescer em valores de pH menores que 5,0. As cepas de Gluconacetobacter xylinus são aeróbias obrigatórias, bacilos gram-negativos, bastonetes elipsoidais, retos ou ligeiramente curvos, alongadas, móveis ou não, catalase positiva (são capazes de decompor o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em água (H₂O) e oxigênio (O₂)), incapazes de liquefazer gelatina e não reduzem nitratos e nitritos (bioquímica). A temperatura de morte térmica das cepas de Gluconacetobacter xylinus está entre 65°C e 70°C. As cepas de Gluconacetobacter xylinus são comumente encontradas na superfície de plantas, frutas e flores – e também constituem a microbiota secundária de material vegetal em decomposição, estando envolvida na acidificação bacteriana de sucos de frutas e bebidas alcoólicas (SPINOSA, 2002; PACHECO, 2004). As cepas Gluconacetobacter xylinus produzem e excretam celulose

extracelularmente, na forma de uma película (agregado de microfibrilas celulósicas), na interface ar-líquido do meio de cultivo em cultura estática.

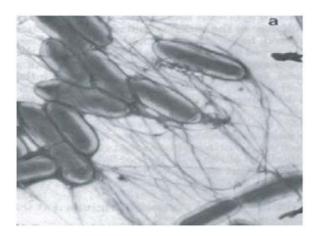


Figura 1. Imagem de G. xylinus (x7000) [Fonte: Benziman et al., 1980

A biossíntese de celulose em bactérias é um processo que ocorre através de várias etapas, que envolve várias enzimas e um operon (um conjunto de genes que se encontram funcionalmente relacionados, contíguos e controlados coordenadamente, sendo todos expressos em apenas um RNA mensageiro) denominado *bcs* (*bacterial cellulose synthesis*). Este operon codifica proteínas e enzimas, que compõem uma associação para a polimerização da glicose e a formação de celulose, sendo conservado entre várias espécies de bactérias gramnegativas.

A biossíntese de celulose por *Acetobacter xylinum* tem sido mundialmente investigada. A via de conversão da glicose em celulose envolve várias reações, nas quais a glicose é primeiramente fosforilada em glicose-6-fosfato (G6P) pela enzima glicoquinase, com a participação de uma molécula de adenosina trifosfato (ATP) e liberando uma molécula de adenosina difosfato (ADP); numa segunda reação, a G6P é convertida a glicose-1-fosfato (G1P) pela enzima fosfoglicomutase; G1P, através de uma reação de isomerilação catalisada pela enzima UDP-glicose-pirofosforilase, é convertida em uridina difosfato glicose (UDP-glicose), utilizando uma molécula de uridina trifosfato (UTP) e liberando uma molécula de pirofosfato (PPi). A molécula UDP-glicose é, finalmente, a precursora da biossíntese da celulose. A polimerização de glicose em cadeias β(1→4) glicanas é realizada pela

celulose sintase. Associação de várias cadeias nascentes formam as fibras de celulose (ROSS et al., 1990, BROWN et al., 1996).

A Figura 2 apresenta o esquema da biossíntese de celulose por *A. xylinum*, proposto por Ross et al. (1991).

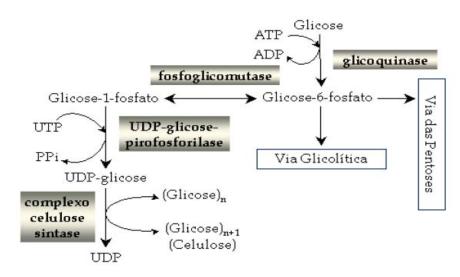


Figura 2. Via de biossíntese da celulose em *A. xylinum*, a partir da glicose como fonte de carbono, conforme proposto por Ross et al. (1991).

A enzima celulose sintase do *A. xylinum* é ativada, alostericamente, pela molécula c-di-GMP. O ativador c-di-GMP é sintetizado pela enzima diguanilato ciclase a partir de duas moléculas de guanosina trifosfato (GTP). A concentração de c-di-GMP intracelular é controlada pela ação oposta da enzima fosfodiesterase, que degrada a molécula ativadora c-di-GMP. Os genes, que codificam as enzimas que sintetizam e degradam c-di-GMP no *A. xylinum*, estão organizados em um operon contendo três diguanilato ciclase e três fosfodiesterase (CHANG et al., 2001). Tanto a diguanilato ciclase, como a fosfodiesterase, possuem, em sua estrutura primária, o domínio GGDEF. Tem sido demonstrado que proteínas, que contenham o domínio GGDEF, têm atividade diguanilato ciclase (AUSMEES et al., 2001; PEI e GRISHIN, 2001; GALPERIN et al., 2001; PAUL et al., 2004).

As proteínas e as enzimas, que compõem o complexo responsável pela polimerização da cadeia $\beta(1\rightarrow 4)$ glicana, são codificadas pelos genes que compõem o operon *bcs* em diversas espécies bacterianas filogeneticamente relacionadas. Essas proteínas são designadas: YhjQ, BcsA, BcsB, BcsZ, BcsC.

O gene, que codifica a proteína YhjQ em *S. typhimurium* LT2 e *E. coli* K12, está localizado na região a montante do operon *bcs*. Esta proteína tem sido descrita como uma ATPase, que está envolvida na divisão do cromossomo. Ensaios realizados por Kim et al. (2002) mostraram que a inativação desse gene nessas bactérias causa retardo na divisão celular e produz células filamentosas de vários tamanhos. Esses autores sugerem que essa proteína pode afetar a duplicação e a morfologia celular.

A subunidade catalítica da proteína BcsA da celulose sintase que, pertence à família 2 das β-glicosiltransferases processivas. Glicosiltransferases são enzimas que catalisam a transferência de resíduos de açúcar para moléculas aceptoras específicas, formando ligações glicosídicas. As glicosiltransferases podem agir como enzimas processivas ou não-processivas. As glicosiltransferases processivas que frequentemente referem-se às enzimas, que sintetizam polissacarídeos, catalisam a adição de múltiplos resíduos de açúcar, na extremidade crescente de uma cadeia linear de polissacarídeos. As glicosiltransferases não-processivas, por outro lado, catalisam a adição de um único resíduo de açúcar em posições específicas de uma molécula aceptora (HENRISSAT e DAVIES, 2000; SAXENA et al., 2001).

Saxena et al. (1995) propuseram um modelo da arquitetura multidomínio de βglicosiltransferase, sugerindo dois tipos de domínios, A e B. No domínio do tipo A, estão inseridos dois resíduos catalíticos de aspartato (D,D) e, no domínio do tipo B, encontram-se um resíduo catalítico de aspartato (D), o motivo conservado glutamina, dois resíduos de aminoácidos quaisquer, arginina e triptofano (QXXRW). Nas β-glicosiltransferases processivas, encontram-se ambos os domínios (A e B), enquanto que, nas não-processivas, encontra-se somente o domínio do tipo B. A troca dos resíduos de aspartato (D,D), por quaisquer outros aminoácidos, implica na perda da atividade da celulose sintase no A. xylinum, o que sugere que esses resíduos são essenciais para a atividade catalítica da enzima. Já o motivo QXXRW, está relacionado com o comprimento da cadeia polimérica. O motivo QRXRW sintetiza cadeias longas de polissacarídeos e está presente na celulose e na quitina sintase, enquanto que o motivo QQXRW sintetiza oligossacarídeos de cadeia curta. A análise da sequência de aminoácidos das β-glicosiltransferases, realizada por Saxena et al. (1995), mostra que a distância entre o resíduo D e o motivo QXXRW, do domínio B, é praticamente constante, variando de 33 a 38 resíduos de aminoácidos; a distância entre os resíduos DD, do domínio do tipo A, é de 46 resíduos de aminoácidos, para a celulose sintase, e de 120 resíduos de aminoácidos, para a quitina sintase; já a distância entre o resíduo D, do domínio do tipo A, e o resíduo D, do domínio do tipo B, varia de 92 a 138 resíduos de aminoácidos. Baseando-se nesta análise, os proponentes do modelo sugeriram um motivo comum entre as β-glicosiltransferases, como sendo: D,D,D35Q(R,Q)XRW. Este motivo pode ser utilizado para prever uma β -glicosiltransferase.

Brown et al. (1996) realizaram alinhamento entre sequências de aminoácidos da celulose sintase, de diferentes linhagens de *A. xylinum*, e observaram que o número de resíduos de aminoácidos entre os três resíduos de ácido aspártico (D,D,D) e o motivo conservado QRXRW, nessas enzimas, é de 46, 96 e 35 resíduos, respectivamente.

Estudo realizado por Römling (2002) relata cinco regiões altamente conservadas entre as β -glicosiltransferases processivas, contendo os seguintes motivos: PVDPYE, HAKAGN (L,I), QTP, FFCGS e RFLPL. A curdlana sintase, uma sintase $\beta(1\rightarrow 3)$ glicana de *Agrobacterium* spp., é a glicosiltransferase mais estruturalmente similar à celulose sintase. De acordo com Römling (2002), a curdlana sintase possui os motivos D,D,D35Q(R,Q),XRW, PVDPYE, HAKAGN(L,I) e QTP, mas não possui os motivos FFCGS e RFLPL, sugerindo, então, que os motivos FFCGS e RFLPL são responsáveis pela determinação da especificidade das ligações $\beta(1\rightarrow 4)$ glicana.

A celulose sintase possui a sequência de aminoácidos mais conservada do operon bcs; a cadeia peptídica da celulose sintase entre as espécies varia de 723 a 888 resíduos de aminoácidos (RÖMLING, 2002). As hélices transmembranas formam um poro pelo qual passa a cadeia $\beta(1\rightarrow 4)$ glicana que está sendo polimerizada.

A proteína BcsB está firmemente associada à subunidade catalítica celulose sintase, proteína BcsA. No *A. xylinum*, linhagem P21877, as proteínas BcsA e BcsB são codificadas pelo mesmo gene que codifica a proteína AcsAB. (RÖMLING, 2002)

A proteína BcsB é considerada a subunidade de regulação da celulose sintase, por ligar-se ao ativador alostérico da síntese de celulose, c-di-GMP, o qual, foi identificado primeiramente no *A. xylinum*. Nessa bactéria, o papel do c-di-GMP livre na célula é ativar alostericamente a proteína BcsA – celulose sintase. Acreditase que a maioria do c-di-GMP celular está reversivelmente ligada à proteína BcsB. Como a proteína BcsB está associada à proteína BcsA, formando um complexo

multienzimático – inseridos na membrana celular –, é possível que esta proximidade espacial seja necessária para liberar c-di-GMP diretamente da proteína BcsB, para a proteína BcsA (RÖMLING, 2002). É importante salientar que o nível celular de c-di-GMP depende do equilíbrio entre a atividade da enzima diguanilato ciclase, que sintetiza c-di-GMP, a partir de duas moléculas de GTP, e a ação oposta da enzima fosfodiesterase, que degrada c-di-GMP (CHANG et al., 2001).

A proteína BcsZ pertence à família 8 das glicosil hidrolases e possui atividade endoglicanase, mais comumente conhecida como celulase. As celulases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações internas $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glicosídicas da celulose. Podem hidrolisar também ligações $\beta(1\rightarrow4)$ em D-glicanas que contenham ligações $\beta(1\rightarrow3)$. Seus substratos naturais são a celulose e a xiloglicana (que possui, em sua cadeia principal, ligações $\beta(1\rightarrow4)$ D-glicosídicas). Além disso, apresenta especificidade variável sobre carboximetilcelulose (CMC) (derivada da celulose com estrutura $\beta(1\rightarrow4)$ D-glicopiranose), Avicel (celulose cristalina com ligações $\beta(1\rightarrow4)$ linear), β -glicana (polissacarídeo linear não ramificado com ligações $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow4)$ D-glicopiranose) e xilana (polissacarídeos mais comum entre as hemiceluloses com ligações $\beta(1\rightarrow4)$ D-xilopiranosil) (WULFF, 2002; HENRISSAT et al., 1989).

A função da celulase no operon *bcs* ainda não está completamente esclarecida. Estudo realizado por Peng et al. (2002) observou em plantas a associação da atividade da celulase com a biossíntese da celulose, uma vez que um sitosterol- β -glicosídeo serviria como iniciador para a polimerização da cadeia $\beta(1\rightarrow 4)$ glicana, sendo que uma celulase poderia participar na clivagem do sitosterol- β -glicosídeo, possibilitando o alongamento do polímero.

No entanto, procariotos não possuem esteróis e, portanto, podem ou não usar iniciador para síntese de celulose – ou usar iniciadores com outra função orgânica, diferente do sitosterol (DOBLIN, 2002). No *A. tumefaciens*, uma celulase está envolvida na clivagem de um oligossacarídeo ligado a um lipídeo que será utilizado como iniciador na biossíntese de celulose (MATTHYSSE et al., 1995).

A proteína BcsC está envolvida na biossíntese de celulose, em várias espécies bacterianas, e sua função ainda permanece desconhecida. As proteínas BcsC possuem pelo menos um TPR (*tetratrico peptide repeat*). O motivo TPR é um motivo estrutural, identificado por uma sequência de 34 aminoácidos presentes em

uma variedade de proteínas. Podem ocorrer de 3 a 16 motivos na proteína, podendo estar dispersos ao longo da sequência. Acredita-se que formam a estrutura envolvida na interação proteína-proteína e frequentemente atuam para manter unido um complexo proteico (DAS et al., 1998).

G. xylinus pode crescer em etanol, acetato, succinato ou L-maleato. O crescimento foi acompanhado pela formação de uma película na superfície do meio de cultivo. Esta película foi identificada como celulose, com base nas suas propriedades químicas, na solubilidade e na absorção do espectro infravermelho. A suspensão de células, que cresceram em etanol ou ácido orgânico, em contraste com as células que cresceram em açúcar, foi capaz de converter os intermediários do ácido cítrico em celulose. Esta diferença, entre as células que cresceram em açúcar e as células que cresceram em ácidos orgânicos, foi correlacionada com a diferença na capacidade oxidativa destas células. A relevância deste achado teve implicação em todo o padrão de classificação do Gluconacetobacter (GROMET-ELHANAN, 1963).

O Acetobacter é particularmente sujeito a mutação, mesmo em relação às características que foram usadas para a classificação das espécies. Dos cincos critérios bioquímicos estabelecidos por Fratuer (1950) para a classificação de bactérias ácido-acéticas, quatro (atividade catalase, poder cetogênico, produção de ácido a partir de glicose e habilidade de sintetizar celulose) foram demonstrados, por Shimwell, serem altamente mutáveis. Por outro lado, o comportamento em relação ao quinto critério (crescimento no meio sintético de *Hoyer*, no qual amônia e etanol são a única fonte de nitrogênio e carbono) foi estável (GROMET-ELHANAN,1963).

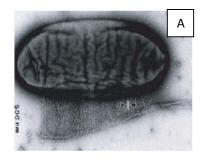
Cepas de Acetobacter, que são *Hoyer* negativas e positivas para os outros 4 critérios estabelecidos por Frateur, foram classificadas como *Acetobacter xylinum*. Tentativas prévias de crescimento de *A. xylinum* em etanol ou acetato, em meio sintético ou complexo, foram mal sucedidas. Durante o crescimento de *A. xylinum* em açúcar, os carboidratos são oxidados pela via do ciclo da pentose, enquanto os ácidos orgânicos são oxidados pela via do ácido cítrico, que também participa da oxidação dos açúcares (GROMET-ELHANAN, 1963).

Brown et al. (1976) compararam o processo de biossíntese de celulose por *Acetobacter xylinum* (um procariota) com o processo de um protista e com o processo de células eucariotas. As algas unicelulares Oocystis e Glaucocystis possuem um complexo linear terminal, que sintetiza microfibrilas de celulose, através

de um complexo móvel no plano da membrana de plasma fluída. Uma situação similar ocorre nas células das plantas superiores, como, por exemplo, o que acontece durante o crescimento das fibras de algodão. Um caso extremo existe em que a celulose é sintetizada em um espaço restrito em uma cavidade diferenciada do complexo de Golgi antes da exocitose. Nas bactérias, o local da síntese é externo à membrana plasmática e é estacionário em relação à superfície celular. A força propulsora do movimento nas células observadas foi criada pela polimerização e pela cristalização direcionada das fitas de celulose, entre o eixo longitudinal da célula, resultando em movimento celular unilateral e na secreção de um limo em algumas células algais, como, por exemplo, Micrasterias e Hormotillopsis. O sistema pode ter se iniciado extracelularmente; posteriormente, localizando-se próximo ao espaço exterior da membrana plasmática (envelope bacteriano), então se movendo para o plasmalema nos eucariontes, com especialização na orientação e no processo de mobilização, e, eventualmente, está localizado no sistema de endomembranas, onde unidades estruturais altamente especializadas (escalas) podem ser fabricadas(BROWN et al., 1976).

A faixa ótima de pH para a produção de celulose por *Gluconacetobacter xylinus* é 4-7, sendo que 80% dos dados observados para produção de celulose foram obtidos quando o pH estava entre 3,5 e 7. Para a produção industrial, o pH entre 4 e 4,5 forneceu os melhores resultados, especialmente por evitar contaminação. A temperatura ótima para a produção de celulose é 25-30°C, apesar da maioria dos autores usarem 28-30°C. (CASTRO et al., 2012)

As Figuras 3 A e B mostram as células de *G. xylinus* produzindo celulose.



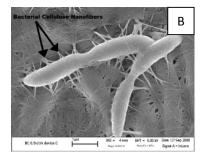


Figura 3. Imagens de *G. xylinus* produzindo celulose. A) Imagem de *G. xylinus* produzindo celulose; B) FESEM imagem de células de *G. Xylinus* produzindo nanofibras de celulose (www.azonano.com/news.asp?newsID=8590 acessado em 14 de junho de 2009).

1.3 Usos da membrana de celulose

A membrana de celulose, sintetizada pela bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, é estudada desde 1960. Na década de 1980, foi desenvolvida uma película biosintética pura, constituída por redes de microfibrilas de celulose cristalina prensadas, que dão estrutura e rigidez à membrana, obtida por processo fermentativo utilizando esta bactéria. Desde então, o interesse na CB tem crescido, devido à sua ampla perspectiva de aplicações (IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000).

A CB foi primeiramente usada como matéria-prima para a produção da nata de coco, uma sobremesa indígena na Filipina (sudeste asiático) (BUDHIONO et al., 1999). A nata de coco consiste em uma película gelatinosa obtida durante a fermentação da água de coco, com 1 cm de espessura. Essa película gelatinosa é cortada em cubos e imersa em xarope de açúcar. O principal componente desta película é a celulose, não a dextrana, como se assumiu no passado. Atualmente, a nata de coco é produzida em grandes quantidades e exportada, fazendo parte de uma dieta saudável. O Teekvass, ou chá de fungo, é um fermentado similar à nata de coco, produzido e consumido na Rússia e na Ásia Central (IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000).

A partir da década de 1990, a CB teve uma aplicação intensa, abrangendo diversos segmentos, como as indústrias alimentícia, têxtil e farmacêutica(JONAS e FARAH, 1998).

A celulose tem atraído interesse como material de embalagem, por ser biodegradável e por poder carrear uma ampla gama de agentes antimicrobianos (NGUYEN et al., 2008).

A membrana de celulose vem sendo amplamente estudada na regeneração tecidual guiada (RTG) *in vivo*, por ser biocompatível, inerte, atóxica, ter estrutura e resistência adequadas, ser seletivamente permeável, ser absorvida pelo organismo, e ter um preço acessível (MELLO et al., 2001; NOVAES JÚNIOR et al., 1993).

A RTG utiliza o processo de cicatrização natural do organismo, proporcionando um resultado mais próximo ao real, e requer o uso de uma barreira física, porque, quando ocorre lesão tecidual, a área ao redor é gradualmente preenchida por tecido fibroso, impossibilitando o reparo por tecido original. Dessa forma, ao se inserir uma membrana junto à lesão, previne-se o crescimento de

tecidos indesejáveis O fundamento da RTG é a utilização de membranas que possuam porosidade adequada e, ao mesmo tempo, que sejam biocompatíveis e suportem o crescimento tecidual, com taxas de degradação comparadas com as da formação do novo tecido (TABATA, 2001).

A CB também é usada na odontologia. Novaes Júnior et al. (1993) descreveram uma técnica cirúrgica que utiliza a membrana de celulose (Biofill[®]) no tratamento de lesão de furca, com resultados promissores. Lima e Passeri (1991), com o propósito de minimizar algumas dificuldades inerentes ao procedimento de enxerto gengival livre, utilizaram uma película celulósica microfibrilar. Após o controle da hemorragia, várias camadas da película sintética foram colocadas, com intuito de revestir o leito receptor. A película de celulose foi mantida na posição correta pelo coágulo sanguíneo. Após avaliação clínica, apesar da pequena amostra (cinco pacientes), os autores concluíram que, ao final dos períodos de 15 e 30 dias, a película sintética permitiu a substituição da camada superficial, sem interferir na reparação do leito receptor.

A membrana de celulose também foi empregada como substituta da duramáter em cães, apresentando pouca reação fibrótica. A CB foi considerada um material adequado para a realização de enxerto dural (MELLO et al., 1996).

Em estudo desenvolvido por Salata et al. (2001), foi demonstrado que o modelo de reparação óssea, com o uso da membrana de celulose, foi predominantemente de ossificação endocondral. Em contraste, a membrana de e-PTFE induziu formação óssea direta (ossificação intramembranosa). A formação de cartilagem, durante a reparação óssea pela membrana de celulose, é considerada uma consequência da baixa tensão de oxigênio no tecido, gerada pelo selamento do suprimento vascular periosteal (SANDBERG et al. 1993).

A CB também tem o potencial de ser usada como substrato na engenharia de tecido cartilaginoso, devido sua elevada força no estado seco, bem como sua moldabilidade *in situ*, biocompatibilidade, relativa simplicidade e custo-eficiência de produção. Svensson et al.(2005) relataram a resposta primária de condrócitos bovinos naturais e quimicamente modificados na CB. A fosforilação e a sulfonação das matrizes foram realizadas para adicionar carga aos glicoaminoglicanos na cartilagem de tecido vivo. Os materiais foram analisados quanto às propriedades mecânicas, à microestrutura e à interação célula-material. As respostas dos condrócitos ao colágeno tipo II, à celulose de origem vegetal, ao alginato de cálcio e

ao tecido plástico de cultura foram comparadas à matriz de CB. A expressão de RNA na ECM, incluindo condrócito de colágeno específico II e fibroblasto colágeno específico I, foi analisada para se estudar se a CB suporta a proliferação dos condrócitos humanos. Adicionalmente, estudou-se o potencial da CB para suportar o crescimento celular. Os dados indicaram que a celulose bacteriana não modificada suporta a proliferação de condrócitos em nível de 50% do tecido natural (colágeno tipo II). Porém, quando comparada com alginato e com tecido de cultura plástico, a CB não modificada demonstrou níveis significativamente maiores de crescimento dos condrócitos e nível similar de resposta imune *in vitro*. A fosforilação e a sulfonação não melhoraram a produção dos condrócitos.

A membrana de celulose também pode ser utilizada como curativo oclusivo. Esses curativos devem possuir características que melhorem a cicatrização, como permitir exsudação, manter umidade local, diminuir a dor, estimular a epitelização e evitar a contaminação. A partir da metade do século XX, demonstrou-se que os curativos oclusivos podiam atuar como agentes farmacológicos, interferindo direta e favoravelmente na cicatrização das feridas. Desde então, as atenções se voltaram para a cicatrização úmida das feridas com uso de curativos oclusivos e semi-oclusivos (TOMAZ et al. 1977).

A utilização dos curativos oclusivos e semi-oclusivos tem demonstrado vantagens, como o aumento da velocidade de reepitelização, redução da dor e da inflamação de úlceras, bem como a possibilidade de formação de cicatrizes com aspectos estéticos melhores. Além dessas vantagens, esses curativos podem ter efeitos sobre a formação do tecido de granulação, favorecendo a reparação da derme (FU, ZHANG e YANG, 2013; CASTRO, 2005; SULEWSKI, 1991, MAYALL et al.,1990; PITANGUY, SALGADO e MARACAJÁ, 1988).

Os curativos oclusivos e semi-oclusivos: a) aumentam a concentração local de fatores de crescimento epitelial e plaquetário e de interleucina-1, que facilitam e aceleram a cicatrização, por manter o fluído da úlcera, que contém esses fatores, em contato com a superfície da ferida; b) mantêm o potencial elétrico normal entre a pele da úlcera e a pele circundante, cuja manutenção é importante para a migração epidérmica; c) mantêm o ambiente da ferida úmido, o que facilita a atividade proteolítica, a fibrinólise, o desbridamento autolítico da lesão, a migração das células epiteliais e evita a formação de crostas; d) têm efeitos favoráveis da flora microbiana local, uma vez que os metabólitos produzidos pelas bactérias residentes nas úlceras

podem estimular a migração epidérmica e a cicatrização da ferida; e) alteram as taxas de oxigenação no leito da lesão, uma vez que, tanto a hipóxia local quanto a fibrinólise (aumentadas nas úlceras cobertas) são capazes de estimular a secreção pelos macrófagos dos diversos fatores de crescimento, que permitem ativar a fibroplasia, a proliferação de células endoteliais (angiogênese) e de queratinócitos (epitelização); e f) previnem a remoção mecânica das células epiteliais, permitindo que a epitelização ocorra de forma constante e gradativa, em decorrência da diminuição de manipulação do leito da lesão (CASTRO, 2005; SULEWSKI, 1991, MAYALL et al.,1990; PITANGUY, SALGADO e MARACAJÁ, 1988).

A utilização das membranas celulósicas obtidas por *Gluconacetobacter xylinus*, como substituto temporário da pele humana, já é divulgada desde a década de 1980, sendo utilizada em diversas situações: queimaduras superficiais e profundas, dermoabrasões mecânicas ou a *laser*, áreas doadoras de enxertos, escaras de decúbito, úlceras de estase venosa e arteriais. A membrana de celulose permite o controle da dor e da inflamação, a manutenção de umidade na ferida, assim como dos fatores de crescimento e defesa (IL-1), favorecendo a granulação e o crescimento dérmico, a manutenção do potencial elétrico da pele das bordas dos ferimentos, diminuindo a taxa de contaminação externa, permitindo a visualização direta do aspecto e da quantidade de secreção, diminuindo ou eliminando a necessidade de trocas de curativos, diminuindo lesões epidérmicas e aumentando a comodidade e a segurança do paciente articulações (MAYALL et al.,1990; PITANGUY, SALGADO e MARACAJÁ, 1988).

Pitanguy, Salgado e Maracajá (1988) testaram a membrana celulósica não porosa em 133 casos, incluindo dermoabrasões, queimaduras de segundo grau e áreas doadoras de enxerto de pele parcial. Concluíram que a membrana tem boa aderência e durabilidade, possui razoável capacidade hemostática, permite vaporização d'água, é um bom antisséptico, é de fácil manuseio, elimina a dor quase que de imediato, além de diminuir o tempo de internação, a frequência de curativos e de atendimento médico. A transparência da membrana possibilitou a constante inspeção da ferida e o pronto tratamento nos casos em que houve complicações, após a aplicação, permitindo, assim, a liberação precoce do paciente, para as suas atividades normais. A membrana de celulose testada foi eficaz no tratamento de lesões com pouca profundidade e em áreas de pouca mobilidade, demonstrando ser bastante eficiente no tratamento de perdas parciais de pele.

Sobrinho (1989) observou que, no tratamento de queimaduras de segundo e terceiro graus, a associação da membrana celulósica com oxigênio hiperbárico (HBO) é de extrema importância, porque um complementa o outro: a membrana protege o paciente de novas infecções, enquanto o HBO seca as secreções e acelera a epitelização.

A película de celulose propicia inúmeras vantagens tanto ao paciente como para o sistema hospitalar. O paciente é beneficiado pela eliminação do traumatismo que seria causado para obter-se grande quantidade de enxerto; pela comodidade, principalmente por reduzir a dor; pela redução dos dias de internação hospitalar. O sistema hospitalar é beneficiado com a redução do custo-leito, propiciado pela diminuição dos dias de internação, pela diminuição das horas gastas com curativos, assepsia e anestesia articulações (MAYALL et al.,1990; PITANGUY, SALGADO e MARACAJÁ, 1988).

Mayall et al. (1990) empregaram a membrana celulósica no tratamento de ulcerações tróficas dos membros (feridas causada pela deficiência de nutrição dos membros). Com base nos resultados, após 2 anos de observações, concluíram que a membrana celulósica é bastante útil na terapia deste tipo de lesões, diminuindo o tempo de cicatrização, a contaminação da ferida por microrganismos, bem como o custo de tratamento. Mais especificamente, os autores concluíram: a) terem ocorrido curas sem recidivas locais, até por 12 meses em 13 pacientes já deambulando, depois de obterem alta, o que não ocorria em alguns casos observados; b) que, em úlceras isquêmicas sobre planos ósseos, houve efeito analgésico e significativa redução do número de curativos, necessários ao tratamento local; c) que, principalmente nas úlceras de estase venosa e isquêmicas, que já se apresentavam há vários anos sem solução, pelos tratamentos convencionais, houve redução apreciável no tempo de cicatrização.

Alguns inconvenientes foram relatados no tratamento de feridas com a membrana de celulose, como a necessidade de remoção de bolhas de ar, aprisionadas sob a membrana recém-aplicada; a necessidade de remoção do exsudato secretado pela ferida sob a membrana, por meio de compressão ou criando perfuração na membrana; a pouca adesividade e o desprendimento da membrana; a elasticidade aquém da desejada, para o tratamento de lesões na região de articulações (MAYALL et al.,1990; PITANGUY, SALGADO e MARACAJÁ, 1988).

Em 2000, Siqueira e Moreschi desenvolveram uma nova tecnologia para obter uma membrana composta por microfibrilas cristalinas de celulose bacteriana (*Acetobacter xylinum*), quimicamente inerte e higroscópica, com textura fina e uniforme, com alta maleabilidade e resistência mecânica no estado úmido, desidratada e com poros de tamanhos específicos, solucionando, assim, os inconvenientes dos curativos descritos anteriormente. Esta nova membrana com poros permite a remoção espontânea ou estimulada da secreção de lesões, é de fácil aplicação, tem excelente adesão aos tecidos, diminui a dor, permite a visualização adequada do leito da lesão, diminui as trocas de curativos e aumenta o intervalo do acompanhamento médico. Nas queimaduras de segundo grau superficiais, os curativos porosos permaneceram no local aplicado por 7 dias. Já nas queimaduras de segundo grau profundas, algumas vezes, foi necessária a troca da película no sétimo dia, aguardando mais alguns dias para a completa reepitelização.

Fu, Zhang e Yang (2013) avaliaram o tratamento de úlceras não cicatrizadas dos membros inferiores com CB (Dermafill™ - AMD/Ritmed, Tonawanda, Nova York). O tempo requerido, para reduzir 75% do tamanho da ferida, foi comparado em 11 feridas crônicas tratadas com e sem CB. O período médio de observação das feridas sem a aplicação de CB foi de 315 dias (intervalo de confiança: 95%: 239-392 dias). Com a aplicação de CB nas feridas crônicas, o tempo médio para 75% de epitelização foi reduzido para 81 dias (intervalo de confiança: 95%: 50-111 dias), com valor médio de 79 dias. Quando aplicada em úlcera de membros inferiores não cicatrizadas, a CB diminuiu o tempo de cicatrização da ferida quando comparada com o tratamento padrão.

A conformação e as propriedades elásticas da CB permitiram alto grau de aderência nas feridas, mesmo nas partes móveis, como a face. Um paciente com queimadura de segundo grau profunda da face teve o rosto coberto com uma folha de CB, com aberturas para olhos, nariz e boca. Depois de 44 dias, a face estava completamente cicatrizada, sem necessidade de enxerto da pele e sem sinais de cicatrizes extensas. Estudos clínicos foram conduzidos com 34 pacientes, que sofreram graves queimaduras térmicas (segundo grau A/B), cobrindo cerca de 9 - 18% da superfície total do corpo; 22 pacientes foram tratados com CB (grupo teste). A aderência da CB à superfície da ferida foi excelente, para evitar espaços mortos. Isto pode ser atribuído a sua boa conformação. Nenhum paciente que usou a CB, durante o estudo clínico, desenvolveu qualquer tipo de reação de hipersensibilidade.

Após 10 dias de tratamento, o processo de reepitelização se iniciou em 7 pacientes do grupo teste (58,3%), em comparação com 4 pacientes (33,3%) do grupo controle. Estes resultados demonstraram que o uso da CB no tratamento de queimaduras parciais proporciona o ambiente favorável para a rápida cicatrização da ferida. É importante mencionar que a aplicação da CB nas feridas é um processo indolor, devido à umidade ainda presente na CB (FU, ZHANG e YANG, 2013).

Um estudo randomizado comparou o tratamento padrão (Xeroform[™] revestimento secundário de TegadermTM), com a aplicação de CB (DermafillTM) em idosos, que moravam em um asilo, com feridas da pele de graus II e III. Neste estudo, 24 pacientes receberam o tratamento padrão e 27 foram tratados com CB. No grupo que usou CB, ocorreu redução do tempo de cicatrização da ferida, diminuição da dor e facilidade de uso. Mesmo com a área da ferida sendo um pouco maior no grupo tratado com CB, o tempo de cicatrização foi equivalente ao do grupo controle. O controle da dor, a facilidade de uso e a satisfação, tanto das enfermeiras quanto dos pacientes, com a cicatrização da pele, também foi superior no grupo que utilizou a CB em relação ao grupo controle. Outro estudo comparou a taxa de cicatrização de úlceras em pé diabético utilizando CB e XeroformTM embebido em gaze. Quinze úlceras de pacientes com diabetes tipo II foram tratadas com CB e 19 úlceras de pacientes com diabetes tipo II foram tratadas com Xeroform[™] embebido em gaze (grupo controle). Todas as feridas em estágio II ou III na escala de Wagner foram desinfectadas e receberam o tratamento padrão, incluindo desbridamento, suporte de apoio para o membro machucado e avaliação semanal da ferida. Com a provisão dos cuidados padrões, a aplicação das CB nas úlceras diabéticas melhorou a taxa de cicatrização e reduziu o tempo de epitelização. Todos os tratamentos demonstraram que a CB foi de fácil aplicação e que os pacientes apresentaram rápida taxa de cicatrização (FU, ZHANG e YANG, 2013).

O interesse na aplicação da CB tem crescido rapidamente. O uso clínico da CB para reparo da pele tem sido considerado um método eficiente para tratar feridas agudas e crônicas (FU, ZHANG e YANG, 2013).

A CB também pode ser considerada um material com potencial na confecção de lentes terapêuticas, devido as suas propriedades únicas e por ser um biopolímero promissor para a incorporação de agentes antimicrobianos (CASTRO, 2005; SULEWSKI, 1991).

Além das aplicações citadas, a CB também pode ser utilizada como papel, torniquetes, aglomerantes, aditivo e espessantes de tintas, diafragmas acústico de alta definição de alto-falante, vaso sanguíneo artificial (REBELLO et al., 2001), reconstrução vascular, revestimento de *stent* (uma pequena malha metálica introduzida na artéria durante a angioplastia, para impedir que a artéria volte a se fechar), biocombustível, membrana iônica de ultrafiltração, substrato para cultura de células mamárias, membrana de cobertura de biosensor de glicose, entre outros usos (FONTANA et al., 1997; ERENO, 2004; SVENSSON et al., 2005, SETYAWATI et al., 2009; FU, ZHANG e YANG, 2013).

1.4 Uso dos resíduos

A grande demanda por padrões nutricionais adequados tem aumentado o custo, diminuído a disponibilidade de matérias-primas e gerado muita preocupação com poluição ambiental. Consequentemente, há considerável ênfase na recuperação, na reciclagem e na reutilização dos resíduos. Os resíduos, os efluentes e os subprodutos provenientes da indústria alimentícia podem ser recuperados e utilizados para obter produtos úteis e com elevado valor agregado. A indústria alimentícia gera grande quantidade de resíduos sólidos e líquidos, resultantes da produção, do preparo e do consumo de alimentos. Estes resíduos têm se tornado um grave problema ambiental (LAUFENBERG, KUNZ e NYSTROEM, 2003).

Com vistas a reduzir a agressão ao meio ambiente, a questão do desperdício de alimentos apresenta-se como sendo de suma importância, considerando que suas consequências imediatas são: o não aproveitamento do valor potencial econômico, social e individual e sua capacidade de provocar danos ao meioambiente e à saúde (PRIM, 2003)

Segundo a CEAGESP, das 10.000 toneladas de produtos que entram diariamente no terminal de comercialização, 1% (100 toneladas) é descartada; isto significa 100 toneladas de alimento/dia. Porém, entre 30% e 50% dos alimentos descartados ainda estão próprios para o consumo, ou seja, que entre 30 e 50 toneladas de alimentos/dia poderiam ser usadas para alimentar grande parte da população carente, caso este excedente fosse direcionado para bancos de alimentos (FAGUNDES et al., 2012).

Aproximadamente 64% do que se planta no Brasil é perdido ao longo da cadeia produtiva sendo: 20% na colheita, 8% no transporte e armazenamento, 15% na indústria de processamento, 1% no varejo e 20% no processamento culinário em função dos hábitos alimentares. Números muito significativos, para um país onde, a cada cinco minutos, uma criança morre por problemas relacionados à fome. Segundo a EMBRAPA (2006), o Brasil desperdiça 37 quilos de hortaliças por pessoa ao ano, o que representa cerca de 40% de todas as hortaliças cultivadas.

No Brasil, os alimentos não aproveitados, ao longo da cadeia produtiva, representam 1,4% do Produto Interno Bruto (PIB), o que ultrapassa a quantia de R\$ 17,25 bilhões de reais por ano. Ao todo, são 39 milhões de toneladas de alimentos por dia, quantidade suficiente para alimentar, com café da manhã, almoço e jantar, 39 milhões de pessoas, quase os cinquenta milhões que ainda passam fome no país, de acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). (VAL, 2012)

Uma família brasileira desperdiça, em média, 20% dos alimentos que compra semanalmente. Isso significa a perda de US\$ 1 bilhão por ano – ou o suficiente para alimentar 500 mil famílias. Segundo a 8ª Avaliação de Perdas no Varejo Brasileiro, em 2007, os supermercados perderam 4,48%, de seu movimento financeiro, em perecíveis (VAL, 2012).

A maior parte das frutas é vendida e consumida como alimento, mas as que estão O valor comercial das frutas e hortaliças, por exemplo, está diretamente ligado às qualidades exigidas pelo mercado. Cada produto tem sua particularidade, mas de uma forma geral está relacionada, segundo Alvarenga (2011), com suas características internas, inerentes ao produto, ou seja, formato, coloração de polpa, sabor, doçura, entre outras, e a sua qualidade, de acordo com aspectos externos ou adquiridos do meio exterior, tais como: danos e defeitos (podridões, lesões, manchas, etc.). Pode-se considerar, ainda, variedade, frescor, textura, tamanho, tipo de embalagem e apresentação do produto danificadas ou fora do padrão são desprezadas; algumas são processadas para preparar geleia, pastas e molhos. Quando as frutas não podem ser destinadas ao consumo, pela baixa qualidade causada pelo mau tempo e outros desastres naturais, são vendidas por preços baixos ou se tornam resíduos. O principal destino desses resíduos tem sido o descarte. Porém, estas frutas são abundantes em açúcares, como glicose e frutose, que podem ser bioconvertidos em produtos com alto valor agregado. Tem sido

relatado que bactérias ácido-acéticas, como *G. xylinus*, assimilam vários açúcares e produzem CB. (ADEJOYE et al., 2006; BAE e SHODA, 2004; ISHIHARA et al., 2002; VERSCHUREN et al., 2000; KUROSUMI et al., 2009).

O alto custo do manitol e da frutose, associado com a baixa produtividade dessas fontes de carbono, limita a produção industrial e a aplicação comercial da celulose bacteriana, uma vez que tornam o custo de produção elevado, sendo somente praticável para produtos com elevado valor agregado. Portanto, é um desafio significativo buscar fonte de carbono alternativa que conduza à alta produtividade de celulose bacteriana. Hong et al. (2005) desenvolveram o hidrolisado de pó de konjac (planta com haste comestível, fonte rica em polissacarídeos e fibras), como uma excelente fonte de carbono, para a produção bem sucedida de CB. A produção de CB, a partir dessa nova fonte de carbono, foi muito melhor em relação às fontes convencionais e/ou sintéticas, como também o custo/benefício desta fonte de carbono é vantajoso, porque o konjac é recurso natural abundante na China.

O custo da produção da celulose bacteriana também pode ser reduzido, drasticamente, pelo uso de resíduos do processamento de alimentos como fonte nutritiva adicionada ao meio de cultivo. A CB tem sido desenvolvida a partir de água de coco na Indonésia ao custo de US\$ 30,00/kg de celulose (IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000). Pesquisas têm sido desenvolvidas, visando à produção de CB, aproveitando os subprodutos ou resíduos da indústria de alimentos (VANDAMME et al., 1998; SILVA, 2003; SOUZA e GARCIA-CRUZ, 2004).

Kurosumi et al. (2009) estudaram um método efetivo de cultura para produzir CB, a partir de vários sucos de frutas, incluindo laranja, abacaxi, maçã, pera japonesa e uva, utilizando *A. xylinum* NBRC 13693. Eles obtiveram os seguintes resultados: a utilização de resíduos de suco de fruta, como laranja, abacaxi, maçã, pera japonesa e uva, foi viável para produzir CB; a adição de fontes de nitrogênio no suco de frutas aumentou a produção de CB; as substâncias presentes no suco de laranja e de pera japonesa podem promover o aumento da produção de CB; e o suco de laranja foi o meio mais adequado para a produção de CB.

1.5 Chá verde (Camellia sinensis)

O Camellia é o maior e economicamente mais importante gênero da família Theaceae, a melhor altitude para seu cultivo é entre 1.000 e 1.500 metros, embora algumas variedades são plantadas em altitudes entre 200 e 2.000 metros O chá verde (Camellia sinensis), também conhecido como banchá, é a bebida à base de planta mais consumida no mundo, cuja produção comercial, em 40 países, está em torno de 3,6 milhões de toneladas de folhas de chá verde por ano (CHEN et al., 2012). A China foi o primeiro país do mundo a consumir e a produzir o chá verde, provavelmente no início do ano 2.730 a.C., no sudeste.

As folhas do chá verde são ricas em compostos químicos, que são importantes na dieta humana, incluindo alta porcentagem de polifénois (um potente agente antimicrobiano e antioxidante), flavonoides, catequinas, cafeína, potássio, metilxantinas, polisacarídeos, magnésio, ácido fólico e vitaminas (C, E, K, B1, e B2). As folhas têm potencial de proteger contra doenças cardiovasculares e metabólicas e, localmente, têm a habilidade de induzir a apoptose das células cancerosas da boca (NAROTZKI et al., 2012; STASZEWSKI et al., 2011; CHEN et al. 2012).

1.6 Laranja (Citrus sinensis)

A laranja (*Citrus sinensis*) se desenvolve em regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre, onde se encontra o clima e o solo adequados. As frutas cítricas, como a laranja, a tangerina e a toranja, são usadas para produzir vinho. As frutas cítricas contêm grande variedade de compostos bioativos, que contribuem para manter o corpo humano saudável. A laranja possui mais de 170 compostos com atividade biológica. Ácidos orgânicos, açúcares e compostos fenólicos estão entre os principais componentes das frutas cítricas (KELEBEK et al., 2009). Os principais ácidos orgânicos encontrados nas frutas cítricas são o ácido cítrico e o ácido maleico. Adicionalmente, traços de ácido benzoico, oxálico e succínico têm sido encontrados (KARADENIZ, 2004). Açúcares são os principais sólidos solúveis dos sucos cítricos e a doçura do suco de laranja está intrinsecamente relacionada à composição dos seus açúcares. A sacarose está presente em grande quantidade no suco de laranja. Os compostos fenólicos possuem papel importante na capacidade

antioxidante das frutas cítricas. Ácidos fenólicos e flavonoides são os dois principais grupos de compostos fenólicos presentes no suco de laranja. O ácido hidroxicinâmico e seus derivados, ácido ferúlico, p-cumárico, sináptico, cafeico e clorogênico, são os mais importantes ácidos fenólicos presentes no suco de laranja. Todos os flavonoides presentes no Citrus sp. podem ser classificados nos seguintes subgrupos: flavononas, flavonas e flavonóis. As flavononas são os flavonoides mais abundantes nas frutas cítricas, sendo encontradas principalmente nos sucos. A quantidade e o tipo de flavononas nos sucos cítricos dependem da espécie de fruta cítrica utilizada, de quão madura a fruta está e das condições ambientais. Cada tipo de fruta cítrica é caracterizado por uma flavonona glicosilada. Naringina (naringenina 7-O-neohesperidina), narirutina (naringenina 7-O-rutinosida), uma pequena quantidade de hesperidina (hesperetina 7-O-rutinosideo) e neo-hesperidina (hesperetina 7-O-neo-hesperidosida) são principalmente encontradas nas espécies de toranja. As flavononas glicosiladas predominantes nas laranjas doces são a hesperidina e a narirutina. Enquanto que, nas laranjas azedas, as duas flavononas glicosídicas predominante são a neo-hesperidina e a naringina (ROJAS et al., 2007).

É comumente aceito que o consumo de alguns alimentos pode prevenir o câncer, particularmente os alimentos que possuem flavonoides são os mais promissores agentes na prevenção do câncer. Os compostos fenólicos do suco de laranja estão relacionados com a sua capacidade antioxidante, que é influenciada pela sua composição e seus processos de concentração e armazenagem. Tem sido reportado o significante papel dos polifenóis (particularmente da hesperidina e narirutina) na atividade antioxidante total do suco de laranja, mesmo que a vitamina C seja o composto antioxidante mais abundante (KELEBEK et al., 2009).

A produção industrial de suco de laranja produz, aproximadamente, de 8 a 20 milhões de toneladas/ano de resíduos sólidos e líquidos, globalmente.

Geralmente, os resíduos da laranja não têm valor econômico, embora sejam ricos em açúcares solúveis, celulose, hemicelulose, pectina e óleos essenciais. Estes resíduos poderiam ser à base de muitos processos industriais. As possíveis aplicações tecnológicas dos resíduos sólidos e líquidos gerados durante a produção do suco de laranja incluem: produtos para consumo humano; fertilizante; ração animal; carvão vegetal; compostos para absorção química; produção de bio-óleo; extração de óleos essenciais e pectina (REZZADORI, BENEDETTI e AMANTE, 2012).

1.7 Mamão (Carica papaya)

A Carica papaya é uma árvore de caule macio e não ramificada, cultivada em regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre, tanto pelo seu fruto, quanto pela grande quantidade de cisteína proteinases (LOOZE et al., 2009). Os ácidos ferúlico, p-cumárico e cafeico são os mais abundantes na casca do mamão. Licopeno, β -criptoxantina e β -caroteno são os principais carotenoides presentes na polpa do mamão. O conteúdo de carotenoides aumenta quanto mais madura estiver à fruta.

O mamão também contém vitamina C (ácido ascórbico), que é a vitamina hidrofílica presente nas plantas e que tem papel importante, sendo necessária para muitos processos metabólicos, como o desenvolvimento e a produção de hormônios. A vitamina C também é considerada um poderoso agente antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo. Também tem sido observado que a vitamina C pode agir sinergicamente com outras vitaminas, tendo importante papel na regeneração da vitamina E. A quantidade de vitamina C é maior na polpa que na casca do mamão.

A concentração dos compostos fenólicos, carotenoides e da vitamina C está correlacionada com a capacidade antioxidante do mamão. O consumo do mamão maduro é melhor que o consumo de mamão verde, devido à alta concentração de compostos bioativos no mamão maduro, que podem contribuir para melhorar a saúde humana (SANCHO et al., 2011).

O mamão pode ser consumido *in natura*, em saladas e sucos. A casca do mamão verde apresenta um látex leitoso que deve ser retirado antes do consumo. Este látex contém substâncias nocivas às mucosas, sendo usado, na culinária, como amaciante de carnes. O látex tem alto teor de papaína, uma enzima proteolítica usada em medicamentos para tratamento de distúrbios gastrointestinais, para reabsorção de hematomas, para tratamento de úlceras de difícil cicatrização, como aquelas que acometem os portadores de diabetes, as escaras e as úlceras provocadas por queimaduras.

O mamão é indicado para o tratamento de abscessos, amebíase, asma, constipação, problemas renais, distúrbios digestivos, edema, inflamação póscirúrgica e traumática, eczemas, verrugas, úlceras e icterícia.

1.8 Beterraba (Beta vulgaris)

A beterraba é uma hortaliça anual herbácea, pertencente à família *Chenopodiaceae*, cuja principal parte comestível é uma raiz tuberosa constituída, internamente, por faixas circulares de tecidos condutores de nutrientes, alternadas com faixas de tecidos que armazenam nutrientes. Estas faixas de tecido que armazenam nutrientes são relativamente largas e escuras ou coloridas; já as faixas de tecidos condutores, são mais estreitas e mais claras. A raiz pode ser consumida crua ou cozida, porém é nas folhas que estão concentradas as maiores quantidades de nutrientes e vitaminas por 100 gramas do produto, destacando-se cálcio, ferro, sódio, potássio e vitaminas A, B e C (TIVELLI et al., 2006).

A beterraba é originária das regiões de clima temperado da Europa e do norte da África. No Brasil, as regiões Sudeste e Sul cultivam 77% do que é produzido. O Estado de São Paulo planta, em média, 5.000 hectares dessa hortaliça por ano, produzindo 115.000 toneladas. A raiz tuberculizada da beterraba é utilizada como alimento, para produção de açúcar (sacarose) e etanol combustível. A beterraba também é utilizada para combater problemas do baço e do fígado. As suas folhas, em forma de cataplasma, são empregadas no tratamento de feridas da pele e de inflamações em geral. O suco de beterraba, por sua vez, é tônico, refrescante, diurético, combate a litíase renal, descongestionando as vias urinárias (SOUZA et al., 2003).

A beterraba destaca-se como uma das hortaliças mais ricas em ferro, tanto na raiz quanto nas folhas.

A cada ano, estima-se que a extração de açúcar proveniente da beterraba, nos Estados Unidos, produza cerca de 2 milhões de toneladas de polpa de beterraba. A polpa de beterraba tem sido usada principalmente como ração animal de baixo valor. A demanda pela polpa de beterraba, como matéria-prima para produção de ração animal, tem diminuído, devido ao aumento do custo da energia para preparar a ração animal e ao aumento mundial da produção de resíduos agrícolas para produzir o açúcar de beterraba. Apesar disso, a polpa de beterraba é uma rica fonte de carboidratos, contendo aproximadamente 67% (baseado no peso seco) ou mais de polissacarídeos. Os polissacarídeos são obtidos por extração sequencial da polpa de beterraba em três frações. A primeira fração extraída é a pectina, que pode ser extraída em condições ácidas ou levemente alcalinas. A

segunda fração possui polissacarídeos solúveis em condições alcalinas, e pode conter um pouco de pectina, enquanto a terceira fração é composta por microfibrilas de celulose (FISHMAN et al., 2009).

Na indústria de processamento de açúcar de beterraba, o açúcar é extraído, das fatias de beterraba, com água quente (70°C), para produzir um suco de açúcar bruto, que é refinado, para produzir um suco com concentração de açúcar de 16%. O suco refinado é concentrado em vários passos, resultando em um suco com conteúdo de açúcar de 67%. O xarope proveniente do estágio final de cristalização é chamado de melaço (VUCUROVIC e RAZMOVSKI, 2012).

O componente mais importante da beterraba é a sacarose. Porém, várias outras substâncias impactam na produção de açúcar, como o potássio, o sódio, a rafinose e os compostos nitrogenados ($c\alpha$ -aminos e betaina) e diminuem a produção do melaço. O açúcar invertido e a glutamina alteram a cor do açúcar durante a evaporação e a cristalização, como consequência da reação Maillard, impacta na qualidade do açúcar branco (MAHN, HOFFMANN E MARLANDER, 2002).

1.9 Colágeno

O colágeno é uma proteína de importância fundamental na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo. O colágeno possui 3 hélices, que são formadas por glicina (que representa 1/3 da sequência), prolina e lisina, unidas por ligações covalentes. A desnaturação do colágeno é causada pelo rompimento das ligações covalentes, causando o rompimento da estrutura helicoidal.

No corpo humano, o colágeno desempenha várias funções, como, por exemplo, unindo e fortalecendo os tecidos. A deficiência de colágeno no organismo denomina-se colagenoses, acarretando alguns problemas como má formação óssea, rigidez muscular, problemas com o crescimento, inflamação nas juntas musculares, doenças cutâneas, entre outros.

O colágeno tem aplicação em diversas áreas. No setor alimentício, ele é usado na fabricação de iogurtes, embutidos (salsichas, presunto, rosbife e etc...) e para sobremesas de fácil preparo (sobremesas de gelatinas, pudins e maria-mole), sendo também muito utilizado na indústria cosmética e farmacêutica (na produção

de cápsulas moles e duras de gelatina). A gelatina é um adjuvante farmacêutico obtido comercialmente pela hidrólise controlada do colágeno de tecido animal.

O colágeno, assim como muitas proteínas e materiais semelhantes às proteínas, pode ser precipitado em solução aquosa pela aplicação de calor ou adição de eletrólitos. Essa reação pode ser utilizada para produzir, de forma reprodutível, partículas de vários tamanhos. As partículas produzidas dessa forma podem ser utilizadas como carreadoras de fármacos, especialmente, e outras proteínas ou polipeptídios.

Geiger e Friess (2002 a e b) obtiveram folhas flexíveis e estéreis de colágeno, a partir de uma solução de colágeno, que foram secas na forma de esponja. O colágeno produzido desta forma pode ser utilizado para hemóstase, cicatrização de feridas e como sistema carreador de fármacos (especialmente para aplicações locais de antibióticos). Já Friess et al. (1996) incorporaram um antineoplásico proteoglicano de alto peso molecular, obtido a partir do *Mycobacterium Bovis* (BCG), dentro de folhas de colágeno, que foi entregue *in vivo* e *in vitro*.

1.10 Calêndula

Calendula é um gênero pequeno (12-20 espécies). A Calendula officinalis L. (Asteraceae) é uma planta originária do Egito, foi importada para a Europa no século XII e trazida para o Brasil no século XVIII, sendo cultivada como planta ornamental e medicinal. Trata-se de uma planta herbácea anual, com 30 a 60 cm de altura que apresenta capítulos florais largos, com cerca de 4,0 cm de diâmetro, terminais e solitárias. A coloração das pétalas varia do amarelo ao laranja, sendo as centrais tubulosas e periféricas liguladas com floração entre março e julho (CORRÊA et al., 2003, PAOLINI et al., 2010).

As flores abrem-se ao nascer do sol e se fecham ao entardecer. O florescimento ocorre normalmente no final da primavera até o final do verão (SILVA JUNIOR, 2006). No Brasil, a planta é conhecida popularmente como calêndula, calêndula-hortense, maravilha-dos-jardins ou malmequer (CORRÊA, 2003).

Desde a antiguidade, as pessoas usam as plantas e seus extratos para acelerar o processo de cicatrização. Frequentemente este uso é feito de modo empírico, baseado na tradição. As preparações de Calendula são usadas para

cicatrização de feridas, mas sem o conhecimento do seu modo de ação (FRONZA et al., 2010)

O uso medicinal dessa planta remonta à Antiguidade (ALONSO, 1998). Muitas propriedades farmacológicas são atribuídas à *Calendula officinalis* (calêndula), dentre elas: colerética, anti-inflamatória, analgésica, bactericida, sedativa, diurética, cicatrizante e imunomoduladora (BLUMENTHAL, 1998; FRANCO, 1996; RAMOS et al., 1998, ZITTERL-EGLESSER et al., 1997, FRONZA et al., 2009).

A flor da calêndula tem grande importância na medicina popular da Europa e do oeste da Ásia, onde é utilizada para o tratamento de órgãos inflamados, úlcera gástrica, dismenorreia, infecções urinárias. Externamente, é utilizada para tratar inflamações na mucosa oral (YOSHIKAWA et al., 2001).

Por ser uma planta com efeitos anti-inflamatórios, a calêndula é muito utilizada no Brasil como medicamento. O chá das flores, quando ingerido, apresenta ação antiespasmódica, expectorante, antiabortiva e auxilia no tratamento de anemias. Externamente, o chá das flores de calêndula é usado para combater inflamações, tratar feridas e icterícia. O alcoolato das pétalas maceradas de calêndula é utilizado em compressas para tratar feridas abertas (KORBES, 1995; MICHALAK, 1997, FRONZA et al., 2009).

O extrato das flores da calêndula, nas formas farmacêuticas de tintura, infusão, gel, creme e pomada, é amplamente utilizado como anti-inflamatório e cicatrizante para pele e mucosa (DELLA-LOGGIA et al.,1994; ZITTERL-EGLESSER et al., 1997; BLUMENTHAL, 1998). Os compostos da calêndula com ação anti-inflamatória e antioxidante pertencem ao grupo dos flavonoides. No Brasil, o uso tópico da calêndula, como anti-inflamatório e cicatrizante, em doses diárias de 8,8 a 17,6 mg de flavonoides, está regulamentado pela RE nº 89, de 16 de março de 2004, da ANVISA (BRASIL, 2004).

A flor é a parte mais utilizada e estudada da calêndula. Os principais constituintes químicos encontrados na flor da calêndula são os compostos flavonoides, os óleos essenciais, com derivados oxigenados de sesquiterpenoides, e diversas saponinas. Nas flores da calêndula também são encontrados alguns triterpenos, terpenos oligoglicosídeos e flavonoides glicosilados (BLUMENTHAL, 1998).

Os terpenoides são constituintes de óleos voláteis encontrados em plantas aromáticas, sendo os monoterpenos os mais frequentes (90%). São substâncias que exercem diferentes funções ecológicas, como inibidores da germinação, na proteção contra predadores, na atração de polinizadores, entre outras. A presença do aroma produzido pelos óleos voláteis pode estar envolvida na atração de polinizadores, sendo que, dentre os insetos, as abelhas e as borboletas são frequentemente atraídas por aromas de diversas flores. Também há evidências de que algumas plantas produzem óleos voláteis tóxicos, como proteção contra predadores e infestantes (SIMÕES; 2004).

Entre compostos flavonoides com ação anti-inflamatória, destacam o faradiol, o arnidiol e o calenduladiol (AKIHISA et al., 1996). A atividade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de *C. officinalis* tem sido demonstrada. A atividade antioxidante é o possível mecanismo de ação para a atividade anti-inflamatória da calêndula. Cordova et al. (2002) investigaram o extrato butanólico de *C. officinalis* contra a peroxidação lipídica de microssomas de fígado de rato e a ação *scavenger* de radicais livres. Os resultados obtidos sugeriram que a fração butanólica possui ação *scavenger* e atividade antioxidante significativa. Herold et al. (2003) investigaram o potencial efeito antioxidante da *C. officinalis* e confirmaram a sua ação *scavenger* para diversas espécies reativas de oxigênio. Esta ação pode estar relacionada à propriedade anti-inflamatória da *C. officinalis*, podendo ser uma importante ferramenta para novos agentes anti-inflamatórios (CORDOVA et al., 2002; HEROLD et al., 2003).

Em estudo realizado por Ukiya et al. (2006), avaliou-se a atividade antiinflamatória de diversos compostos isolados das flores da *C. officinalis*, incluindo dez triterpenos glicosilados. Os resultados obtidos mostraram que nove dos dez triterpenos avaliados possuíam potente ação contra a inflamação induzida por TPA em camundongos. Neste estudo, também foram isolados quatro novos compostos triterpênicos (calendulaglicosídeo A 6'-O-metil éster, calendulaglicosídeo A 6'-O-nbutil éster, calendulaglicosídeo B 6'-O-n-butil éster e calendulaglicosídeo C 6'-O-nbutil éster) que também mostraram efeito anti-inflamatório.

Utilizando o edema de orelha de rato induzido por óleo de cróton, Parente et al. (2003) não encontraram indícios de atividade anti-inflamatória do extrato etanólico de calêndula, administrado por via oral nas doses de 0,1; 0,3; e 1,0 g/kg.

1.11 Produção de vinho e vinagre

O gênero *Gluconacetobacter*, do grupo das bactérias ácido-acético, é em parte responsável pela propagação da cultura mãe do vinagre (MOV). Mãe do vinagre é o antigo nome dado à película ou ao filme de celulose formado no vinagre. A película formada na superfície do vinagre é comumente chamada de SCOBY (Cultura Simbiótica de Bactéria e Levedura)

O vinagre pode ser produzido a partir de vinho (vinagre de vinho), suco de frutas, como laranja, pêssegos, abacaxi, uva, goiaba vermelha, banana, ou vegetais frescos. O processo de formação da membrana no vinagre é acelerado com adição de aproximadamente 5% do volume de MOV (ou vinagre produzido anteriormente e não pasteurizado) como inóculo.

As cepas normalmente encontradas nas polpas de frutas – e que são responsáveis por fermentá-las, são Acetobacter xylinum, Acetobacter xylinoides, Acetobacter ketogenum, Saccharomycodes ludwigi, Saccharomycodes apiculatus, Schizosaccharomyces pombe, Zygosaccharomyes, Saccharomyces cerevisiae.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste projeto é obter uma biomembrana de celulose, em meio de cultura composto por folhas de chá verde (banchá), sucos (resíduos) de frutas (laranja, mamão e abacaxi), legume (beterraba), vinho e colágeno, incorporando extrato hidroalcoólico de calêndula à biomembrana, para sua futura a aplicação no tratamento de feridas da pele e queimadura, já que a calêndula possui propriedades cicatrizantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência da concentração inicial de sacarose, da concentração do suco de fruta, do suco de beterraba e do vinho adicionado ao meio de chá verde e a influência da concentração inicial de inóculo, na massa da biomembrana (g de celulose durante o cultivo), na produtividade de celulose (g de celulose/dia) e no fator de conversão de açúcar em celulose (g de celulose/g de açúcar).
- Incorporar o extrato hidroalcoólico (1:1) de calêndula à biomembrana de celulose.
- Avaliar a influência da adição de colágeno no meio de chá verde, na produção da biomembrana.
- Caracterizar a biomembrana obtida nos diferentes meios de cultivo através das análises de FTIR, BET, DSC, Tração, Alongamento, Tensão a punção e Absorção de água e calendula

3 RACIONAL e JUSTICATIVA

Este projeto visou à implantação de uma nova linha de pesquisa no laboratório, com a utilização de técnicas simples, que pudessem ser realizadas em qualquer região do país, para obtenção de um produto com alto valor agregado, baixo custo e para sua futura aplicação clínica.

Com este intuito, o produto escolhido foi à celulose bacteriana, que tem propriedades químicas, físicas e biológicas únicas, que possibilitam seu uso em diversas aplicações, já citados.

Neste projeto, optou-se pela utilização de resíduos de frutas e vegetais, para a obtenção de CB, por reduzir o custo da produção, para aproveitar a quantidade de alimentos que são descartados, por auxiliar no desenvolvimento de regiões com baixo poder aquisitivo, por converter resíduos em um produto com elevado valor agregado, além de contribuir para a conservação do planeta (ambientalmente correto e sustentável).

As folhas de chá verde foram utilizadas para obter CB, porque a *Camellia sinensis* é uma planta tradicionalmente usada no Oriente para produzir o Kombuchá (um chá fermentado com propriedades medicinais) e comercializada em todo território nacional, ter baixo custo, produzir um meio de cultivo padronizado, possuir substâncias bacteriostáticas. Os meios de cultivo de sucos de frutas e vegetais foram utilizados por permitirem o aproveitamento dos resíduos de frutas, por reduzirem o custo e por aumentarem a quantidade de celulose.

A incorporação de fitoterápicos, como a calêndula, foi realizada com o objetivo de adicionar propriedades farmacológicas à membrana de celulose, permitindo seu uso como substituto da pele, auxiliando na cicatrização de feridas da pele e no tratamento de queimaduras.

A membrana de celulose bacteriana obtida na superfície do meio de cultivo, no projeto, foi denominada biomembrana ou biomembrana de celulose.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismo / inóculo

Os microrganismos utilizados para produção da biomembrana de celulose foram o *Gluconacetobacter xylinus* (ATCC 23769), procedentes da Fundação André Tosselo, localizada em Campinas, São Paulo, Brasil, e o *Saccharomyces cerevisiae* (fermento biológico fresco, Fermix, lote: 293746 2 04, validade Fevereiro/2014), adquirido em um supermercado de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Foram utilizados dois tipos de inóculos: Cultura mista (*Gluconacetobacter xylinus e Saccharomyces cerevisiae*) e Vinagre forte (vinho fermentado com *Saccharovmyces cerevisiae*).

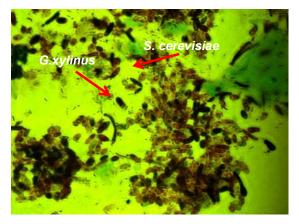
4.1.1 Produção do inóculo: cultura mista

As células liofilizadas de *Gluconacetobacter xylinus* (ATCC 23769) (10 mg) foram ressuspendidas em 250 mL de meio manitol (extrato de levedura (5g/L), peptona (3,0 g/L), manitol (25 g/L), ágar (15 g/L) e água destilada, previamente fervida (q.s.p. 1 L)), incubadas por 7 dias a $28 \pm 2^{\circ}$ C em condições estáticas. Após esse período, uma película se formou na interface ar-meio.

Para formar o pré-inoculo, 150 mL de meio fermentado e a película formada foram adicionados em meio manitol com chá verde (extrato de levedura (5 g/L), peptona (3,0 g/L), ágar (15 g/L), manitol (25 g/L), chá verde (folhas de chá verde: 7g/L - q.s.p. 1 L)). O pré-inóculo foi formado após 7 dias de cultivo em condições estáticas a 28 ± 2 °C.

O inóculo (Figura 4) foi formado após 10 dias de cultivo em condições estática a $28 \pm 2^{\circ}$ C de 150 mL de pré-inóculo, acrescido de 250 mg de células secas de *Saccharomyces cerevisiae* em 250 mL de meio de chá verde (folhas de chá verde: 7 g/L e 3,5 g de sacarose).

O inóculo foi conservado em meio de chá verde (folhas de chá verde (7 g/L), sacarose (50 g/L) e água destilada previamente fervida (q.s.p. 1 L)).



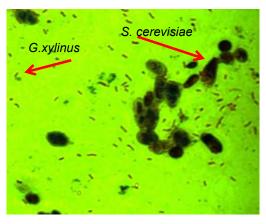


Figura 4. Microscopia ótica da flora microbiana responsável pela produção da membrana de celulose (*G. xylinus* e *S. cerevisiae*), com aumento de 10.000 vezes (Autor: Denise Vieira, Ano: 2010).

4.1.2 Produção do inóculo: vinagre forte

O vinagre forte foi produzido a partir da fermentação acética do vinho com *Saccharomyces cerevisiae*. Para a produção do vinagre forte foram utilizados 500 mL de vinho (vinho tinto com teor alcoólico de 11% (v/v)) diluído com 300 mL de água destilada, previamente fervida e inoculado com 7,5 g de fermento biológico fresco, em béquer de 1 L, que foi coberto com gaze e mantido a 28 ± 2°C, sob condições estáticas por 60 dias.

4.2 Meio de cultivo

Os componentes utilizados para produzir os meios de cultivo foram: folhas de chá verde (*Camellia sinensis*), abacaxi (*Ananas comosus*), mamão (*Carica papaya*), colágeno, manitol, beterraba (*Beta vulgaris*), laranja (*Citrus sinensis*), vinho, água destilada, extrato de levedura, peptona, manitol, ágar e sacarose (açúcar cristal).

As frutas e a beterraba utilizada para preparar os meios de cultivo foram adquiridas em uma feira livre de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Na Tabela 2 é apresentada a composição dos meios de cultivos utilizados para obter a biomembrana de celulose.

Tabela 2. Composição meios de cultivos

Tipo de meio de cultivo	Composição
Meio de cultivo de chá verde	Folhas chá verde (7 g/L),
(Camellia sinensis)	 Sacarose (9 g/L – 315 g/L),
	Água destilada previamente fervida (q.s.p 1 L)
Meio de cultivo de abacaxi	Abacaxi (1,7 kg/L),
(Ananas comosus)	 Folhas de chá verde (7 g/L)
	Sacarose (100 g/L)
	Água destilada previamente fervida (q.s.p. 1 L)
Meio de cultura de mamão	 Suco de mamão (500 mL/L – 800 mL/L)
(Carica papaya)	 Folhas de chá verde (7 g/L)
	 Suco de laranja (50 mL/L – 330 mL/L)
	 Sacarose (50 g/L, 83 g/L e 100 g/L)
	Água destilada previamente fervida (q.s.p 1 L)

Meio de cultivo de chá com	Folhas de chá verde (7 g/L)
adição de colágeno	• Gelatina sem sabor (5 g/L; 10 g/L, 12 g/L, 15
	g/L e 25 g/L),
	Sacarose (50 g/L)
	 Água destilada, previamente fervida (q.s.p 1 L)
Meio de cultivo manitol	Extrato de levedura (5 g/L)
	Peptona (3,0 g/L)
	Manitol (25 g/L)
	 Ágar (15 g/L)
	 Água destilada, previamente fervida (q.s.p. 1 L)
Meio de cultivo manitol com chá	Extrato de levedura (5 g/L)
verde	Peptona (3,0 g/L)
	 Manitol (25 g/L)
	 Ágar (15 g/L)
	 Folhas de chá verde (7 g/L)
	 Água destilada, previamente fervida (q.s.p. 1 L)
Meio de cultivo de beterraba	Folha de chá verde (7 g/L)
(Beta vulgaris)	• Suco de beterraba (equivalente a 9 – 75 g/L de
	sacarose)
	 Água destilada, previamente fervida (q.s.p. 1 L)
Meio de cultivo de laranja	Suco de laranja (80 mL/L – 250 mL/L)
(Citrus sinensis)	 Folhas de chá verde (7 g/L)
	 Sacarose (50 g/L, 65 g/L, 69 g/L e 100 g/L),
	 Água destilada, previamente fervida (q.s.p. 1 L)
Meio de cultivo de vinho	• Vinho (vinho tinto, teor alcoólico 11%, 170-500
	mL/L)
	 Folhas de chá verde (7 g/L)
	• Sacarose (50, 83 e 100 g/L)
	 Água destilada previamente fervida (q.s.p. 1 L)

O meio de chá verde foi preparado infundindo 7 g de folhas de chá verde (as folhas de chá verde foram enroladas em gaze na forma de um sachê) durante 20 a 30 minutos

Para preparar os meios de frutas e de beterraba, as frutas e a beterraba foram lavadas, descascadas, cortadas em pedaços. Os pedaços de frutas foram pesados e processados em uma centrifuga (Centrifuga de Alimentos Super Juicer Deluxe 700W - Winner Tech, São Paulo, Brasil) para produzir suco. Em um frasco foram adicionados o suco de fruta, o chá verde e a água destilada previamente fervida, para completar o volume (1 L).

Para preparar o meio de chá com adição de colágeno, a concentração desejada de colágeno foi desejada adicionada ao meio de chá verde.

Para preparar o meio de manitol foram diluídos 5 g de extrato de levedura, 3 g de peptona, 25 g de manitol, 15 g de ágar em 1 L de água destilada previamente filtrado. O meio de manitol com chá verde foi preparado da mesma forma que o meio de manitol, substituindo água por chá verde.

O meio de vinho foi preparado diluindo-se o vinho em água destilada e chá verde

A sacarose (açúcar cristal ou suco de beterraba) foi adicionada nos meios de cultivo até atingir a concentração de desejada. O teor de sacarose do meio foi determinado por um refratômetro.

O meio de manitol e de manitol com chá verde foram esterilizados em autoclave a 121°C por 30 minutos. Os meios de fruta e chá verde foram pausterizados antes da inoculação

4.3 Condições operacionais

Os meios de cultivo (600 mL) foram inoculados com 5 - 50% v/v de cultura mista em condições assépticas (todos os cultivos forma realizados em triplicata). Somente para inocular o meio de vinho foi utilizado vinagre forte (inóculo produzido em meio de vinho). Os frascos, contendo o meio de cultivo e o inóculo, foram fechados com gazes e um elástico. O recipiente fechado foi colocado em uma estufa e mantido a 28 ± 2°C, por diferentes intervalos de tempo (5, 7, 10, 15, 20, 25 e 30 dias), em condição estática.

Foi realizado o controle microbiológico do meio de cultura, inoculando-se 10 mL de meio de cultivo em 100 mL de meio TSB, como controle positivo foi utilizado o inóculo e como controle negativo foi utilizado água destilada esterilizada em autoclave a 121°C por 30 minutos.

Após o período de cultivo, a biomembrana formada na interface ar/meio foi removida com uma pinça esterilizada e lavada com água destilada para remover os componentes do meio de cultivo.

O valor do pH e a concentração de sacarose (°Brix) foram avaliados, tanto no início quanto no final do cultivo.

A biomembrana foi liofilizada (baseada nas informações das curvas de DSC), ou mantida em estufa a $50 \pm 2^{\circ}$ C até peso constante. O diâmetro e a espessura da biomembrana seca foram determinados com paquímetro digital (SON et al., 2001; BAE et al., 2004; NGUYEN et al., 2008; KUROSUMI et al., 2009).

Após a secagem, a biomembrana foi esterilizada em autoclave por 30 minutos, a 120°C com uma solução de NaoH 0,1 M, para eliminar os microorganismos presentes na biomembrana. Após a esterilização, a biomembrana foi imersa em extrato hidroalcoólico de calêndula (tintura diluída em 1:1 com álcool etílico 70% (v/v)). A tintura de calêndula (teor alcoólico 70% v/v) foi adquirida da farmácia de manipulação H&N Homeopatia e Produtos Naturais (certificada), localizada em São Paulo, São Paulo, Brasil.

Aproximadamente metade do mosto de fermentação (300 mL) foi armazenado em geladeira (2 - 8°C), para ser utilizado como inóculo nas fermentações posteriores.

4.4 Caracterização da película de celulose

4.4.1 Espectroscopia infravermelho (FTIR)

A FTIR foi realizada, para caracterizar a estrutura química da biomembrana, na Central Analítica do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo. A FTIR foi realizada em espectrômetro Bomem MB100. O espectro foi feito no comprimento de onda de 400 até 4.000 cm⁻¹ (SAIBUATONG et al., 2010).

4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As biomembranas liofilizadas foram recobertas com uma fina camada de platina, aproximadamente 5 mm. A microscopia foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura SEM-FEI (Leo Co., Oberkochen, Alemanha), operando a 4 kV – 10 kV e com aumento 5.000 a 30.000 vezes. A MEV foi usada para examinar as estrutura e a porosidade das biomembranas e foi realizada pelo Laboratório de Caracterização Tecnológica do Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

4.4.3 Propriedades mecânicas

4.4.3.1 Teste de punção

Os testes de punção foram realizados em um texturômetro Stable Microsystem TA-XT2 (São Paulo, SP, Brasil), de acordo com a norma ASTM D638. Os testes foram feitos em triplicata. As amostras, com área 1 cm² e espessura 1 mm, foram colocadas entre duas placas de alumínio e fixadas em um suporte, cujas medidas são apresentadas na Figura 5. Utilizou-se uma *probe* esférico de 5 mm de diâmetro. As espessuras foram medidas com paquímetro digital.

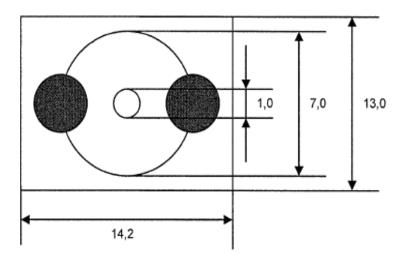


Figura 5. Medidas do acessório utilizado no teste de punção

Parâmetros utilizados:

Velocidade da fase pré-teste: 1,0 mm/s

Velocidade da fase teste: 0,2 mm/s

Velocidade da fase pós-teste: 2,0 mm/s

• Distância: 25 mm

O equipamento fornece a curva: força X deslocamento. A força até a perfuração da amostra (F), o deslocamento máximo da biomembrana (D) e a área sobre a curva (A_{sc}) foram determinados (BORGOGNONI, 2010).

4.4.3.2 Teste de tração e alongamento

Os testes de tração e alongamento foram realizados de acordo com a norma ABNT NBR NM ISO 1924-2:2012 (Anexo 2), pelo laboratório SINPACEL, em Curitiba, no Paraná.

Os testes foram realizados em triplicata, em um dinamômetro digital DI-500, sendo a distância entre as garras de 100 mm, a largura das amostras de 15 mm, a espessura das amostras de 1 mm e a velocidade de 10 mm/min.

Calculou-se a resistência à tração (kN/m), o alongamento (%) e a TEA (J/m²) (*Tensile energy absorbed*, que representa a quantidade de trabalho realizado para romper a amostra, calculada através da área sob a curva e a área da tira alongada).

4.4.5 Análise de superfície Brunauer-Emmett-Teller (BET)

O tamanho dos poros e a área da superfície da biomembrana de chá verde foram determinados em um analisador de área de superfície BET. Para remover a umidade, as amostras foram colocadas nas células de amostragem, aquecidas a 75°C, por 3 horas, e resfriadas à temperatura ambiente (25°C – 30°C) antes da análise por BET. O tamanho dos poros e da área da superfície foi determinado pela adsorção de N₂ a 350°C (SAIBUATONG et al., 2010).

4.4.6 Capacidade de Absorção de Água (CAA)

Para determinar a CAA, a biomembrana liofilizada (área: 10 mm², espessura 1 ± 0,5 mm) foi imersa em água destilada, em estufa à 35± 2 °C, até o equilíbrio (48 horas). Depois, a biomembrana foi removida da água, e o excesso de água retirado da superfície. A biomembrana foi pesada, em balança analítica. O processo foi repetido até peso constante (SAIBUATONG et al., 2010).

O conteúdo de água foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

CAA (%) =
$$\underline{Wh - Wd} \times 100$$
 (Fórmula 1)
Wd

Sendo: Wh o peso da biomembrana hidratada e Wd o peso da biomembrana seca (SAIBUATONG et al., 2010).

Este teste foi realizado em triplicata.

4.4.7 Capacidade de Absorção de Calêndula (CAC)

Para determinar a CAC, a biomembrana liofilizada (área: 10 mm², espessura 1 ± 0,5 mm) foi imersa no extrato hidroalcoólico de calêndula (tintura de calêndula diluída 1:1 com álcool etílico 70%(v/v)), em estufa à 35± 2 °C, até o equilíbrio (48 horas). Depois, a biomembrana foi removida do extrato e o excesso de extrato foi removido da superfície. A biomembrana foi pesada, em balança analítica e o processo foi repetido até não haver alteração de peso da biomembrana (SAIBUATONG et al., 2010).

O conteúdo de calêndula foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

CAC (%) =
$$\underline{Ch - Cd}$$
 X100 (Fórmula 2)

Sendo: Ch o peso da biomembrana com calêndula e Cd o peso da biomembrana seca (SAIBUATONG et al., 2010).

Este teste foi realizado em triplicata.

4.4.8 Teste de transferência

Este teste foi realizado, para verificar a porcentagem de extrato hidroalcoólico de calêndula, que a biomembrana com calêndula transfere para a biomembrana liofilizada. Para realizar este teste, uma biomembrana com extrato hidroalcoólico de calêndula (10 mm² e 1±0,5 mm de espessura) foi colocada em com uma biomembrana liofilizada (10 mm² e 1±0,5 mm de espessura) em uma estufa à 35±2°C, até atingir o equilíbrio (aproximadamente 48 horas). As biomembranas foram pesadas em balança analítica antes e depois de serem colocadas em contato, até não haver mais variação de peso.

A capacidade de transferência foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

TC (%) =
$$\frac{\text{W1a} - \text{W1b}}{\text{W1a}}$$
 X 100 (Fórmula 4)

Sendo: W1a o peso da biomembrana com calêndula antes da transferência e W1b o peso da biomembrana com calêndula após a transferência. Este teste foi realizado em triplicata.

4.4.9 Difração de Raio-X

O espectro de difração de Raio-X foi obtido em um difratômetro Scintag PADV theta-2-theta (Scintag, cupertino, CA), usando uma fonte de cobre de Raio-X. A varredura foi feita a 2 graus/minutos de 5 até 88 graus. As amostras (área: 1 cm², espessura: 1mm) foram liolifizadas para análise. O *software* MDI Jade 8 (Materials Data, Inc., Livermore, CA) foi usado para parametrizar, e para calcular a cristalinidade da biomembrana. O grau de cristalinidade foi calculado de acordo com a seguinte fórmula

Cr I =
$$(I_{200}-I_{am})$$
 (Fórmula 5)
 I_{200}

Sendo: I_{200} a intensidade total do pico a 2θ e lam a intensidade basal a 2θ .

4.4.10 DSC (Differential Scanning Calorimetric)

As curvas de DSC foram realizadas em equipamento DSC 822 da METTLER TOLEDO. Para a determinação das curvas de DSC, foram pesada 3 mg da biomembrana em recipientes de alumínio ("cadinhos") e resfriadas a uma temperatura de - 100 °C. Após o congelamento, as amostras foram aquecidas até temperatura 450°C, como descrito a seguir: Para a análise térmica da biomembrana pesou-se aproximadamente 3 mg de amostra efetuou-se o congelamento do material até temperatura de - 100 °C seguido de aquecimento até 450 °C. Em todas as etapas, utilizou-se taxa de resfriamento e aquecimento de 5 °C/min em atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.

4.5 Descarte do material

Os materiais utilizados para a obtenção da biomembrana foram descartados da seguinte forma:

- Os resíduos das frutas e dos vegetais utilizados para elaboração do meio de abacaxi, laranja, mamão e beterraba foram utilizados para compostagem.
- O mosto da fermentação foi utilizado para inocular novos meios de cultivos, e produzir novas biomembranas.

4.6 Forma de análise dos resultados

A partir dos dados obtidos durante a fermentação, calculou-se a produtividade (g celulose/dia) e o fator de conversão de sacarose em celulose (g celulose/g açúcar) da biomembrana de celulose, formada por *G. xylinus* e *S. cerevisiae*, nos diferentes meios de cultivo.

Foram construídas curvas da massa (g celulose), da produtividade (g celulose/dia.L), do fator de conversão (g celulose/ g sacarose) e da espessura (mm) da

biomembrana obtida nos diferentes meios de cultivo em função do tempo.

Avaliou-se a influência da composição do meio de cultivo, da concentração de inóculo e da concentração inicial de sacarose, na obtenção da biomembrana.

Verificou-se a composição química, as propriedades mecânicas (resistência à tração, punção e alongamento), a porosidade, a cristalinidade, a capacidade de absorção de água e de extrato hidroalcoólico de calêndula da biomembrana obtida nos diferentes meios de cultivo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, são apresentados e discutidos os dados, referentes à produção e à caracterização da biomembrana obtida nos diversos meios de cultivo (chá verde, abacaxi, mamão, chá com adição de colágeno, manitol com chá verde, vinho, laranja e beterraba).

Todos os cultivos foram conduzidos em condição estática, a 28 ± 2°C, inoculando-se o meio de chá verde com cultura mista. O sistema se tornou turvo depois de 3 a 4 dias de fermentação, uma película (biomembrana) se formou na superfície do meio de cultivo.

No estágio inicial da fermentação, a concentração de bactéria aumenta, consumindo o oxigênio dissolvido e produzindo celulose na fase líquida do meio de cultivo, tornando o meio de cultivo turvo. Quando termina o oxigênio dissolvido no meio, somente as células próximas à superfície continuam a produzir celulose, formando uma película (IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000).

Esta película serve para manter a posição da célula na superfície do meio de cultivo, para proteger as células do efeito letal da luz ultravioleta e dos outros microrganismos e aumentar a colonização celular, reter a umidade, prevenindo a desidratação, além de permitir a adesão das células em um ambiente aeróbio e facilitar a difusão dos nutrientes (IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000).

As bactérias abaixo da superfície estão apenas "inativas" e podem ser usadas para inocular novas culturas (IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000).

Uma tendência observada durante os cultivos foi que houve um período de indução de 10 dias após esse período notou um aumento da produção de celulose, isso porque o inoculo foi composto por dois microorganismos (*G. xylinus* e *S. cerevisiae*) que atuam em simbiose, o *S. cerevisiae* acidifica o meio de cultivo aumentando e facilitando a produção de celulose por *G. xylinus*.

5.1 Meio de cultivo de chá verde (Camellia sinensis)

O meio de chá verde foi utilizado como meio padrão para obtenção da biomembrana e serviu de base para comparação da obtenção de celulose nos demais meios por possuir substâncias bacteriostáticas, baixo custo, facilidade de obtenção e preparo, além de ser utilizado a milhares de anos para a obtenção da celulose bacteriana

A Figura 6 mostra o aspecto da biomembrana obtida em meio de chá verde em 10 dias de cultivo



Figura 6. Biomembrana obtida em meio de chá verde com 100 g/L de sacarose, pH inicial: 3,5, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: 28 \pm 2°C e tempo de cultivo: 10 dias (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012).

Na tabela 2 são apresentados os dados dos cultivos realizados em meio de chá verde, variou-se o tempo de cultivo (5, 7, 10, 15, 20 e 25 dias), a concentração de sacarose (9-315 g/L), a concentração de inoculo (5 -50 % p/v) e o pH inicial (2,5 -6,0) para avaliar a influencia desses parâmetros na obtenção da biomembrana.

Tabela 2. Dados dos cultivos realizados em meio de chá verde com os respectivos desvios padrões

Tempo			Chá									
de cultivo (dias)	Sacarose (g/L)	Inóculo (% v/v)	Chá verde (% v/v)	Diâmetro (cm)	Espessura (mm)	Peso (g)	Produdtividade (g celulose/dia.L)	Fator de Conversão (g celulose/ g açúcar)	pH inicial	pH final	Brix inicial	Brix final
5	128	25	100	11± 1	$0,66 \pm 0,04$	7,5±0,5	2,50±0,09	0,059±0,004	3,51	3,01	11	10
7	128	25	100	11± 1	1,07± 0,07	10,1±0,5	2,40±0,09	0,079±0,005	3,40	3,12	12	10
10	128	25	100	11± 1	1,13 ±0,05	14,5±0,9	2,42±0,09	0,113±0,007	3,39	3,00	12	11
15	128	25	100	11± 1	2,08 ±0,12	31,2±1,9	3,47±0,12	0,244±0,015	3,40	3,20	12	10
20	128	25	100	11± 1	4,76 ±0,29	50,3±3,0	4,19±0,15	0,393±0,024	3,47	2,95	12	9
5	100	25	100	11± 1	0,66±0,04	8,0±0,4	2,67±0,08	0,080±0,004	3,60	3,20	10	8
7	100	25	100	11± 1	1,20±0,08	10,3±0,7	2,45±0,07	0,103±0,005	3,43	3,32	9	8
10	100	25	100	11± 1	1,50±0,09	16,7±0,8	2,78±0,08	0,167±0,008	3,59	3,10	10	8
15	100	25	100	11± 1	1,70±0,08	18,8±0,9	2,08±0,06	0,188±0,009	3,50	3,41	4	4
20	100	25	100	11± 1	3,95±0,24	44,1±2,2	3,68±0,11	0,441±0,022	3,44	2,90	10	8
5	50	25	100	11± 1	0,87±0,04	4,4±0,2	1,45±0,04	0,087±0,004	3,80	3,52	5	4
10	50	25	100	11± 1	1,15±0,16	22,2±0,5	3,69±0,29	0,443±0,058	3,33	3,58	5	4
15	50	25	100	11± 1	1,67±0,15	33,5±0,2	3,72±0,23	0,669±0,035	3,50	3,47	4	4
20	50	25	100	11± 1	3,02 ±0,21	42,4±0,2	3,53±0,18	0,848±0,106	3,44	3,00	5	4
5	25	25	100	11± 1	0,48±0,02	5,2±0,4	1,73±0,04	0,205±0,010	3,50	3,10	3	1
7	25	25	100	11± 1	0,50±0,03	8,7±0,4	2,07±0,10	0,343±0,017	3,42	3,21	3	2
10	25	25	100	11± 1	0,76±0,05	20,5±1,0	3,42±0,17	0,809±0,040	3,52	3,13	3	1
15	25	25	100	11± 1	1,50±0,08	25,6±1,3	2,84±0,14	1,011±0,051	3,50	2,92	3	1
20	25	25	100	11± 1	2,00±0,10	41,5±2,1	3,46±0,17	1,638±0,082	3,62	3,10	3	1
7	12	25	100	11± 1	0,45±0,03	$3,8\pm0,2$	0,54±0,03	0,317±0,016	3,57	3,27	3	2
10	12	25	100	11± 1	1,07±0,05	10,2±0,5	1,02±0,05	0,850±0,043	3,58	3,08	2	1
15	12	25	100	11± 1	1,10±0,06	11,5±0,6	0,77±0,04	0,958±0,048	3,57	3,07	2	1
25	50	25	100	11± 1	2,11±0,10	35,6±1,2	2,373±0,051	0,712±0,0256	3,51	2,81	5	4

25	128	25	100	11± 1	3,96±0,10	47,4±2,4	3,16±0,16	0,370±0,019	3,60	3,15	13	10
25	100	25	100	11± 1	3,57±0,13	37,5±1,9	2,50±0,08	0,375±0,019	3,60	3,08	10	8
25	25	25	100	11± 1	1,93±0,13	40,0±3,0	2,67±0,12	1,600±0,118	3,62	3,20	3	1
7	9	25	100	11± 1	0,30±0,02	2,4±0,2	0,44±0,02	0,267±0,013	3,55	3,57	3	2
10	9	25	100	11± 1	1,00±0,06	6,5±0,4	1,20±0,07	0,722±0,051	3,60	3,16	2	1
12	9	25	100	11± 1	1,19±0,07	8,0±0,5	1,48±0,09	0,889±0,062	3,57	3,14	2	1
15	9	25	100	11± 1	1,29±0,07	15,7±0,9	2,91±0,17	1,744±0,122	3,40	2,97	2	1
18	9	25	100	11± 1	1,00±0,08	14,8±0,9	2,74±0,16	1,644±0,115	3,64	3,15	2	1
20	9	25	100	11± 1	0,83±0,09	13,7±0,8	2,54±0,15	1,522±0,107	3,63	3,07	2	1
7	18	25	100	11± 1	0,40±0,02	3,9±0,2	0,92±0,05	0,216±0,011	4,15	3,80	2	1
7	18	25	100	11± 1	0,40±0,02	3,5±0,2	0,83±0,04	0,194±0,010	4,15	3,80	2	1
10	18	25	100	11± 1	0,54±0,04	5,3±0,4	0,88±0,06	0,294±0,021	3,65	3,06	3	2
12	18	25	100	11± 1	1,00±0,05	8,1±0,4	1,13±0,06	0,450±0,023	3,67	3,02	3	2
15	18	25	100	11± 1	1,50±0,11	9,6±0,7	1,07±0,07	0,533±0,037	3,66	3,09	3	2
18	18	25	100	11± 1	3,00±0,15	16,4±0,8	1,52±0,08	0,911±0,046	3,54	2,97	3	2
20	18	25	100	11± 1	2,70±0,19	15,5±1,1	1,29±0,09	0,861±0,060	3,63	3,07	3	2
7	40	18	100	11± 1	1,50±0,20	6,3±0,6	1,50±0,08	0,158±0,014	3,40	2,98	4	2
7	50	35	100	11± 1	1,33±0,08	7,8±0,4	1,86±0,06	0,156±0,060	3,50	3,30	5	4
7	50	20	100	11± 1	0,65±0,03	8,0±0,8	1,90±0,12	0,160±0,044	3,50	3,20	5	4
7	50	25	100	11± 1	1,43±0,05	13,6±0,1	3,24±0,09	0,272±0,020	3,60	3,30	5	4
7	50	50	100	11± 1	0,81±0,08	$3,9\pm0,3$	0,93±0,06	0,012±0,007	3,60	3,10	5	4
10	60	50	100	11± 1	1,77±0,09	13,4±0,7	2,23±0,11	0,223±0,011	3,40	3,10	5	4
15	60	25	100	11± 1	0,69±0,03	8,8±0,4	0,98±0,05	0,147±0,007	3,93	3,50	5	4
7	50	25	100	11± 1	0,65±0,05	5,7±0,02	1,36±0,11	0,115±0,065	5,50	4,90	5	4
26	60	28	100	11± 1	1,45±0,07	12,4±0,6	0,79±0,04	0,207±0,010	4,27	3,71	6	5
7	50	25	100	11± 1	1,03±0,13	14,8±1,0	3,52±0,28	0,296±0,024	3,50	3,20	5	4
7	50	25	100	11± 1	1,30±0,18	11,9±0,7	2,83±0,18	0,238±0,010	3,20	2,90	5	4
7	50	25	100	11± 1	1,03±0,20	8,3±0,8	1,97±0,06	0,166±0,059	4,00	3,52	5	4

70	17	100	11± 1	1,50±0,30	13,6±2,5	2,27±0,60	0,194±0,050	4,00	3,60	7	6
70	17	100		1,20±0,10	14,0±0,3	1,56±0,04	0,200±0,020	3,60	3,19	7	6
50	40	100	11± 1	1,10±0,04	6,1±0,7	1,45±0,03	0,122±0,006	3,70	3,20	5	5
50	25	100	11± 1	0,96±0,05	5,6±0,5	0,93±0,10	0,112±0,022	4,16	3,52	5	4
50	25	100	11± 1	1,39±0,07	5,8±1,4	0,64±0,09	0,116±0,007	3,99	3,25	5	4
50	25	100	11± 1	2,96±0,15	10,3±1,2	0,86±0,12	0,206±0,012	3,97	3,22	5,5	5
50	25	100	11± 1	0,62±0,03	6,6±1,4	1,09±0,09	0,131±0,028	3,77	3,61	5	4
50	25	100	11± 1	0,34±0,02	2,5±0,5	0,35±0,10	0,050±0,003	3,77	3,18	4	4
50	25	100	11± 1	0,90±0,07	6,4±0,8	2,50±0,05	0,096±0,048	4,20	3,97	5	2
33	25	100	11± 1	0,90±0,06	6,3±0,4	1,50±0,05	0,189±0,048	3,57	3,05	3	2
33	25	100	11± 1	0,16±0,01	3,4±0,2	0,38±0,02	0,102±0,005	3,80	3,73	4	2
33	25	100	11± 1	0,53±0,03	3,5±0,2	0,39±0,02	0,105±0,005	3,78	3,70	4	2
67	25	100	11± 1	1,30±0,06	10,9±0,8	2,60±0,05	0,164±0,048	3,67	3,70	8	4
67	25	100	11± 1	0,30±0,02	3,3±0,2	0,79±0,04	0,050±0,002	3,75	3,65	5	3
100	25	100		0,85±0,04	7,0±0,4	1,17±0,06	0,070±0,004	4,18	3,24	9	9
100	25	100	11± 1	0,64±0,03	4,0±0,2	0,67±0,03	0,040±0,002	4,12	3,33	8	8
150	36	100	11± 1	0,57±0,03	5,5±0,03	2,50±0,03	0,037±0,029	6,00	4,58	5	4
165	17	100	11± 1	0,87±0,05	8,9±2,7	2,12±0,15	0,054±0,003	4,30	4,70	12	10
175	25	100	11± 1	0,57±0,04	10,0±0,7	2,39±0,07	0,057±0,003	3,50	3,00	15	13
50	25	100	11± 1	0,53±0,04	9,5±0,8	2,26±0,02	0,190±0,420	2,50	2,38	5	4
50	45	100		0,96±0,05	4,0±0,2	0,96±0,03	0,011±0,001	3,50	3,20	5	4
50	10	100	11± 1	0,52±0,03	3,4±0,1	0,81±0,05	0,068±0,001	3,50	3,10	4	1
230	7	100		0,50±0,03	2,5±0,1	0,60±0,03	0,011±0,001	3,00	2,70	20	18
50	5	100		0,50±0,03	3,0±0,2	$0,70\pm0,02$	0,059±0,003	3,50	3,15	5	4
50	15	100		0,57±0,03	5,1±0,2	1,21±0,04	0,102±0,001	3,50	3,20	5	4
230	15	100		0,50±0,03	2,5±0,1	$0,60\pm0,03$	0,011±0,001	3,00	2,80	20	18
230	20	100	11± 1	0,75±0,45	6,8±0,4	1,61±0,05	0,029±0,001	4,20	4,12	20	15
50	25	100	11± 1	0,75±0,05	6,1±0,1	1,44±0,10	0,121±0,008	5,00	4,60	5	4
	70 50 50 50 50 50 50 50 33 33 33 67 67 100 100 150 165 175 50 50 230 50 230 230	70 17 50 40 50 25 50 25 50 25 50 25 50 25 50 25 33 25 33 25 67 25 100 25 100 25 150 36 165 17 175 25 50 25 50 45 50 10 230 7 50 5 50 15 230 15 230 20	70 17 100 50 40 100 50 25 100 50 25 100 50 25 100 50 25 100 50 25 100 50 25 100 33 25 100 33 25 100 67 25 100 67 25 100 100 25 100 100 25 100 150 36 100 165 17 100 50 25 100 50 45 100 50 45 100 50 5 100 50 5 100 50 5 100 50 5 100 50 5 100 50 5 100 50 5 100 50 5 100 230 15	70 17 100 11± 1 50 40 100 11± 1 50 25 100 11± 1 50 25 100 11± 1 50 25 100 11± 1 50 25 100 11± 1 50 25 100 11± 1 50 25 100 11± 1 33 25 100 11± 1 33 25 100 11± 1 67 25 100 11± 1 67 25 100 11± 1 100 25 100 11± 1 100 25 100 11± 1 150 36 100 11± 1 175 25 100 11± 1 175 25 100 11± 1 175 25 100 11± 1 175 25 100 11± 1 175 25 100 11± 1 170 10 10 11± 1 170	70	70	70 17 100 11±1 1,20±0,10 14,0±0,3 1,56±0,04 50 40 100 11±1 1,10±0,04 6,1±0,7 1,45±0,03 50 25 100 11±1 0,96±0,05 5,6±0,5 0,93±0,10 50 25 100 11±1 1,39±0,07 5,8±1,4 0,64±0,09 50 25 100 11±1 0,62±0,03 6,6±1,4 1,09±0,09 50 25 100 11±1 0,34±0,02 2,5±0,5 0,35±0,10 50 25 100 11±1 0,90±0,07 6,4±0,8 2,50±0,05 33 25 100 11±1 0,90±0,07 6,4±0,8 2,50±0,05 33 25 100 11±1 0,90±0,06 6,3±0,4 1,50±0,05 33 25 100 11±1 0,16±0,01 3,4±0,2 0,38±0,02 33 25 100 11±1 0,53±0,03 3,5±0,2 0,39±0,02 67 25 100 11±1 1,30±0,06 10,9±0,8 2,60±0,05 67 25 100 11±1 0,30±0,02 3,3±0,2 0,79±0,04 100 25 100 11±1 0,30±0,02 3,3±0,2 0,79±0,04 100 25 100 11±1 0,64±0,01 4,0±0,2 0,67±0,03 150 36 100 11±1 0,64±0,03 4,0±0,2 0,67±0,03 150 36 100 11±1 0,57±0,03 5,5±0,03 2,50±0,03 165 17 100 11±1 0,57±0,04 10,0±0,7 2,39±0,07 50 25 100 11±1 0,57±0,04 10,0±0,7 2,39±0,07 50 25 100 11±1 0,55±0,04 7,0±0,4 1,17±0,06 101 11±1 0,50±0,05 8,9±2,7 2,12±0,15 175 25 100 11±1 0,57±0,04 10,0±0,7 2,39±0,07 50 25 100 11±1 0,50±0,03 3,4±0,1 0,81±0,05 230 7 100 11±1 0,50±0,03 2,5±0,1 0,60±0,03 50 5 100 11±1 0,50±0,03 2,5±0,1 0,60±0,03 50 5 100 11±1 0,50±0,03 2,5±0,1 0,60±0,03 50 5 100 11±1 0,50±0,03 2,5±0,1 0,60±0,03 230 20 100 11±1 0,57±0,45 6,8±0,4 1,61±0,05	70	70	70	70 17 100 11± 1 1,20±0,10 14,0±0,3 1,56±0,04 0,200±0,020 3,60 3,19 7 50 40 100 11± 1 1,10±0,04 6,1±0,7 1,45±0,03 0,122±0,006 3,70 3,20 5 50 25 100 11± 1 0,96±0,05 5,6±0,5 0,93±0,10 0,112±0,022 4,16 3,52 5 50 25 100 11± 1 2,96±0,15 10,3±1,2 0,86±0,12 0,206±0,012 3,97 3,22 5,5 50 25 100 11± 1 0,62±0,03 6,6±1,4 1,09±0,09 0,131±0,028 3,77 3,61 5 50 25 100 11± 1 0,90±0,07 6,4±0,8 2,50±0,05 0,96±0,048 4,20 3,97 5 50 25 100 11± 1 0,90±0,07 6,4±0,8 2,50±0,05 0,96±0,048 4,20 3,97 5 33 25 100 11± 1 0,90±0,06 6,3±0,4 1,50±0,05 0,189±0,048 3,57 3,05 3 33 25 100 11± 1 0,90±0,06 6,3±0,4 1,50±0,05 0,189±0,048 3,57 3,05 3 33 25 100 11± 1 0,53±0,03 3,5±0,2 0,39±0,02 0,102±0,005 3,80 3,73 4 67 25 100 11± 1 0,53±0,03 3,5±0,2 0,39±0,02 0,102±0,005 3,78 3,70 4 67 25 100 11± 1 0,30±0,02 3,3±0,2 0,39±0,02 0,102±0,005 3,78 3,70 8 67 25 100 11± 1 0,30±0,02 3,3±0,2 0,79±0,04 0,050±0,002 3,75 3,65 5 100 25 100 11± 1 0,30±0,02 3,3±0,2 0,79±0,04 0,050±0,002 4,12 3,33 8 150 36 100 11± 1 0,85±0,04 7,0±0,4 1,17±0,06 0,070±0,004 4,18 3,24 9 100 25 100 11± 1 0,85±0,04 7,0±0,4 1,17±0,06 0,070±0,004 4,18 3,24 9 100 25 100 11± 1 0,85±0,03 5,5±0,03 2,50±0,03 0,040±0,002 4,12 3,33 8 150 36 100 11± 1 0,85±0,04 7,0±0,4 1,17±0,06 0,070±0,004 4,18 3,24 9 100 25 100 11± 1 0,85±0,04 7,0±0,4 1,17±0,06 0,070±0,004 4,18 3,24 9 100 25 100 11± 1 0,85±0,04 7,0±0,4 1,17±0,06 0,070±0,004 4,18 3,24 9 100 25 100 11± 1 0,85±0,03 5,5±0,03 2,50±0,03 0,037±0,029 6,00 4,58 5 165 17 100 11± 1 0,85±0,04 9,5±0,8 2,26±0,02 0,190±0,420 2,50 2,38 5 165 17 100 11± 1 0,53±0,03 3,4±0,1 0,8±0,05 0,068±0,001 3,50 3,10 4 230 7 100 11± 1 0,50±0,03 2,5±0,1 0,60±0,03 0,011±0,001 3,50 3,20 5 50 15 100 11± 1 0,50±0,03 2,5±0,1 0,60±0,03 0,011±0,001 3,50 3,20 5 50 15 100 11± 1 0,50±0,03 2,5±0,1 0,60±0,03 0,011±0,001 3,50 3,20 5 50 15 100 11± 1 0,50±0,03 2,5±0,1 0,60±0,03 0,011±0,001 3,50 3,20 5 50 15 100 11± 1 0,50±0,03 2,5±0,1 0,60±0,03 0,011±0,001 3,50 3,20 5 50 15 100 11± 1 0,50±0,03 2,5±0,1 0,60±0,03 0,011±0,001 3,00 2,80 20 230 20 100 11± 1 0,75±0,45 6,8±0,4 1,6±0,05 0,029±0,001 4,20

7	230	25	100	11± 1	0,53±0,04	9,5±0,8	2,26±0,07	0,041±0,002	3,60	3,20	20	12
7	245	18	100	11± 1	0,42±0,25	3,6±0,9	0,86±0,06	0,015±0,004	4,30	4,20	22	20
7	50	25	100	11± 1	0,93±0,07	6,4±0,1	1,52±0,03	0,128±0,010	3,00	2,58	5	4
7	285	36	100	11± 1	1,10±0,06	10,0±0,5	2,38±0,12	0,035±0,002	3,52	3,24	27	22
25	12	25	100	11± 1	1,7±0,09	9,5±0,5	0,63±0,03	0,792±0,040	3,48	3,12	5	4
20	12	25	100	11± 1	0,97±0,08	10,1±0,4	0,84±0,02	0,840±0,030	3,57	3,22	5,5	5
20	25	25	100	11± 1	1,6±0,08	7,4±0,4	0,62±0,03	0,296±0,015	3,57	3,02	5	4
20	315	17	100	11± 1	0,80±0,04	2,6±0,1	0,22±0,01	0,008±0,001	3,40	3,20	29	27
7	75	17	100	11± 1	1,45±0,31	12,2±4,3	2,92±0,31	0,163±0,029	3,58	3,50	8	5
15	75	30	100	11± 1	0,59±0,03	5,5±0,3	0,61±0,03	0,073±0,004	4,22	4,00	8	5
7	50	25	100	11± 1	1,03±0,30	8,8±0,8	2,08±0,07	0,175±0,095	3,70	3,48	5	4
15	75	17	100	11± 1	1,26±0,20	14,1±0,5	1,56±0,03	0,187±0,007	3,69	3,50	8	5
15	75	22	100	11± 1	1,27±0,06	9,8±0,5	1,09±0,05	0,131±0,007	4,04	3,70	8	5
15	85	11	100	11± 1	0,63±0,03	6,0±0,3	0,67±0,03	0,071±0,004	4,22	4,00	9	4
7	50	25	100	11± 1	0,37±0,01	$3,9\pm0,4$	0,93±0,05	0,078±0,004	3,79	3,10	5	4
7	50	25	100	11± 1	0,88±0,16	6,1±0,7	1,45±0,17	0,122±0,029	4,50	4,18	5	4
30	85	17	100	11± 1	5,00±0,25	71,3±3,6	3,96±0,20	0,839±0,042	5,00	4,30	7	2
15	85	22	100	11± 1	1,57±0,08	12,1±0,6	1,34±0,07	0,142±0,007	4,19	3,57	9	4
15	95	13	100	11± 1	1,25±0,06	14,2±0,7	1,58±0,08	0,149±0,007	4,19	3,42	10	7
15	95	22	100	11± 1	0,97±0,05	6,0±0,3	0,67±0,03	0,063±0,003	4,01	3,57	10	8
10	100	20	100	11± 1	1,00±0,05	8,9±0,4	1,48±0,07	0,089±0,004	3,52	3,52	8	7

Abaixo, são apresentados os gráficos da obtenção da biomembrana no meio de chá verde.

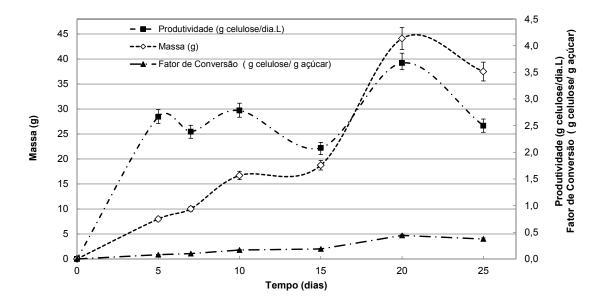


Figura 7. Variação da massa da biomembrana, do fator de conversão de açúcar em celulose e da produtividade com o respectivo desvio padrão em função do tempo, em meio de chá verde com 100 g/L de sacarose, pH inicial: $3,5 \pm 1$, temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}$ C e volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v).

Na Figura 7, observa-se que a massa da biomembrana aumenta linearmente em função do tempo, atingindo seu valor máximo (45 g) em 20 dias de cultivo; após este período, a massa diminui, porque, toda a sacarose (100 g/L) do meio de cultivo foi consumida e a celulose não é mais formada.

A produtividade aumentou linearmente até o quinto dia de cultivo. Em meio de chá verde, a produtividade máxima (4,0 g celulose/dia.L) é alcançada no vigésimo dia de cultivo. Após este período de cultivo, a produtividade diminui de maneira linear.

Para esta condição estudada (meio de chá verde, concentração de açúcar: 100 g/L, pH: 3,5 ± 1 e volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v)), o fator de conversão aumenta linearmente com o tempo e atinge o valor máximo (0,5 g celulose/g açúcar) em 20 dias de cultivo. Após este período, o fator diminuiu.

Uma tendência geralmente observada que a espessura da biomembrana, em condições estáticas, assim como a produção de celulose, aumenta após um período de indução. A espessura aumentou de 0 a 1 mm, em 7 dias de cultivo. A espessura

máxima de 4 mm foi alcançada 20 dias de cultivo. Após este período, a espessura tende a diminuir (Figura 8).

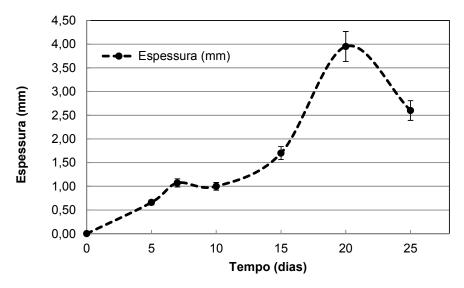


Figura 8. Variação da espessura com o respectivo desvio padrão em função do tempo, em meio de chá verde com 100 g/L de sacarose, pH inicial: 3.5 ± 1 , temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}$ C e volume de inóculo: 0.150 L (25% v/v).

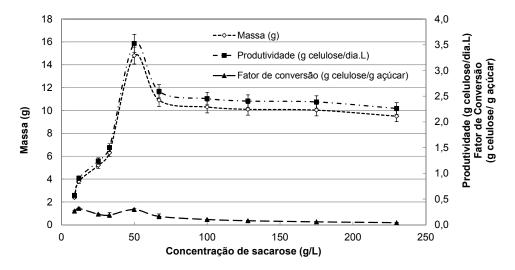


Figura 9. Massa da biomembrana, produtividade e fator de conversão de açúcar em celulose com os respectivos desvios padrões em função da concentração de sacarose, em meio de chá verde, volume de inóculo: 0,150 L (25 % v/v), pH inicial: $3,5\pm1$, temperatura de cultivo: $28\pm2^{\circ}$ C e tempo de cultivo: 7 dias.

Na Figura 9, observa-se que a massa da biomembrana aumenta com o aumento da concentração de sacarose, atingindo o valor máximo (15 g) com 50 g/L de sacarose. Quando a concentração de sacarose é maior que 50 g/L, a massa

diminui, mantendo-se praticamente constante com o aumento da concentração de sacarose. Os valores máximos da produtividade (3,5 g celulose/dia.L), do fator de conversão (0,25 g celulose/g açúcar) e da espessura (1,7 mm) (Figura 10) foram alcançados com 50 g/L de sacarose. Portanto, dentro das condições estudadas, a melhor concentração de sacarose é de 50 g/L para todos os parâmetros avaliados.

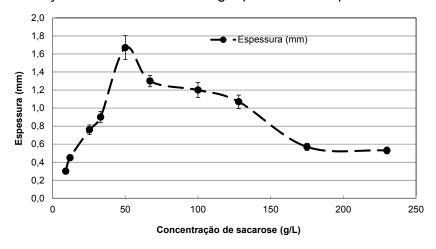
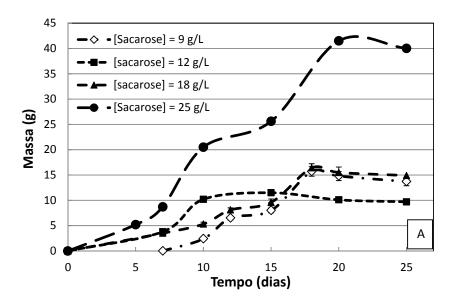


Figura 10. Espessura da biomembrana com o respectivo desvio padrão em função da concentração de sacarose, em meio de chá verde, volume de inóculo: 0,150 L (0,25 % v/v), pH inicial: $3,5 \pm 1$, temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}C$ e tempo de cultivo: 7 dias.

Na Figura 11 A e 11 B, abaixo, tem-se a curva da massa da biomembrana, em função do tempo, no meio de chá verde com diferentes concentrações de sacarose.



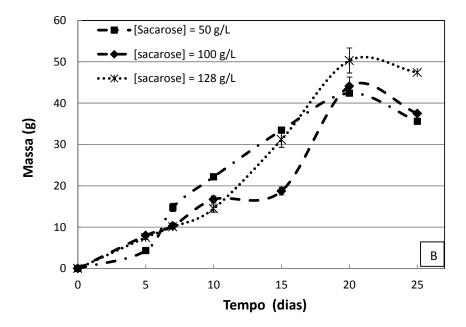


Figura 11. Massa da biomembrana com o respectivo desvio padrão obtida em meio de chá verde, utilizando diferentes concentrações de sacarose, em função do tempo, pH inicial: 3.5 ± 1 , temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}$ C e volume de inóculo: 0.150 L (25% v/v). A) Concentrações de sacarose: 9, 12, 18 e 25 g/L e B) Concentrações de sacarose: 50, 100 e 128 g/L.

A concentração de sacarose que produziu a biomembrana com maior massa (50 g de celulose) foi de 128 g/L, em 20 dias de cultivo (Figura 11 B). A massa aumenta em função do tempo; porque a biomembrana é formada até que toda a sacarose seja consumida. Após 20 dias de cultivo, a biomembrana obtida em meio de chá verde, com concentrações de sacarose de 100 g/L, 50 g/L e 25 g/L, atingiram aproximadamente a mesma massa (45 g de celulose). A maior massa obtida em meio de chá verde, com concentração de sacarose de 18 g/L e 9 g/L, foi de 16 g (Figura 11 A).

A maior massa da biomembrana em meio de chá verde com a concentração de 25 g/L de sacarose foi 2,7 vezes maior que a obtida com 18 g/L de sacarose.

Em 25 dias de cultivo, houve uma diminuição da massa de todas as biomembranas para todas as concentrações de sacarose estudadas.

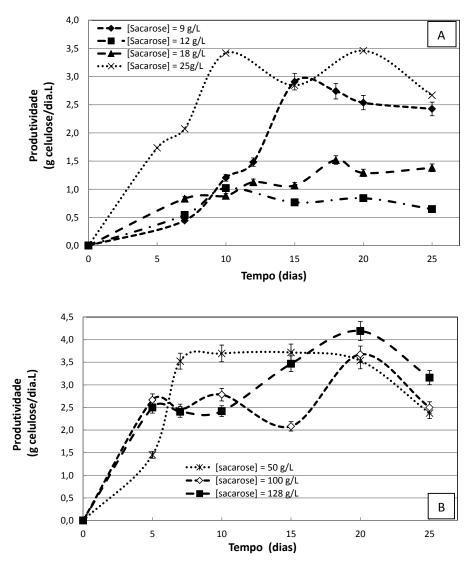


Figura 12. Produtividade da biomembrana com o respectivo desvio padrão, obtida em meio de chá verde, utilizando diferentes concentrações de sacarose em função do tempo, pH inicial: 3,5 ± 1, temperatura de cultivo: 28 ± 2°C e volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v). A) Concentrações de sacarose: 9, 12, 18 e 25 g/L e B) Concentrações de sacarose: 50, 100 e 128 g/L.

Na Figura 12, verifica-se que a maior produtividade (4 g celulose/dia.L), ocorreu com a concentração de sacarose de 128 g/L, em 20 dias de cultivo. Para a concentração de sacarose de 100 g/L, a maior produtividade foi também atingida no vigésimo dia. Já com a concentração de sacarose de 50 g/L, a produtividade aumentou linearmente com o tempo, atingido a produtividade máxima de 3,5 g celulose/dia.L no sétimo dia. A menor produtividade (1,0 g celulose/dia.L) foi obtida com a concentração de sacarose de 12 g/L, no décimo dia de cultivo. A maior

produtividade atingida nos meios com concentração de sacarose de 25 g/L, foi 3,5 g celulose/dia.L (10 dias de cultivo), este valor está muito próximo do máximo obtido.

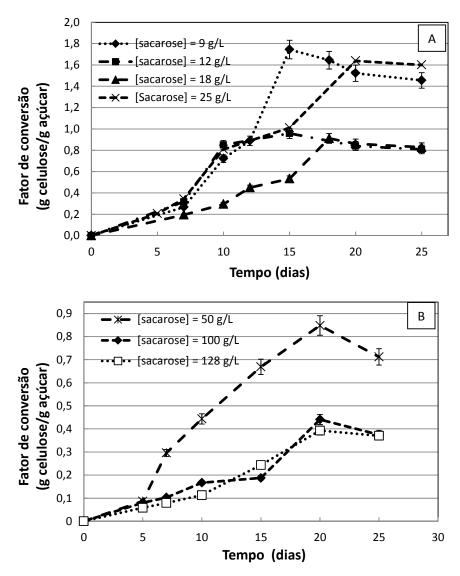


Figura 13. Fator de conversão de açúcar em celulose, em meio de chá verde, utilizando diferentes concentrações de açúcar, em função do tempo, pH inicial: 3,5±1, temperatura de cultivo: 28 ± 2°C e volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v). A) Concentrações de sacarose: 9, 12, 18 e 25 g/L e B) Concentrações de sacarose: 50, 100 e 128 g/L.

Na Figura 13, verifica-se que o maior fator de conversão (1,7 g celulose/g celulose) ocorre no meio de cultivo com concentração de sacarose de 9 g/L, em 15 dias de cultivo. Nos meios de cultivo, com concentrações de sacarose de 50 g/L, 100 g/L e 128 g/L, o maior fator de conversão foi alcançado no vigésimo dia. No meio de cultivo com concentração de sacarose 12 g/L, o maior fator de conversão foi atingido

no décimo quinto dia de cultivo, enquanto que, no meio de cultivo com concentração de sacarose de 18 g/L, o maior fator de conversão foi alcançado no décimo sétimo dia de cultivo. No meio de cultivo com concentração de sacarose de 25 g/L, o fator de conversão aumentou linearmente com o tempo, atingindo o valor máximo de 1,6 g celulose/g sacarose no vigésimo dia de cultivo.

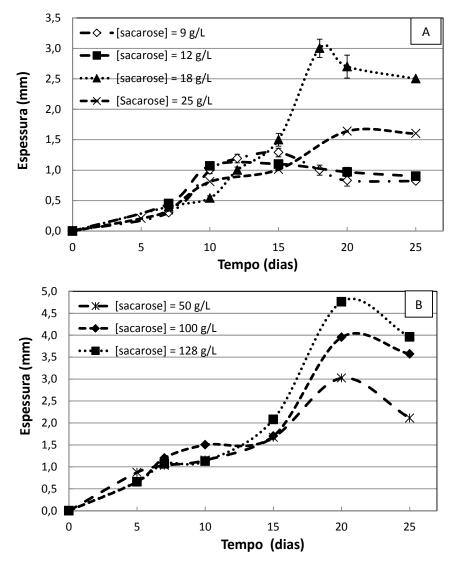


Figura 14. Espessura da biomembrana obtida em meio de chá verde e seu respectivo desvio padrão, utilizando diferentes concentrações de sacarose, em função do tempo, pH inicial: 3.5 ± 1 , temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}$ C e volume de inóculo: 0.150 L (25% v/v). A) Concentrações de sacarose: 9, 12, 18 e 25 g/L e B) Concentrações de sacarose: 50, 100 e 128 g/L.

Na Figura 14, verifica-se que a espessura máxima (5 mm) foi atingida no meio com concentração de sacarose de 128 g/L, no vigésimo dia de cultivo. Nos meios de cultivo com concentrações de sacarose de 50 g/L, 100g/L e 128g/L, a maior

espessura (3 mm, 4 mm e 5 mm, respectivamente) foi alcançada no vigésimo dia. Já nos meios de cultivo, com concentrações de sacarose de 9 g/L e 12 g/L, a maior espessura (1,3 mm e 1 mm, respectivamente) foi atingida no décimo quinto dia e, enquanto que, no meio de cultivo com concentração de sacarose de 18 g/L, a maior espessura (3 mm) foi alcançada no décimo sétimo dia de cultivo.

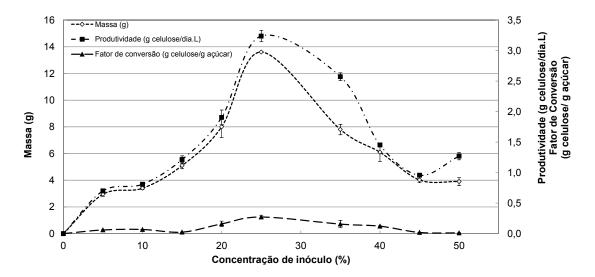


Figura 15. Massa da biomembrana, produtividade e fator de conversão de açúcar em celulose com os respectivos desvios padrões, em função da concentração de inóculo, em meio de chá verde com 50 g/L de sacarose, pH inicial: $3,5 \pm 1$, temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}$ C e tempo de cultivo: 7 dias.

Na Figura 15, observa-se que, a curva da massa em função do volume de inóculo é uma parábola. A massa atinge o valor máximo (13,9 g) com 25% v/v. Isso ocorre, porque o aumento do volume de inóculo gera uma competição entre os microrganismos pela sacarose e, diminui a quantidade de celulose obtida, já que a produção de celulose está relacionada com o crescimento celular. O efeito do volume de inóculo na produtividade e no fator de conversão é igual ao observado para a massa. A produtividade máxima (3,2 g celulose/dia.L) e o maior fator de conversão (0,21 g celulose/g açúcar) foram atingidos com volume de inóculo de 0,150 L (25% v/v). Portanto, nesta condição estudada (meio de chá verde, pH inicial 3,5 ± 1, concentração de sacarose 50 g/L e tempo de cultivo: 7dias), o melhor volume de inóculo foi de 25% v/v.

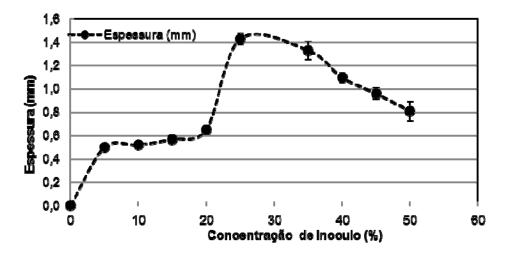


Figura 16. Espessura da biomembrana em função da concentração de inóculo, em meio de chá verde com 50 g/L de sacarose, pH inicial: 3.5 ± 1 , temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}$ C e tempo de cultivo: 7 dias

Na Figura 16, observa-se que a curva da espessura da biomembrana, em função do volume de inóculo, é uma parábola. A espessura atinge o valor máximo (1,4 mm) com 25% v/v de inóculo. Isso ocorre, porque o aumento do volume de inóculo gera competição entre os microrganismos pela sacarose, diminuindo a quantidade de celulose obtida, uma vez que, a produção de celulose está relacionada com o crescimento celular.

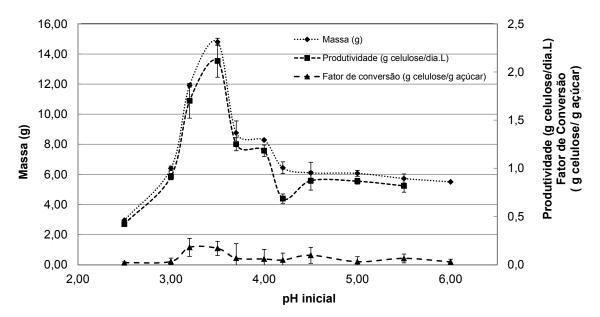


Figura 17. Massa da biomembrana, produtividade e fator de conversão de açúcar com os respectivos desvios padrões em função do pH inicial do meio, em meio de chá verde com 50 g/L de sacarose, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e tempo de cultivo: 7 dias.

Na Figura 17, observa-se que a curva da massa da biomembrana, em função do pH inicial do meio de cultivo, é uma parábola. O maior valor da massa da biomembrana (15 g) é atingido quando o pH inicial do meio de cultivo é 3,5. O efeito do pH inicial na produtividade e no fator de conversão é igual ao observado na massa da biomembrana. A produtividade máxima (2,2 g celulose/dia.L) e o valor máximo do fator de conversão (0,25 g celulose/g açúcar) são alcançados quando o pH inicial é 3,5.

Portanto, nas condições estudadas (meio de chá verde, 7 dias de cultivo, concentração de sacarose de 50 g/L e 25 % v/v de inóculo), o melhor valor de pH inicial é 3,5. Isso está de acordo com a literatura, pela qual a melhor faixa de pH inicial para o crescimento de *Acetobacter xylinum* está entre 3 e 6 (IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000), enquanto que 80% dos dados observados para produção de celulose foram obtidos quando o pH estava entre 3,5 e 7. Para a produção industrial, o pH entre 4 e 4,5 forneceu os melhores resultados, especialmente por evitar contaminação (CASTRO et al., 2012).

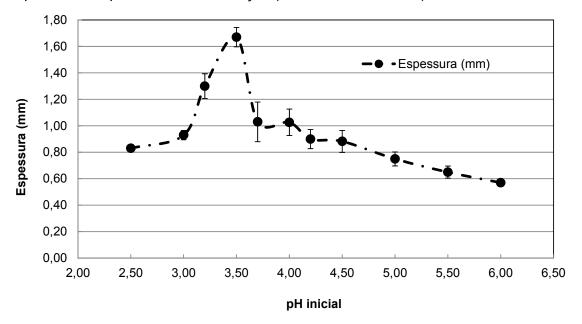


Figura 18. Espessura da biomembrana e seu respectivo desvio padrão em função do pH inicial do meio, em meio de chá verde com 50 g/L de sacarose, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e tempo de cultivo: 7 dias.

Na Figura 18, observa-se que a curva da espessura da biomembrana, em função do pH inicial do meio, é uma parábola. A espessura atinge o valor máximo (1,7 mm), quando o pH inicial do meio é 3,5.

Analisando os dados da Tabela 2, verificou-se que o pH praticamente não variou durante o processo fermentativo e que houve diminuição do grau Brix, devido ao consumo do sacarose.

5.2 Meio de cultivo de abacaxi (Ananas comosus)

O meio de abacaxi foi utilizado como meio de cultivo para a obtenção da biomembrana de celulose, devido ao seu valor de pH adequado, além de possuir ácido cítrico, que, em concentração adequada, aumenta a produção de celulose e bromelina, que poderia ser incorporada à biomembrana, durante o processo fermentativo, adicionando lhe propriedades cicatrizantes.

A Figura 19 mostra o aspecto da biomembrana obtida em meio de abacaxi, em 10 dias de cultivo.



Figura 19. Biomembrana obtida em meio de abacaxi, 15 dias de cultivo, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: $28 \pm 2 \,^{\circ}\text{C}$ e pH inicial: 3,5. (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012).

Os resultados das biomembranas obtidas em meio de abacaxi (*Ananas comosus*) estão descritos na Tabela 3 .

Tabela 3. Dados dos cultivos realizados em meio de abacaxi com os respectivos desvios padrões

Tempo de			Chá	Suco de									
cultivo	Açúcar	Inóculo	verde	Abacaxi	Diâmetro	Espessura	Peso	Produdtividade	Fator de Conversão	рΗ	рΗ	Brix	Brix
(dias)	(g/L)	(% v/v)	(% v/v)	(% v/v)	(cm)	(mm)	(g)	(g celulose/dia.L)	(g celulose/ g açúcar)	inicial	Final	inicial	Final
20	40	25	50	50	7±1	0,98±0,05	10,4±0,2	0,87± 0,01	0,52±0,006	3,50	3,40	5	4
20	40	25	75	25	4±1	0,78±0,04	4,9±0,1	0,41±0,01	0,254±0,007	3,60	3,20	5	3
15	40	25	75	25	4±1	0,88±0,04	4,5±0,1	0,50±0,01	0,301±0,009	3,55	3,10	5	4

Conforme observado na Tabela 3, a maior produtividade foi 0,87 g celulose/dia.L, quando se utilizou béquer de 0,5 L com 0,35 L de meio de abacaxi em 20 dias de cultivo e 25% de inóculo (cultura mista). Nessas mesmas condições, a massa foi de 10,40 gramas e o diâmetro foi de 6,5 cm. A menor produtividade foi de 0,252 g celulose/dia, quando se utilizou béquer de 0,250 L, volume de meio de 150 mL e 20 dias de cultivo. Nessas condições, a massa foi de 4,95 gramas, e a produtividade foi à metade da conseguida na melhor condição. Já, quando se utiliza béquer de 0,25 L com 0,135 L de meio em 15 dias de cultivo, a massa foi de 4,50 gramas e a produtividade, de 0,88 g celulose/dia.L. A produtividade foi 1,72 vezes menor do que quando se utilizou o béquer de 0,5 L e 18% maior do que quando se utilizou o béquer de 0,250 L, em 20 dias de cultivos.

5.3 Meio de cultivo de mamão (Carica papaya)

O meio de mamão foi utilizado como meio de cultivo para a obtenção da biomembrana de celulose, por ser um meio nutricionalmente rico e possuir papaína, que poderia ser incorporada à biomembrana, durante o processo fermentativo, adicionando lhe propriedades cicatrizantes .

A Figura 20 mostra o aspecto da biomembrana obtida em meio de mamão em 10 dias de cultivo.



Figura 20. Biomembrana obtida em meio de mamão com 100 g/L de sacarose, 10 dias de cultivo, pH inicial: 3,5, concentração de suco de laranja: 13%, temperatura de cultivo: 28 ± 2°C e volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v).(Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)

Os resultados das membranas obtidas em meio de mamão (*Carica papaya*) estão descritos na Tabela 4.

Os gráficos da obtenção de celulose no meio de mamão são mostrados abaixo.

Tabela 4. Dados dos cultivos realizados em meio de mamão com os respectivos desvios padrões

Tempo			Ol- 4	Suco	Suco									
de	A ovicer	Inágula	Chá	de	de Mamão	Diâmetre	Canadaura	Dooo	Produdtividade	Fator de Conversão	لام	ьЫ	Driv	Brix
cultivo (dias)	Açúcar (g/L)	Inóculo (% v/v)	verde (% v/v)	Laranja (% v/v)	Mamão (% v/v)	Diâmetro (cm)	Espessura (mm)	Peso (g)	(g celulose/dia.L)	(g celulose/g açúcar)	pH inicial	pH final	Brix inicial	final
15	50	, ,	33	17		, ,				,,			6	
		25			50	11±1	5,00±0,25	78,0±3,9	8,67±0,43	1,560±0,078	4,48	3,56	_	5
10	50	25	33	17	50	11±1	3,92±0,20	42,7±2,1	7,12±0,36	0,854±0,043	4,45	3,42	6	6
7	50	25	33	17	50	11±1	5,49±0,38	38,7±2,7	9,21±0,44	0,774±0,065	4,12	3,30	5	4
15	100	25	37	13	50	11±1	5,64±0,28	65,0±3,3	7,22±0,22	0,650±0,033	4,45	3,15	8	8
10	100	25	37	13	50	11±1	2,66±0,17	37,3±2,4	6,22±0,24	0,373±0,024	4,36	2,96	8	8
7	100	25	37	13	50	11±1	0,25±0,02	8,0±0,6	1,90±0,08	0,080±0,006	4,10	2,93	8	8
7	50	25	29	21	50	11±1	4,63±0,32	53,9±3,8	12,83±0,90	1,038±0,073	4,14	3,58	7	6
7	50	25	41	9	50	11±1	3,17±0,22	30,9±2,2	7,36±0,31	0,618±0,043	4,14	3,55	6	6
7	50	25	44	6	50	11±1	2,56±0,18	28,6±2,0	6,81±0,29	0,572±0,040	4,14	3,64	6	6
7	50	25	38	13	50	11±1	3,67±0,26	40,0±2,8	9,52±0,40	0,800±0,056	4,12	3,77	6	6
7	50	25	31	19	50	11±1	5,77±0,40	57,6±4,0	13,71±0,58	1,152±0,081	4,11	3,66	7	7
7	50	25	25	25	50	11±1	3,98±0,28	53,1±3,7	12,64±0,53	1,062±0,074	4,10	3,10	7	7
7	83	13	13	13	75	11±1	3,92±0,20	12,7±0,6	3,02±0,15	0,153±0,008	3,55	3,10	8	7
15	83	17	18	14	68	7±1	1,32±0,28	8,4±0,4	0,93±0,03	0,101±0,008	3,55	3,05	8	7
7	83	13	13	7	80	5±1	2,38±0,13	$7,9\pm0,4$	1,88±0,13	0,095±0,006	3,50	3,20	8	7
10	100	17	37	13	50	11±1	6,37±0,32	61,4±3,1	10,23±0,51	0,614±0,031	3,52	3,10	9	8
7	100	17	37	13	50	11±1	1,42±0,10	11,6±0,1	2,75±0,07	0,116±0,001	3,61	3,20	9	7
7	50	25	50	0	50	11±1	1,25±0,14	12,7±0,2	3,02±0,03	0,254±0,004	3,65	3,40	6	5

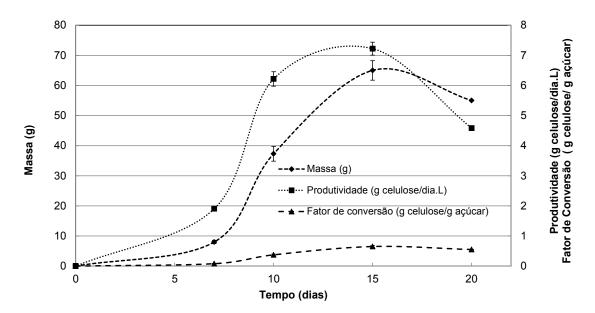


Figura 21. Variação da massa da biomembrana, do fator de conversão de açúcar em celulose e da produtividade com os respectivos desvios padrões em função do tempo, em meio de mamão com 100 g/L de sacarose, concentração de suco de laranja: 13% v/v, pH inicial: 3,5 \pm 1, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v) e temperatura de cultivo: 28 \pm 2°C.

Na Figura 21, observa-se que a massa da biomembrana aumenta linearmente em função do tempo, atingindo o valor máximo (65 g), em 15 dias de cultivo. Este valor é 3,25 vezes maior que a massa da biomembrana obtida em meio chá de verde, no mesmo período e com a mesma concentração de sacarose.

Após 15 dias de cultivo, a massa diminuiu, porque toda a sacarose (100 g/L) do meio de cultivo foi consumida e a celulose não é mais formada. Portanto, para esta condição estudada, o melhor tempo de cultivo para a massa foi de 15 dias.

Assim como a massa, a produtividade também aumenta linearmente com o tempo e atinge o valor máximo de 7,2 g celulose/dia.L, em 15 dias de cultivo. Após o décimo quinto dia de cultivo, a produtividade diminui de maneira linear. Para a produtividade, o melhor tempo de cultivo foi 15 dias.

O fator de conversão aumenta linearmente com o tempo, atingindo o valor máximo (0,5 g celulose/g açúcar) em 15 dias de cultivo. Após este período, o fator de conversão diminui. Para esta condição estudada, o melhor tempo de cultivo para o fator de conversão foi de 15 dias.

Os valores máximos da massa, da produtividade e do fator de conversão em meio de mamão, nestas condições estudadas (concentração de açúcar: 100 g/L, pH

inicial: 3.5 ± 1 , volume de inóculo 0.150 L (25% v/v) e concentração de laranja 13% v/v), foram aproximadamente 3.2 vezes maiores do que os obtidos em meio de chá verde (concentração de açúcar: 100 g/L, pH inicial: 3.5 e volume de inóculo 0.15 L (25% (v/v)) em 15 dias de cultivo.

Assim como as demais variáveis estudadas, a espessura da biomembrana aumentou com o tempo, atingindo o valor máximo de 5,5 mm, no décimo quinto dia de cultivo; após este período, a espessura diminuiu (Figura 22).

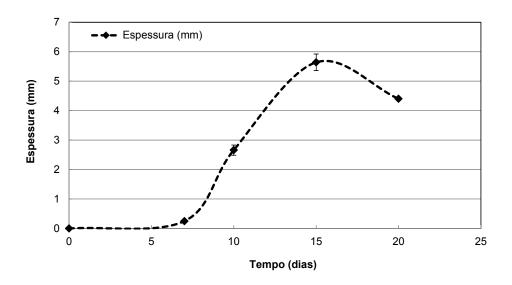


Figura 22. Variação da espessura da biomembrana em função do tempo, em meio de mamão com 100 g/L de sacarose, pH inicial: 3.5 ± 1 , volume de inóculo: 0.150 L (25% v/v), concentração de suco de laranja: 13% v/v e temperatura de cultivo: 28 ± 2 °C.

O suco de laranja foi adicionado ao meio de mamão, para ajustar o pH inicial do meio de cultivo e por possuir ácido cítrico, que aumenta a produção de celulose.

A Figura 23 mostra a influência da adição do suco de laranja na obtenção de celulose, em meio de cultivo de mamão.

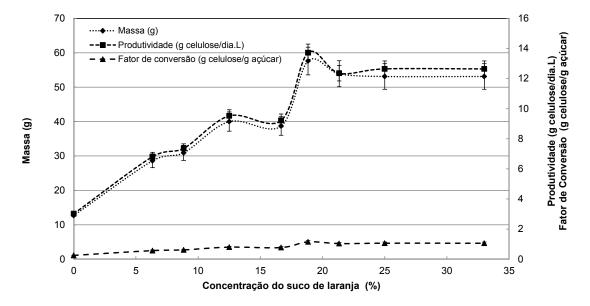


Figura 23. Variação da massa da biomembrana, do fator de conversão de açúcar em celulose e da produtividade padrões com os respectivos desvios em função da concentração de suco de laranja, em meio de mamão com 100 g/L de sacarose, pH inicial: 3,5 ± 1, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: 28 ± 2°C e tempo de cultivo: 7 dias.

Na Figura 23, observa-se que quanto maior a concentração de suco de laranja no meio de mamão, maior é a massa, maior é a produtividade e maior é o fator de conversão, atingindo os valores máximos de 55 g de celulose, 14 g celulose/dia.L e 1,5 g celulose/g açúcar, respectivamente. Os valores máximos destas variáveis foram alcançados quando a concentração do suco de laranja no meio de mamão foi de 17% v/v. O aumento da produtividade e da massa se deve ao fato do ácido cítrico, presente no suco de laranja, aumentar a produção de celulose (DANESI, 1998).

Os valores das variáveis estudadas se mantiveram constantes, quando a concentração de suco de laranja, no meio de mamão, foi maior que 17% v/v.

A espessura da biomembrana aumenta linearmente, com o aumento da concentração do suco de laranja no meio de mamão. O valor máximo da espessura (5,7 mm) foi atingido com a concentração de suco de laranja no meio de mamão de 17% v/v. Acima desta concentração, a espessura diminuiu (Figura 24).

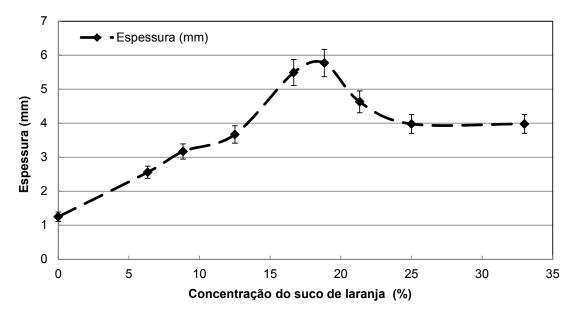


Figura 24. Variação da espessura da biomembrana com os respectivo desvio padrão, em função da concentração de suco de laranja em meio de mamão com 100 g/L de sacarose, pH inicial: 3.5 ± 1 , volume de inóculo: 0.150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: 28 ± 2 °C e tempo de cultivo: 7 dias.

5.4 Meio de cultivo de chá com adição de colágeno

O colágeno foi adicionado ao meio de chá verde, visando melhorar a massa, a produtividade, o fator de conversão e a espessura da biomembrana.

A Figura 25 mostra o aspecto da biomembrana obtida em meio de colágeno 1% p/v, em 10 dias de cultivo.



Figura 25. Biomembrana obtida em meio de colágeno, com concentração de colágeno de 1,0 % p/v, concentração de sacarose: 100 g/L, pH inicial: 3,5, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: 28 ± 2°C e tempo de cultivo: 10 dias (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012).

Tabela 5. Dados dos cultivos realizados em meio de colágeno com os respectivos desvios padrões

Tempo													
de			Chá										
cultivo	Açúcar	Inóculo	verde	Colágeno	Diâmetro	Espessura	Peso	Produdtividade	Fator de Conversão	рΗ	рΗ	Brix	Brix
(dias)	(g/L)	(% v/v)	(% v/v)	(% p/v)	(cm)	(mm	(g)	(g celulose/dia.L)	(g celulose/ g açúcar)	inicial	final	inicial	final
7	50	25	100	0,5	11±1	0,96±0,05	5,5±0,5	1,31±0,10	0,110±0,020	3,98	3,17	5	4
7	50	25	99	1,0	11±1	1,39±0,07	6,3±1,4	1,49±0,09	0,125±0,017	4,21	3,58	5	5
7	50	25	99	1,2	11±1	2,96±0,15	7,9±1,2	1,88±0,12	0,158±0,015	3,98	3,50	5	5
7	50	25	99	1,5	11±1	0,62±0,03	10,9±1,4	2,60±0,09	0,218±0,011	4,10	3,50	5	5
7	50	25	98	2,5	11±1	0,34±0,02	5,4±0,5	1,29±0,10	0,108±0,005	3,97	3,67	5	5

Os resultados das biomembranas obtidas em meio de chá verde com adição de colágeno estão descritos na Tabela 5.

Os gráficos da obtenção da biomembrana de celulose, no meio de chá com adição de colágeno, são mostrados abaixo.

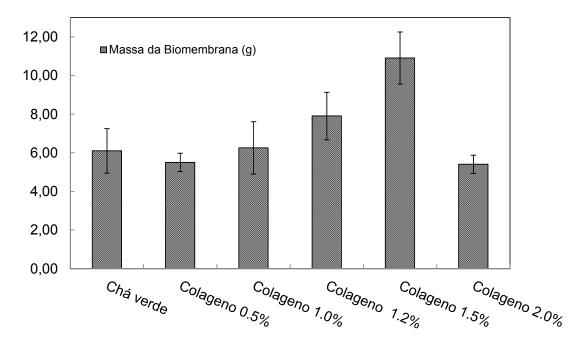


Figura 26. Variação da massa da biomembrana com o respectivo desvio padrão, em função da concentração de colágeno em meio de chá verde, com 50 g/L de sacarose, pH inicial: 3.5 ± 1 , volume de inóculo: 0.150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e tempo de cultivo: 7 dias.

O colágeno utilizado nestes experimentos foi proveniente da gelatina sem sabor, adquirida de um supermercado de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Na Figura 26, nota-se que a adição do colágeno no meio de chá verde teve a tendência de aumentar a massa da biomembrana, provavelmente devido à incorporação do colágeno na estrutura da biomembrana, fazendo com que o *G. xylinus* produzisse uma biomembrana mais robusta. Além disso, o colágeno, assim como outros aditivos poliméricos (ágar, acetato, xantana e CMC), possui a habilidade de impedir a formação de grandes aglomerados de CB, de aumentar a viscosidade do meio e de aumentar a produção de CB, durante o processo de fermentação por submersão, uma vez que é uma fonte de proteína e serve como nutriente para o microrganismo produzir a CB.

Comparou-se a obtenção de CB por *A. xylinum*, em meio de chá verde com adição de diferentes concentrações de colágeno (0,5%, 1%, 1,2%, 1,5% e 2,0% (p/v)). A quantidade de CB do controle (meio de chá verde) foi de 8 g/L, que é 6 vezes maior que a encontrada por Cheng, Catchmark e Demirci (2009). A quantidade de CB obtida em meio de chá verde com adição de 0,5% (p/v) e 1,0% (p/v) de colágeno foi muito similar ao controle (7,73 g/L), igual a encontrada por

Cheng, Catchmark e Demirci (2009), com 0,5% (p/v) CMC (7,2 g/L), e aproximadamente, o dobro da relatada por eles, quando utilizaram celulose microcristalina (0,5% - 4,73 g/L) e ágar (0,2% - 4,49 g/L),

A máxima quantidade de celulose bacteriana obtida foi 15 g/L, com a concentração de colágeno de 1,5%, que foi 2,3 vezes maior que o controle e o dobro da relatada por Cheng, Catchmark e Demirci (2009) (8,2 g/L), com a concentração ótima de CMC. Efeito semelhante foi observado por Bae et al. (2004), quando adicionaram ágar (0,2%, 0,4%, 0,6 e 1%) em meio CSL-FRU (água de milho com frutose), para produção de celulose bacteriana por *A. xylinum* BPR 2001. Eles relataram aumento de 42% na produção de celulose, quando adicionaram 0,6% de ágar no meio de CSL-FRU.

Não houve diferença significante na quantidade de CB obtida no meio de chá verde com as concentrações de colágeno de 0,5 e 1,0% p/v.

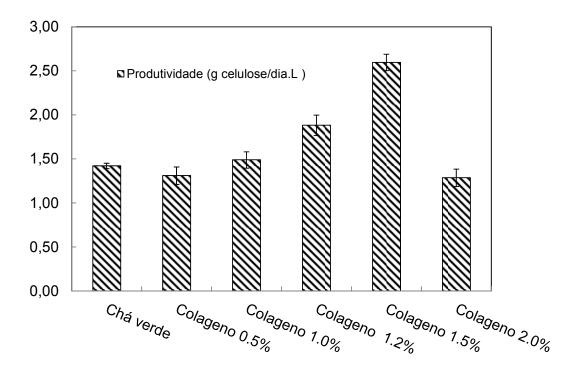


Figura 27. Variação da produtividade da biomembrana com o respectivo desvio padrão, em função da concentração de colágeno, em meio de chá verde, com 50 g/L de sacarose, pH inicial: 3.5 ± 1 , volume de inóculo: 0.150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: $28 \pm 2\%$ e tempo de cultivo: 7 dias.

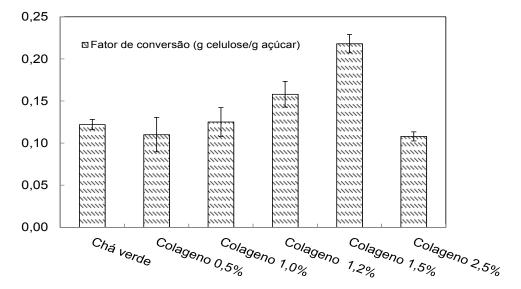


Figura 28. Variação do fator de conversão da biomembrana com o respectivo desvio padrão, em função da concentração de colágeno, em meio de chá verde, com 50 g/L de sacarose, pH inicial: 3.5 ± 1 , volume de inóculo: 0.150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}C$ e tempo de cultivo: 7 dias.

Efeito semelhante é observado no fator de conversão (Figura 28) e na produtividade (Figura 27). A maior produtividade (2,7 g celulose/dia.L) e o maior fator de conversão (0,22 g celulose/g açúcar) foram obtidos quando a concentração de colágeno no meio de chá verde foi de 1,5% p/v. Estes valores foram o dobro dos valores observados no controle. Acima dessa concentração tanto a produtividade, quanto o fator de conversão, diminuíram.

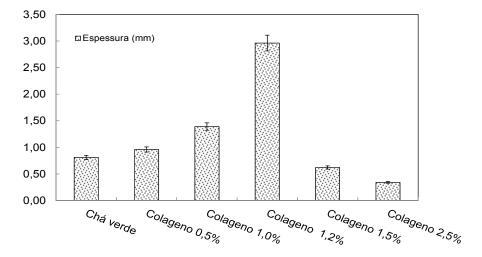


Figura 29. Variação da espessura da biomembrana com o respectivo desvio padrão, em função da concentração de colágeno em meio de chá, com 50 g/L de sacarose, pH inicial: 3.5 ± 1 , volume de inóculo: 0.150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: 28 ± 2 °C e tempo de cultivo: 7 dias.

A Figura 29 mostra que a maior espessura (3 mm) foi alcançada no meio de chá verde com adição de 1,2% (p/v) de colágeno, que é o triplo do valor da espessura obtida no meio de chá de verde(meio controle). Acima dessa concentração, a espessura diminuiu.

5.5 Meio de cultivo de manitol com chá verde

O meio de manitol com chá verde foi utilizado para preparar o inóculo e adaptar os microrganismos, na passagem do meio de manitol, para o meio de chá verde. A Figura 30 mostra o aspecto da biomembrana obtida, em meio de manitol com chá verde, em 15 dias de cultivo.



Figura 30. Biomembrana obtida em meio de manitol com chá verde, em 15 dias de cultivo (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)

O meio de manitol com chá verde foi inoculado com a cultura pura de *Acetobacter xylinum* 10% (p/v), mantido a 28 ± 2°C, em frascos de 250 mL, com 150 mL de meio de cultivo, por 15 dias. A massa média da biomembrana, obtida no meio de manitol com chá verde, foi de 3,4 gramas, a produtividade foi de 0,378 g celulose/dia.L e o fator de conversão foi de 0,206 g açúcar/g celulose.

5.6 Meio de cultivo de vinho

O vinho utilizado foi um tinto, com teor alcoólico de 11% v/v, adquirido em um supermercado de São Paulo, São Paulo, Brasil. O meio de vinho foi usado para obter a biomembrana de celulose, por ser um meio de cultivo nutricionalmente rico, possuir pH adequado e possuir ácido acético, que, em concentração adequada, aumenta a produção de celulose. Devido ao teor alcoólico do vinho, foi necessário dilui-lo com água destilada.

A Figura 31 mostra o aspecto da biomembrana, obtida em meio de vinho, em 15 dias de cultivo.



Figura 31. Biomembrana obtida em meio de vinho com 100 g/L de sacarose, pH inicial: 3,5, concentração de vinho: 33% v/v, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: 28 ± 2°C e 15 dias de cultivo.(Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)

Abaixo, são apresentados os gráficos da obtenção da biomembrana no meio de vinho. Os dados da obtenção de celulose no meio de vinho também estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Dados dos cultivos realizado em meio de vinho com os respectivos desvios padrões

Tempo										Fator de				
de			Chá							Conversão				
cultivo	Açúcar	Inóculo	verde	Vinho	Agua	Diâmetro	Espessura	Peso	Produtividade	(g celulose/	рН	рН	Brix	Brix
(dias)	(g/L)	(% v/v)	(% v/v)	(% v/v)	(% v/v)	(cm)	(mm)	(g)	(g celulose/dia.L)	g açúcar)	inicial	final	inicial	final
7	50	33	33	33	33	11±1	0,43±0,08	4,0±0,8	0,94±0,11	0,079±0,016	3,22	3,25	5	4
7	100	25	33	33	33	11±1	0,55±0,02	4,6±0,1	1,10±0,02	0,046±0,001	3,15	3,40	11	7
7	50	25	39	22	39	5±1	1,6±0,11	$7,2\pm0,5$	1,71±0,12	0,144±0,010	3,57	3,21	6	4
7	50	25	42	17	41	5±1	0,97±0,07	6,8±0,5	1,62±0,11	0,136±0,010	3,60	3,10	6	4
10	50	25	27	40	33	11±1	1,65±0,12	20,2±0,6	3,37±0,08	0,404±0,008	3,38	2,48	8	8
20	100	33	34	33	33	11±1	6,1±0,54	52,0±4,2	4,33±0,21	0,520±0,042	3,51	2,98	8	7
25	100	33	34	33	33	11±1	5,9±0,20	47,0±3,4	3,13±0,13	0,420±0,034	3,27	2,71	8	7
30	100	25	34	33	33	11±1	5,67±0,15	41,0±0,9	2,28±0,03	0,110±0,009	3,37	2,46	8	8
10	50	25	36	19	45	11±1	3,81±0,08	55,6±2,4	9,26±0,23	1,111±0,040	3,30	2,62	6,0	5,0
10	50	25	34	24	43	11±1	1,25±0,06	7,2±0,4	1,20±0,06	0,144±0,007	3,37	2,56	7	7
10	50	25	30	33	38	11±1	1,56±0,08	$6,4\pm0,3$	1,07±0,05	0,128±0,006	3,40	2,51	8	8
10	50	25	28	37	35	11±1	0,90±0,05	4,9±0,2	0,82±0,04	0,098±0,005	3,35	2,62	8	8
10	50	25	24	46	30	11±1	0,97±0,05	$5,4\pm0,3$	0,90±0,05	0,108±0,005	3,39	2,67	9	9
15	50	25	34	33	33	11±1	6,38±0,32	47,6±2,4	5,29±0,26	0,952±0,048	3,74	3,31	7	4
10	83	25	34	33	33	11±1	2,69±0,13	17,3±0,9	2,88±0,14	0,208±0,010	3,57	3,21	9	7
7	100	33	34	33	33	11±1	1,80±0,19	16,4±0,2	3,89±0,03	0,164±0,002	3,54	3,14	7	4
7	50	25	34	33	33	11±1	1,65±0,12	20,2±0,6	4,81±0,08	0,404±0,008	3,12	2,97	5	4
10	100	25	34	33	33	11±1	2,68±0,94	30,6±3,2	5,10±0,32	0,306±0,028	3,31	3,23	9	5
15	100	25	34	33	33	11±1	5,37±0,39	42,9±1,4	4,76±0,50	0,429±0,020	3,48	3,15	9	5
7	50	25	29	42	29	11±1	1,65±0,15	18,2±0,7	4,34±0,10	0,165±0,010	3,36	3,31	5	4
10	50	25	25	50	25	11±1	1,34±0,07	6,0±0,3	1,00±0,05	0,120±0,006	3,39	2,90	10	10

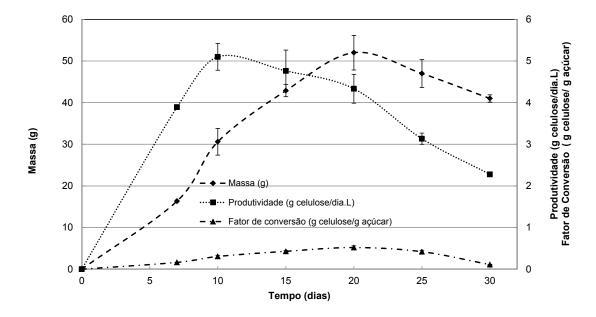


Figura 32. Variação da massa da biomembrana, do fator de conversão de açúcar em celulose e da produtividade e seus respectivos desvios padrões em função do tempo, em meio de vinho com 100 g/L de sacarose, pH inicial: 3.5 ± 1 , concentração de vinho 33% v/v, temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}$ C e volume de inóculo: 0.150 L (25% v/v).

Na Figura 32, observa-se que a massa da biomembrana aumenta linearmente em função do tempo, atingindo o valor máximo (52 g) em 20 dias de cultivo. Após este período, a massa diminui. Isto ocorre porque, depois de 20 dias, toda sacarose (100 g/L) do meio de cultivo foi consumida e a celulose não foi mais formada. Portanto, nesta condição estudada (concentração de vinho: 33% v/v, concentração de sacarose: 100 g/L, pH inicial: 3,5 ± 1e volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v)), o melhor tempo de cultivo para a massa é de 20 dias. Assim como a massa, a produtividade também aumenta, linearmente com o tempo, atingindo o valor máximo de 5,0 g celulose/dia.L, em 10 dias de cultivo. Após o décimo dia de cultivo, a produtividade diminui. O melhor tempo de cultivo, para a produtividade, foi de 10 dias. Comportamento semelhante ocorre com o fator de conversão, que aumenta linearmente com o tempo, atingindo o valor máximo de 0,4 g celulose/g açúcar, em 20 dias de cultivo. Após este período, o fator de conversão diminuiu. Portanto para esta condição estudada (concentração de vinho: 33% v/v, concentração de sacarose: 100 g/L, pH inicial: 3,5 \pm 1 e volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v)), o melhor tempo de cultivo para o fator de conversão foi de 20 dias.

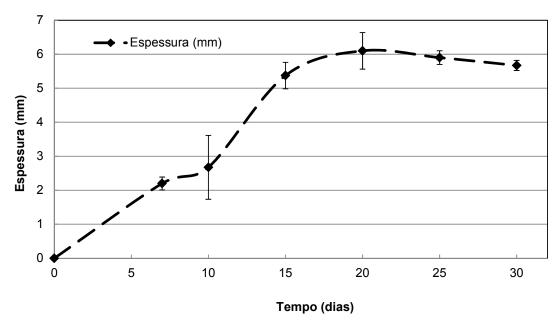


Figura 33. Variação da espessura da biomembrana e seu respectivo desvio padrão em função do tempo, em meio de vinho com 100 g/L de sacarose, pH inicial: 3.5 ± 1 , concentração de vinho 33% v/v, volume de inóculo: 0.150 L (25% v/v) e temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}C$.

Conforme observado na Figura 33, a espessura aumenta linearmente com o tempo, atingindo o valor máximo de 6 mm, em 20 dias de cultivo. Após este período, há diminuição da espessura.

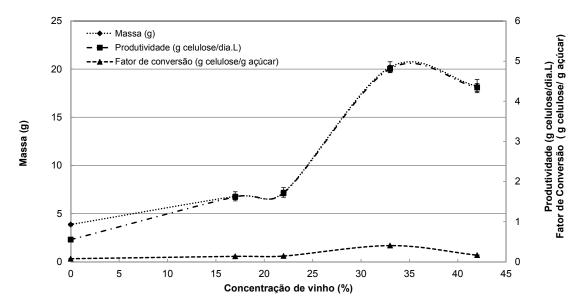


Figura 34. Variação da massa da biomembrana, do fator de conversão de açúcar em celulose e da produtividade com os respetivos desvios padrões em função da concentração de vinho, em meio de vinho, concentração de açúcar: 50 g/L, pH inicial: 3.5 ± 1 , volume de inóculo: 0.150 L (25% V) e tempo de cultivo: 7 dias

Na Figura 34, observa-se que a melhor concentração de vinho é 33 % v/v para os 3 parâmetros avaliados: massa da biomembrana (20 g), fator de conversão de açúcar em celulose (0,5 g celulose/g açúcar) e produtividade (4,7 g celulose/dia.L). Uma vez que, acima desta concentração, o teor alcóolico pode inibir o crescimento dos microrganismos. A concentração de ácido acético presente no meio de vinho (concentração de vinho: 33% v/v) aumenta a produção de celulose (DANESI, 1998).

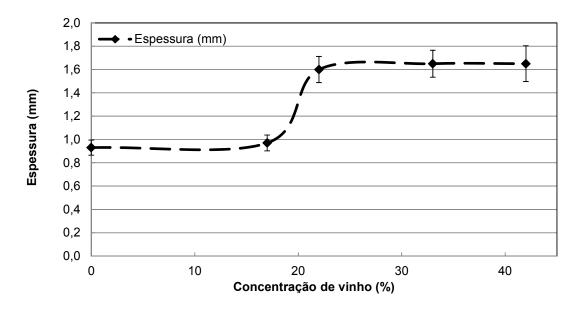


Figura 35. Variação da espessura da biomembrana com o respectivo desvio padrão, em meio de vinho com 50 g/L de sacarose, pH inicial: 3,5 ± 1, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v) temperatura de cultivo: 28 ± 2°C e tempo de cultivo: 7 dias.

A espessura da biomembrana (Figura 35), obtida em meio de vinho, também aumenta a concentração de vinho. A maior espessura (1,65 mm) é obtida com a concentração de vinho de 33% v/v. Acima dessa concentração, a espessura se manteve constante.

5.7 Meio de cultivo de laranja (Citrus sinensis)

O meio de laranja foi usado para obter a biomembrana de celulose, por ser um meio nutricionalmente rico, possuir pH adequado (3,5 - 4,0), além de conter ácido cítrico, que em concentração adequada, aumenta a produção de celulose (DANESI, 1998).

A Figura 36 mostra o aspecto da biomembrana obtida em meio de laranja, em 10 dias de cultivo.

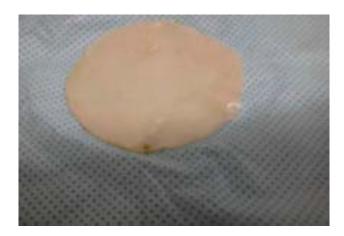


Figura 36. Biomembrana obtida em meio de laranja com 100 g/L de sacarose, pH inicial: 3,5, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: 28 ± 2°C e 10 dias de cultivo.(Autor: Denise Vieira, Ano: 2012).

Abaixo, são apresentados os gráficos da obtenção da biomembrana, no meio de laranja. Os dados da obtenção de celulose, no meio de laranja, também estão descritos na Tabela 7.

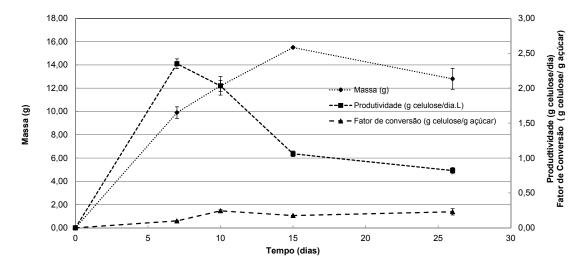


Figura 37. Variação da massa da biomembrana, do fator de conversão de açúcar em celulose e da produtividade com os respectivos desvios padrões em função do tempo, em meio de laranja com 100 g/L de celulose, pH inicial: $3,5 \pm 1$, concentração de suco de laranja: 15% v/v, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v) e temperatura de cultivo: 28 ± 2 °C.

Tabela 7. Dados dos cultivos realizados em meio de laranja com os respectivos desvios padrões

Tempo de cultivo	Açúcar	Inóculo	Chá verde	Suco de Laranja	Diâmetro	Espessura	Peso	Produdtividade	Fator de Conversão (g celulose/	pН	рН	Brix	Brix
(dias)	Açucai (g/L)	(% v/v)	(% v/v)	(% v/v)	(cm)	(mm)	(g)	(g celulose/dia.L)	g açúcar)	inicial	final	inicial	final
10	50	25	92	8	11±1	0,73±0,03	7,8±0,1	1,30±0,01	0,156±0,003	3,90	4,30	6	8
7	100	25	92	8	11±1	1,34±0,25	12,7±0,8	3,02±0,08	0,077±0,008	3,91	3,98	10	14
10	50	25	85	15	11±1	0,64±0,46	8,3±0,6	1,38±0,06	0,165±0,013	3,97	4,35	6	8
10	100	25	85	15	11±1	0,49±0,14	$6,9 \pm 3,5$	1,15±0,35	0,069±0,035	4,06	4,19	10	15
10	100	25	85	15	11±1	0,58±0,04	12,2±0,8	2,03±0,08	0,244±0,016	3,89	3,35	6	5
10	50	25	85	15	11±1	0,32±0,02	8,2±0,4	1,37±0,07	0,164±0,008	3,91	3,41	7	6
10	100	25	85	15	11±1	0,17±0,06	3,4±1,2	0,56±0,12	0,034±0,012	3,92	4,15	8	8
10	50	25	85	15	11±1	0,23±0,01	2,5±0,1	$0,42\pm0,02$	0,050±0,003	3,94	4,00	11	3
10	50	25	85	15	11±1	0,33±0,02	7,4±0,4	1,23±0,06	0,148±0,007	3,81	3,91	7	10
10	100	25	85	15	11±1	0,63±0,03	5,2±0,3	0,87±0,04	0,052±0,003	3,87	3,89	8	8
7	100	25	85	15	8±1	0,21±0,01	$9,9\pm0,5$	2,36±0,07	0,100±0,005	3,73	3,20	7	5
15	65	13	90	10	11±1	5,76±0,29	56,7±2,8	6,30±0,32	0,879±0,044	3,75	3,50	7	5
26	69	21	90	10	11±1	1,79±0,09	23,1±1,2	1,48±0,07	0,335±0,017	4,13	3,70	7	4
7	100	25	85	15	6±1	2,05±0,36	24,1±3,6	5,74±0,57	0,241±0,176	3,87	4,00	7	3
7	100	25	90	10	11±1	1,78±0,12	20,5±1,4	4,88±0,21	0,205±0,014	4,29	3,80	7	5
26	100	25	85	15	7±1	1,84±0,50	12,8±0,9	0,82±0,04	0,230±0,041	3,35	2,92	6	5
7	100	25	85	15	8±1	2,73±0,25	16,8±0,7	4,00±0,10	0,168±0,105	4,05	3,85	6	3
15	100	25	85	15	8±1	3,52±0,31	15,5±0,1	1,72±0,04	0,176±0,001	3,97	3,57	7	5
7	100	25	80	20	11±1	0,64±0,03	8,6±0,4	2,05±0,10	0,086±0,004	3,62	2,63	5	3
7	100	25	75	25	11±1	0,75±0,04	17,1±0,9	4,07±0,20	0,171±0,009	3,68	2,61	5	3
7	50	25	75	25	5±1	0,52±0,03	3,4±0,2	0,81±0,04	0,068±0,003	3,53	3,23	5	2
7	100	25	75	25	11±1	1,44±0,12	6,0±0,4	1,43±0,06	0,060±0,004	4,62	4,10	18	12
10	100	25	85	15	11±1	0,71±0,04	7,6±0,4	1,27±0,06	0,076±0,004	3,76	3,75	9	10

Na Figura 37, observa-se que a massa da biomembrana aumenta, linearmente, em função do tempo, atingindo o valor máximo (15 g), em 15 dias de cultivo. Após este período, a massa da biomembrana diminui, porque, depois de 15 dias, toda a sacarose (100 g/L) do meio de cultivo foi consumida e a celulose não é mais formada. Portanto, para estas condições estudadas (suco de laranja: 15% v/v, concentração de sacarose: 100 g/L, pH inicial: 3,5 ± 1, temperatura de cultivo: 28 ± 2°C e volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v)), o melhor tempo de cultivo para a massa foi de 15 dias. Assim como a massa, a produtividade também aumenta, linearmente, com o tempo, atingindo o valor máximo de 2,2 g celulose/dia.L, em 7 dias de cultivo. Após o sétimo dia de cultivo, a produtividade diminui. Para a produtividade, o melhor tempo de cultivo foi de 7 dias. Comportamento semelhante acontece com o fator de conversão, que aumenta, linearmente, com o tempo, atingindo o valor máximo de 0,3 g celulose/g açúcar, em 10 dias de cultivo. O comportamento destes parâmetros foi semelhante ao observado em meio de chá verde e, em média, 60% maior do que os valores obtidos em meio chá verde, no mesmo período, com o mesmo pH inicial e a mesma concentração de sacarose.

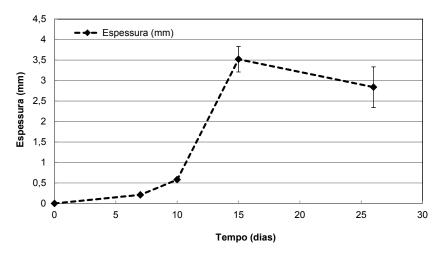


Figura 38. Variação da espessura da biomembrana com o respectivo desvio padrão em função do tempo, em meio de laranja com 100 g/L de sacarose, pH inicial: $3,5 \pm 1$, concentração de suco de laranja: 15% v/v, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v) e temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Na Figura 38, observa-se que a espessura da biomembrana aumenta, linearmente, em função do tempo, atingindo a espessura máxima de 3,5 mm, em 15 dias de cultivo. Após este período, a espessura diminui, porque, toda a sacarose (100 g/L) do meio de cultivo foi consumida e a celulose não é mais formada.

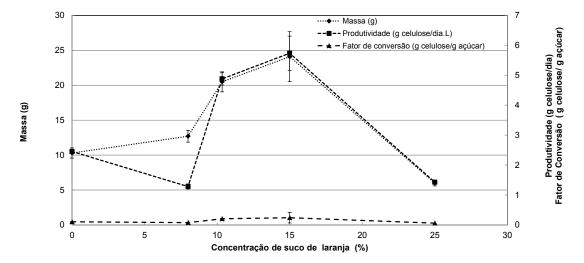


Figura 39. Variação da massa da biomembrana, do fator de conversão de açúcar em celulose e da produtividade com os respectivos desvios padrões em função da concentração de suco de laranja, em meio de laranja com 50 g/L de sacarose, pH inicial: 3,5 ± 1, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: 28 ± 2°C e tempo de cultivo: 7 dias.

Na Figura 39, observa-se que a melhor concentração de suco de laranja é 15% v/v para os 3 parâmetros: massa da biomembrana (25 g), fator de conversão de açúcar em celulose (0,3 g celulose/g açúcar) e da produtividade (6,0 g celulose/dia.L). Acima desta concentração, o ácido cítrico inibe o crescimento celular e, consequentemente, inibe a formação de celulose (DANESI, 1998).

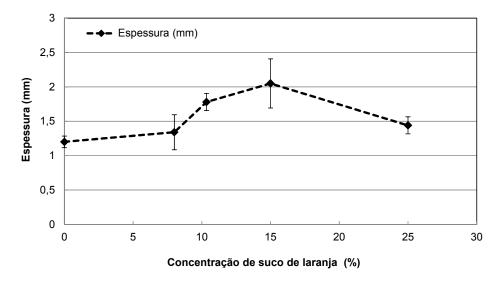


Figura 40. Variação da espessura da biomembrana com o respectivo desvio padrão em função da concentração de suco de laranja, em meio de laranja com 50 g/L de sacarose, pH inicial: 3.5 ± 1 , volume de inóculo: 0.150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e tempo de cultivo: 7 dias.

Com a concentração de suco de laranja de 15% v/v, obteve-se a maior espessura (2 mm). Isto demonstra que a concentração ótima de suco de laranja no meio de laranja, para obtenção de celulose, nestas condições estudadas, é de 15% v/v (Figura 40).

5.8 Meio de cultivo de beterraba

O meio de beterraba foi utilizado para produzir a biomembrana de celulose, pelo fato da beterraba possuir alta concentração de sacarose, sendo uma fonte alternativa de carboidrato. A utilização de suco de beterraba também permite a redução do custo na obtenção de celulose, porque possibilita o uso da beterraba descartada

A Figura 41 mostra o aspecto da biomembrana obtida em meio de beterraba, em 15 dias de cultivo.



Figura 41. Biomembrana obtida em meio de beterraba (concentração de suco de beterraba equivalente a 9 g/L de sacarose), pH inicial: 3,5, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), temperatura de cultivo: 28 ± 2°C e tempo de cultivo: 15 dias.(Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)

Tabela 8. Dados dos cultivos realizados em meio de beterraba com os respectivos desvios padrões

Tempo									Fator de				
de		Chá		Açúcar de					Conversão				
cultivo	Inóculo	verde	Beterraba	Beterraba	Diâmetro	Espessura	Peso	Produdtividade	(g celulose/	рН	рН	Brix	Brix
(dias)	(% v/v)	(% v/v)	(% v/v)	(g/L)	(cm)	(mm)	(g)	(g celulose/dia.L)	g açúcar)	inicial	final	inicial	final
10	25	63	37	50	11±1	0,56±0,13	9,3±2,8	1,55±0,17	0,186±0,035	3,90	3,60	3	1
10	25	81	19	25	11±1	0,90±0,01	9,8±1,0	1,63±0,10	0,272±0,040	4,44	4,00	3	2
10	25	76	24	75	11±1	0,43±0,02	$9,3\pm0,5$	1,55±0,05	0,124±0,006	3,99	3,23	4	2
7	25	93	7	9	11±1	1,37±0,07	10,0±0,5	2,38±0,12	1,111±0,056	3,65	3,15	2	1
10	25	93	7	9	11±1	1,45±0,10	10,7±0,7	1,78±0,12	1,189±0,083	3,70	3,20	4	2
12	25	93	7	9	11±1	1,69±0,10	10,7±0,6	1,49±0,09	1,189±0,071	3,81	3,31	4	1
15	25	93	7	9	8±1	1±0,06	9,4±0,6	1,04±0,06	1,040±0,062	3,82	3,32	4	1
18	25	93	7	9	11±1	0,3±0,02	$8,4\pm0,5$	0,78±0,05	0,933±0,061	3,40	2,90	2	2
20	25	93	7	9	11±1	0,3±0,02	7,8±0,6	0,65±0,05	0,867±0,068	3,68	3,18	2	1
7	25	87	13	18	5±1	0,26±0,01	4,4±0,2	1,04±0,05	0,406±0,020	3,70	3,20	3	1
10	25	87	13	18	7±1	1,52±0,11	15,3±1,1	2,55±0,11	0,850±0,060	3,85	3,35	3	1
12	25	87	13	18	11±1	1,00±0,06	14,3±0,9	1,99±0,02	0,243±0,015	3,80	3,30	3	2
15	25	87	13	18	11±1	0,83±0,05	12,1±0,7	1,34±0,06	0,794±0,048	3,92	3,42	3	2
18	25	87	13	18	11±1	0,80±0,05	$7,3\pm0,5$	0,68±0,04	0,672±0,044	3,69	3,19	3	1
20	25	87	13	18	11±1	0,40±0,03	7,3±0,6	0,61±0,05	0,672±0,052	3,74	3,24	3	1
10	25	44	56	75	11±1	1,90±0,67	23,8±2,1	3,97±0,21	0,317±0,027	4,08	3,65	2	1

Abaixo, são apresentados os gráficos da obtenção da biomembrana, no meio de beterraba. Os dados da obtenção de celulose, no meio de beterraba, também, estão descritos na Tabela 8.

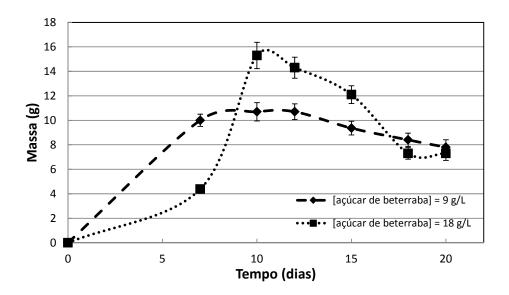


Figura 42. Variação da massa da biomembrana com o respectivo desvio padrão em função do tempo, em meio de beterraba com concentração de suco de beterraba equivalente a 9 g/L e 18 g/L de sacarose, pH inicial: 3.5 ± 1 , volume de inóculo: 0.150 L (25% v/v) e temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Na Figura 42, observa-se que o maior valor de massa da biomembrana obtida em meio de beterraba (com concentração de suco de beterraba equivalente a 9 g/L de sacarose), foi de 11 g de celulose, em 10 dias de cultivo, que é cerca de 60% maior que a massa da biomembrana obtida em meio de chá verde, com concentração de sacarose de 9 g/L.

A massa da biomembrana obtida em meio de beterraba, com concentração de suco de beterraba equivalente a 9 g/L de sacarose, aumenta linearmente com o tempo, atingindo o valor máximo de 11 g, no décimo dia de cultivo.

No sétimo dia de cultivo, a massa da biomembrana obtida em meio de beterraba (com concentração de suco de beterraba equivalente a 9 g/L de sacarose) é 2,6 vezes maior que a massa da biomembrana obtida no meio de chá verde com concentração de sacarose de 9 g/L.

Observou-se também que, após atingirem o valor máximo, as massas das biomembranas, obtidas no meio chá verde, e no meio de beterraba diminuem.

A maior massa da biomembrana obtida em meio de chá verde com 18 g/L de sacarose foi de 16,4 g de celulose, em 18 dias de cultivo. Este valor é cerca de 30% maior do que a massa da biomembrana obtida em meio de beterraba (concentração de suco de beterraba equivalente a 18 g/L de sacarose), no mesmo tempo de cultivo, e muito semelhante ao valor máximo da massa obtida no meio de chá verde, com 9 g/L de sacarose, e no meio de beterraba com concentração de açúcar equivalente a 18g/L de sacarose.

Em meio de beterraba (concentração de suco de beterraba equivalente a 18 g/L de sacarose), a maior massa (15,30 g), em 10 dias de cultivo, equivale a 3 vezes a massa da obtida em meio de chá verde (18 g/L de sacarose), no mesmo período (10 dias). Após o sétimo dia de cultivo, a massa obtida no meio de beterraba (concentração de suco de beterraba equivalente a 18 g/L de sacarose) é 63% maior que a massa obtida no meio de beterraba, (concentração de suco de beterraba equivalente a 9 g/L de sacarose). O valor máximo da massa obtida no meio de beterraba (concentração de suco de beterraba equivalente a 18 g/L de sacarose), no meio de chá verde, (9 g/L de sacarose), e no meio de chá verde (18 g/L de sacarose), foi de 15,5 g de celulose em 10, 15 e 18 dia cultivo, respectivamente. Isto torna viável a substituição da sacarose (açúcar cristal), pela sacarose proveniente do suco de beterraba.

Tanto a adição de 15% v/v, quanto de 8% v/v de suco de beterraba no meio de chá verde aumentou em 5 vezes a produtividade e a massa da biomembrana, em relação ao açúcar cristal.

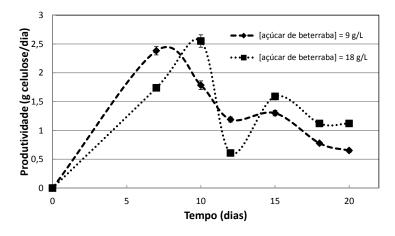


Figura 43. Produtividade da biomembrana com o respectivo desvio padrão em função do tempo, em meio de beterraba com concentração de suco de beterraba equivalente a 9 g/L e 18 g/L de sacarose, pH inicial: 3.5 ± 1 , volume de inóculo: 0.150 L (25% v/v) e temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Na Figura 43, observa-se que a maior produtividade em meio de beterraba, com concentração de suco de beterraba equivalente a 9 g/L de sacarose, foi de 1,4 g celulose/dia, em 7 dias de cultivo. Este valor é muito semelhante à produtividade máxima (2,5 g de celulose/dia) obtida em meio de beterraba, com concentração de suco de beterraba equivalente a 18 g/L de sacarose, em 10 dias de cultivo. A produtividade diminuiu, após atingir a produtividade máxima, em ambos os meios de beterraba.

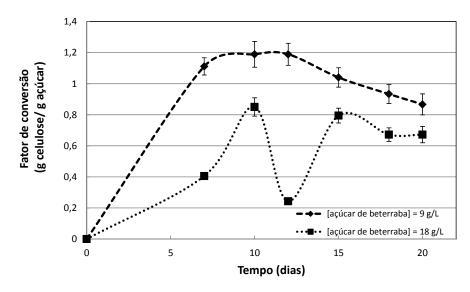


Figura 44. Fator de conversão com o respectivo desvio padrão em função do tempo, em meio de beterraba com concentração de suco de beterraba equivalente a 9 g/L e 18 g/L de sacarose, pH inicial: $3,5 \pm 1$, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v) e temperatura de cultivo: 28 ± 2 °C.

Na Figura 44, observa-se que o maior fator de conversão (1,2 g celulose/g açúcar) foi obtido em meio de beterraba, com concentração de suco de beterraba equivalente a 9 g/L de sacarose, em 10 dias de cultivo. Este valor é 50% maior que o fator de conversão máximo (0,8 g de celulose/g de açúcar) obtido, em meio de beterraba, com concentração de suco de beterraba equivalente a 18 g/L de sacarose, em 10 dias de cultivo.

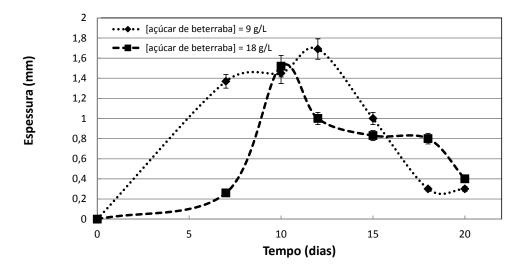


Figura 45. Espessura da biomembrana com o respectivo desvio padrão em função do tempo, em meio de beterraba com concentração de suco de beterraba equivalente a 9 g/L e 18 g/L de sacarose, pH inicial: $3,5 \pm 1$, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v) e temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Na Figura 45, observa-se que a espessura máxima da biomembrana obtida em meio de beterraba, com concentração de suco de beterraba equivalente a 9 g/L de sacarose, foi de 1,7 mm, em 12 dias de cultivo. Este valor é muito semelhante à espessura máxima (1,5 mm) obtida em meio de beterraba, com concentração de suco de beterraba equivalente a 18 g/L de sacarose, em 10 dias de cultivo.

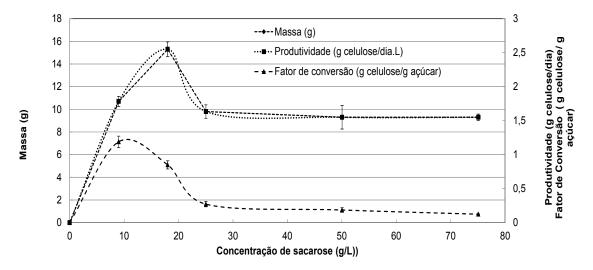


Figura 46. Variação da massa da biomembrana, da produtividade e do fator de conversão com os respectivos desvios padrões em função da concentração de suco beterraba equivalente à sacarose; pH inicial: 3.5 ± 1 , volume de inóculo: 0.150 L (25 % v/v), temperatura de cultivo: $28 \pm 2^{\circ}C$ e tempo de cultivo: 10 dias.

A maior produtividade (2,5 g celulose/dia) e a maior massa (15 g) foram obtidas no meio de beterraba, com concentração de suco de beterraba equivalente a 18 g/L de sacarose. O maior fator de conversão (1,2 g celulose/g açúcar) foi obtido em meio de beterraba, com concentração de suco de beterraba equivalente a 9 g/L de sacarose (Figura 46).

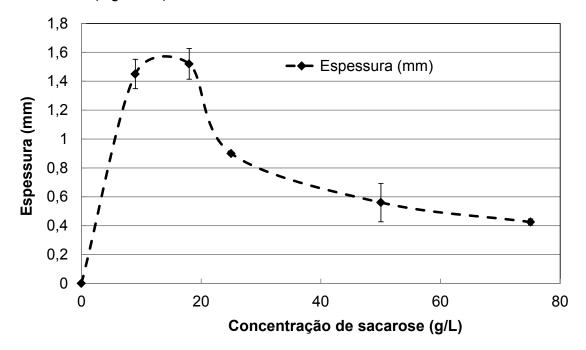


Figura 47. Variação da espessura da biomembrana em função da concentração de suco beterraba equivalente à sacarose, pH inicial: 3.5 ± 1 , volume de inóculo: $0.150 \pm (25\% \text{ v/v})$, temperatura de cultivo: $28 \pm 2\% \text{ C}$ e tempo de cultivo: 10 dias.

Na Figura 47, observa-se que a maior espessura (1,5 mm) foi obtida quando a concentração do suco de beterraba é equivalente a 18 g/L de sacarose. Acima desta concentração, a espessura diminui.

5.9 Massa da biomembrana, espessura, produtividade e fator de conversão na biomembrana de celulose obtida nos diferentes meios de cultivo

Os dados referentes aos cultivos realizados são apresentados nas Tabelas 2, 3, 4, 5, 6 7 e 8. Abaixo, são discutidos e comparados os dados da massa da biomembrana (g celulose), da espessura (mm), da produtividade (g celulose/dia) e do fator de conversão (g celulose/g açúcar), nos diferentes meios de cultivo, nas

seguintes condições: pH inicial: 3.5 ± 0.6 , volume de inóculo: 0.150 L (25% v/v) e tempo de cultivo: 7 dias.

A espessura, assim como a obtenção de celulose, aumenta depois de um período de indução de 3 a 5 dias, porque após este período é que o *G. xylinus* produz a celulose em forma de película, além disso, o *G. xylinus* e o *S. cerevisiae* formam uma cultura simbiótica que favorece a produção de celulose após esse período. Esta taxa tende a diminuir após 15 - 20 dias (IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000).

O sistema se torna turvo e depois de um período de 3 a 4 dias, uma película se forma na superfície. Durante o processo de formação da película, a bactéria aeróbica gera celulose nas áreas próximas à superfície. A película se mantém suspensa à parede interior do frasco, por coesão, enquanto o sistema for mantido imóvel. Nesta condição, a espessura da biomembrana tende a aumentar continuamente até que toda a sacarose seja consumida ou, até que o frasco de fermentação seja agitado, e uma nova película comece a se formar, na superfície do meio de cultivo (IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000).

A espessura máxima atingida nessas condições estudas (pH inicial: 3.5 ± 0.6 , volume de inóculo: 0.150 L (25% v/v) e tempo de cultivo: 7 dias) foi de 6.38 mm, em 15 dias de cultivo, em meio de cultivo de vinho (concentração de vinho: 33% v/v, concentração de chá verde: 34% v/v, concentração de sacarose: 50 g/L, volume de inóculo: 0.150 L (25% v/v e temperatura de cultivo: $28 \pm 2\% \text{ C}$). Observa-se que, no meio de mamão (suco de mamão: 50% v/v e suco de laranja: 19% v/v) e no meio de colágeno (concentração de colágeno: 1.2% p/v), a espessura foi, respectivamente, 3.5 vezes e 1.77 vezes maior que no meio de chá.

A espessura da biomembrana obtida em meio de chá verde e em meio de vinho (concentração de vinho: 33% v/v) foram praticamente iguais.

A espessura da biomembrana obtida em chá verde foi 3,2, vezes maior que no meio de laranja (suco de laranja: 19% v/v); 1,70 vezes maior que no meio colágeno 0,5% p/v; 1,20 vezes maior que no meio de colágeno 1,0 % p/v; 2,7 vezes maior o meio de colágeno 1,5% p/v; 4,9 vezes maior que o meio de colágeno 2,5% p/v; 1,20 vezes maior que no meio de beterraba (concentração de suco de beterraba equivalente a 9 g/L de sacarose); e 6,4 vezes maior que o meio de beterraba (concentração de suco de beterraba equivalente a 18 g/L de sacarose),

Isso ocorre, provavelmente, porque a laranja, o mamão e o colágeno ajudam a reforçar a estrutura da biomembrana e, consequentemente, aumentam a sua espessura. Iguchi, Yamanaka e Budhiono (2000) produziram uma membrana com uma espessura de 15 mm, em 7 dias de cultivo, em meio de água de coco. A espessura da membrana obtida por eles é 2,6 vezes maior que a espessura da biomembrana obtida em meio de mamão (suco de mamão: 50% v/v e suco de laranja: 19% v/v), no mesmo período.

O maior fator de conversão de açúcar em celulose nesta condição estudada pH inicial: 3.5 ± 0.6 , volume de inóculo: 0.150 L (25% v/v) e tempo de cultivo: 7 dias). foi de 1.2 g de celulose/g de açúcar em meio de cultivo de mamão (mamão 50% v/v e laranja: 19 v/v), enquanto o menor (0.07 g de celulose/g de açúcar) foi obtido no meio de laranja (concentração de suco de laranja: 25% v/v).

O fator de conversão do meio de chá verde é 4,4 vezes maior que no meio de laranja (concentração de suco de laranja: 25% v/v); 2,7 vezes maior que no meio de colágeno 0,5% p/v; 2,4 vezes maior que no meio de colágeno 1,0% p/v; 2,0 vezes maior que no meio de colágeno 1,2% p/v; 40% vezes maior que no meio de colágeno 1,5% p/v; 2,7 vezes maior que no meio de colágeno 2,5% p/v

Já o fator de conversão no meio de vinho (concentração de vinho: 33% v/v), e no meio de beterraba (concentração de suco de beterraba equivalente a 18 g/L de sacarose) foram 1,40 vezes maior que no meio de chá verde.

O fator de conversão no meio de mamão (suco de mamão: 50% v/v e suco de laranja: 19 v/v) e no meio de beterraba (concentração de suco de beterraba equivalente a 9 g/L de sacarose) foi 4 vezes maior que no meio de chá verde.

Isto indica que estes meios facilitam a conversão de açúcar em celulose, por possuírem aminoácidos e micronutrientes (DANESI, 1998).

O fator de conversão em meio de chá verde foi 10 vezes maior que o observado por Toda et al. (1997) em meio de GYP (glicose 20g/L, polipeptona 5g/L, extrato de levedura 5g/L, tampão citrato (2,7 g de fosfato de sódio e 1,15 g de ácido cítrico) – fator de conversor 0,033 g celulose/g açúcar); porém, foi menor que o conseguido por Toda et al. (1997) quando adicionaram acetato ao meio GYP. Em meio de abacaxi a 30°C, Kurosumi et al. (2009) obtiveram fator de conversão de 0,6 g celulose/g açúcar, ou seja, 2 vezes maior que o obtido em meio de chá verde neste estudo. O fator de conversão no meio de mamão (suco de mamão 50% v/v e

suco de laranja: 19 v/v) foi 2,5 maior que o obtido por Kurosumi et al. (2009), em meio de abacaxi a 30°C.

Nesta condição estudada a maior produtividade (13,71 g de celulose/dia.L) foi obtida no meio de mamão (suco de mamão 50% v/v e suco de laranja: 19 v/v), enquanto a menor produtividade (0,83 g de celulose/dia.L) foi obtida no meio de laranja (concentração de suco de laranja: 25% v/v).

A produtividade no meio de chá verde é 4,3 vezes maior que no meio de laranja (concentração de suco de laranja 25% v/v); 2,7 vezes maior que no meio de colágeno 0,5% p/v; 2,4 vezes maior que no meio de colágeno 1,0% v/; 2,0 vezes maior que no meio de colágeno 1,2 % p/v; 1,30 vezes maior que no meio de colágeno 1,5% p/v; 2,7 vezes maior que no meio de colágeno 2,5% p/v; 1,50 vezes maior que no meio de beterraba (concentração de suco de beterraba equivalente a 9 g/L de sacarose); e 2,0 vezes maior que no meio de beterraba (concentração de suco de beterraba equivalente a 18 g/L de sacarose).

Já a produtividade, nos meios de vinho (concentração de vinho: 33% v/v) e mamão (suco de mamão: 50% v/v e suco de laranja: 19% v/v), foram 1,37 e 4,0 vezes maior que a produtividade em meio chá verde. Isto significa que as substâncias presentes nestes meios aumentam a produtividade (DANESI, 1998).

A maior massa (57,6 g de celulose) nessas condições estudas (pH inicial: 3,5 ± 0,6, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v) e tempo de cultivo: 7 dias) foi obtida no meio de mamão (suco de mamão: 50% v/v e suco de laranja: 19% v/v), enquanto a menor massa (3,4 g de celulose) foi obtida no meio de laranja (concentração de suco de laranja: 25% v/v).

A massa no meio de chá verde foi 4,4 vezes maior que no meio de laranja (concentração de suco de laranja: 25% v/v); 2,7 vezes maior que no meio de colágeno 0,5% p/v; 2,4 vezes maior que no meio de colágeno 1,0% v/v; 2,0 vezes maior que no meio de colágeno 1,2 % p/v; 1,4 vezes maior que no meio de colágeno 1,5% p/v; 2,7 vezes maior que no meio de colágeno 2,5% p/v; 1,5 vezes maior que no meio de beterraba (concentração de suco de beterraba equivalente a 9 g/L de sacarose) e 3,4 vezes maior que no meio de beterraba (concentração de suco de beterraba equivalente a 18 g/L de sacarose).

Já a massa nos meios de vinho (concentração de vinho 33% v/v) e mamão (mamão: 50% v/v e laranja: 19% v/v), foram 1,37 e 4 vezes maior que a massa em

meio chá verde, respectivamente. Isto indica que, nestes meios, há substâncias que aumentam a formação da celulose bacteriana (DANESI, 1998).

Considerando todas as condições estudadas:

- A maior produtividade foi de 13,71 g de celulose/dia.L no meio de mamão (pH inicial: 4,11, concentração de açúcar: 50 g/L, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), concentração de suco de laranja: 19% v/v, concentração suco de mamão: 50% v/v) em 7 dias de cultivo.
- A maior massa (78 g de celulose) também foi alcançada no meio de mamão (pH inicial de 4,48, concentração de açúcar de 50 g/L, volume de inóculo de 0,150 L (25% v/v), concentração de suco de laranja de 17% v/v, concentração de suco de mamão de 50% v/v) em 15 dias de cultivo.
- O maior fator de conversão (2,36 g celulose/g de açúcar), foi obtido em meio de chá verde (pH inicial de 3,62, concentração de açúcar de 25 g/L, volume de inóculo de 0,150 L (25% v/v)), em 25 dias de cultivo.

5.10 Capacidade de Absorção de Água (CAA), Calêndula (CAC) e Capacidade de Transferência (CT)

A seguir, são apresentados os dados sobre a CAA (%), a CAC (%) e a Capacidade de Transferência da biomembrana de celulose obtida nos diferentes meios de cultivo.

Tabela 9. Capacidade de Absorção de Água (CAA), Calêndula (CAC) e de Transferência (CT) de calêndula da biomembrana de celulose obtida nos diferentes meios de cultivo

Biomembrana	CAA (%)	CAC (%)	CT (%)	
Beterraba	73,0±8,0	2.367,5±47,0	27,0±3,0	
Manitol	122,5±15,0	75,3± 5,0	25,0±2,0	
Colágeno 1,2% p/v Vinho	1.191,2±13,0 227,3±20,0	1502,7± 5,0 250,4± 25,0	26,0±3,0 28,0±4,0	
Chá verde	529,0±4,0	667,3± 90,0	24,0±3,0	
Laranja	1.125,4±115,0	769,2±116,0	29,0±4,0	
Mamão	2.144,0±217,0	1.217,5± 29,0	26,03±3,0	

As condições de obtenção da biomembrana para este teste foram:

- Volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), tempo de cultivo: 7 dias e pH inicial: 3,5:
- Meio de cultivo de beterraba (suco de beterraba: equivalente a 18 g/L de açúcar),
- Meio de cultivo de manitol (extrato de levedura (5g/L), peptona (3,0 g/L), manitol (25 g/L), ágar (15 g/L),
- Meio de cultivo de colágeno (colágeno: 1,2% p/v e concentração de açúcar: 50 g/L),
- Meio de cultivo de vinho (vinho: 33% v/v, água destilada: 33% v/v, chá verde: 34% v/v e concentração de açúcar: 50 g/L),
- Meio de cultivo de chá verde (concentração de açúcar: 50 g/L),
- Meio de cultivo de laranja (concentração de suco de laranja: 25% v/v, concentração de chá verde: 75% v/v e concentração de açúcar: 50 g/L)
- Meio de cultivo de mamão (suco de mamão: 50% v/v, suco de laranja: 19% v/v, chá verde: 31% v/v e concentração de açúcar: 50 g/L).

O efeito da composição do meio de cultivo, na capacidade de absorção de água (CAA), pode ser constatado na Tabela 9.

A biomembrana obtida em meio de mamão apresentou a maior CAA (2.144,0%), que é aproximadamente 4 vezes maior que a CAA da biomembrana obtida em meio de chá verde (529,0%).

A suplementação do meio de chá verde com laranja aumentou a CAA de 529% para 1.125 % (596%), dobrando a CAA da biomembrana obtida em meio de chá verde.

A substituição de açúcar cristal por suco de beterraba reduziu a CAA de 529% para 73% (456%), ou seja, a biomembrana obtida em meio de beterraba é aproximadamente 7 vezes menor que a CAA no meio de chá verde, isso ocorre devido os nutrientes presentes no suco de beterraba.

A CAA da biomembrana obtida em meio de manitol e em meio de vinho foram 122% e 227%, respectivamente, e são aproximadamente 4,30 e 2,31 vezes menores que a CAA da biomembrana obtida em meio de chá verde, respectivamente.

A adição de 1,2% p/v de colágeno ao meio de cultivo de chá verde aumentou o CAA da biomembrana de 529% para 1.191% (2,25 vezes), isso porque a

hidrofilicidade do colágeno aumentou a hidrofilicidade da membrana, fazendo com que ela absorve mais água(LOCILENTO, 2012). O valor da CAA da biomembrana obtida em meio de chá verde (529%) foi similar ao CAA da membrana de celulose não modificada (490%) obtida por Saibuatong et al. (2010). O grau de retenção de água e a capacidade de absorção de água da biomembrana podem aumentar com a introdução de componentes hidrofílicos.

A capacidade de absorção do extrato hidroalcoólico de calêndula (CAC), da biomembrana obtida em meio de chá verde, foi de 667%; isto significa que a biomembrana obtida em meio de chá verde absorve 26% vezes mais água do que extrato hidroalcoólico de calêndula; isto provavelmente acontece devido às propriedades hidrofílicas do extrato de calêndula. A biomembrana obtida em meio de beterraba apresentou a maior CAC (2367%) que foi 3,5 vezes maior que a CAA da biomembrana obtida em meio de chá verde. A CAC da biomembrana obtida em meio mamão (1217%) foi, aproximadamente, o dobro da CAC da biomembrana obtida em meio de chá verde. A adição de suco de laranja, no meio de chá verde, aumentou 15% a CAC. As CAC da biomembrana obtida em meio de manitol, colágeno 1,2 % p/v e vinho foram, respectivamente, 75%, 1507% e 250%.

A biomembrana obtida em meio de chá verde pode absorver 20 mg de calêndula/g celulose. A capacidade de transferência de extrato hidroalcoólico de calêndula, para uma biomembrana seca, foi de 27%. Isto significa que a biomembrana pode transferir extrato hidroalcoólico de calêndula e, possivelmente, outros extratos hidroalcoólicos para outra biomembrana liofilizada, por gradiente de concentração. Estes valores de CAC e Capacidade de Transferência indicam que a biomembrana, com extrato hidroalcoólico de calêndula, pode ter efeito terapêutico, uma vez que, de acordo com a legislação brasileira, é necessária a concentração de calêndula de 8,8 a 17,6 mg de flavonoides para uso tópico (BRASIL, 2004).

Como as biomembranas obtidas nos diferentes meios de cultivo têm CAC e CAA diferentes, elas podem ter usos diferentes como absorção de exsudato, absorção de compostos com diferentes caracteristicas.

5.11 Propriedades mecânicas

5.11.1 Teste de punção

A seguir, são apresentados dados dos testes de punção da biomembrana de celulose obtida nos diferentes meios de cultivo.

As propriedades de punção de uma membrana estão relacionadas à rigidez do material (BORGOGNONI et al., 2010). O teste de punção determina a resistência do material à penetração. Neste teste, a amostra sofre deslocamento (D) e, consequentemente, incremento (ΔI) no seu raio (r), como mostra a Figura 48

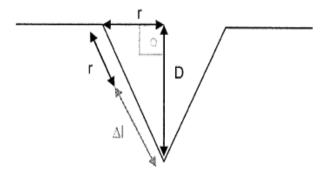


Figura 48. Representação da deformação sofrida pela amostra durante o teste de punção.

Pode-se verificar que o incremento no raio das amostras submetidas a ensaios de punção não é obtido diretamente, como nos ensaios de tração. Obtém-se esse valor por meio da aplicação algébrica do teorema de Pitágoras no triângulo reto, mostrado na Figura 48.

A força até a perfuração da amostra (F), o deslocamento máximo da biomembrana (D) e a área sob a curva (Asc), relacionada à energia de punção (Δ Epunc), foram convertidos em tensão de punção (σ punc) e deformação à punção (σ p), utilizando as seguintes equações:

$$\sigma_{punc} = \frac{F}{A}$$
 Fórmula 8

$$\varepsilon_p = \frac{\Delta l}{r} = \frac{\sqrt{r^2 + D^2} - r}{r} * 100$$
 Fórmula 9
$$\Delta E_{punc} = A_{SC}$$
 Fórmula 10

Sendo: A área da secção transversal da amostra no orifício cilíndrico do dispositivo que a segura.

A Tabela 10 mostra os valores de força máxima, distância, área e módulo de elasticidade à punção das amostras testadas e seus respectivos desvios padrão.

Tabela 10. Força máxima, distância, área e módulo de elasticidade à punção da biomembrana obtida nos diferentes meios de cultivo

Biomembranas	Força (N)	Distância (mm)	Área (mm2)	Módulo de elasticidade à punção (mPa)
Laranja	1,02 ± 0,10	$9,93 \pm 0,99$	46,73± 4,70	0,11 ± 0,01
Calêndula	$0,20 \pm 0,02$	$7,22 \pm 0,75$	$3,06 \pm 0,32$	0.03 ± 0.01
Mamão	0.98 ± 0.12	$9,15 \pm 0,93$	$6,88 \pm 0,71$	$0,10 \pm 0,01$
Liofilizada	$1,75 \pm 0,25$	$7,91 \pm 0,82$	$9,98 \pm 0,95$	$0,55 \pm 0,05$
Reidratada*	$2,04 \pm 0,23$	$9,80 \pm 0,95$	16,26 ± 1,72	0.09 ± 0.01
Chá verde	0.30 ± 0.03	$5,30 \pm 0,53$	$1,69 \pm 0,17$	$0,12 \pm 0,01$
Vinho	0.88 ± 0.09	$2,81 \pm 0,31$	$2,74 \pm 0,30$	$0,17 \pm 0,02$

*Biomembrana foi rehidratada com água por 48 horas em estufa a 35°C

As condições de obtenção da biomembrana para este teste foram:

- Volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), tempo de cultivo: 7 dias e pH inicial: 3,5:
- Meio de cultivo de beterraba (suco de beterraba: equivalente a 18 g/L de açúcar).
- Meio de cultivo de manitol (extrato de levedura (5g/L), peptona (3,0 g/L), manitol (25 g/L), ágar (15 g/L).
- Meio de cultivo de vinho (vinho: 33% v/v, água destilada: 33% v/v, chá verde: 34% v/v e concentração de açúcar: 50 g/L).
- Meio de cultivo de chá verde (concentração de açúcar: 50 g/L).

- Meio de cultivo de laranja (concentração de suco de laranja: 25% v/v, concentração de chá verde: 75% v/v e concentração de açúcar: 50 g/L).
- Meio de cultivo de mamão (suco de mamão: 50% v/v, suco de laranja: 19% v/v, concentração de chá verde: 31% v/v e concentração de açúcar: 50 g/L).
- Biomembrana com calêndula (biomembrana obtida em meio de chá verde liofilizada e com 3 mL de extrato hidroalcoólico de calêndula).

Embora a celulose bacteriana seja um gel altamente higroscópico, a sua textura é única e diferente dos hidrogéis típicos, sendo que a elasticidade original não se recupera se a estrutura do gel for danificada. Esta característica se deve ao fato do gel ser constituído por microfibrilas — e não por segmentos de cadeia molecular, como nos géis de ágar ou gelatina, que podem assumir forma termodinamicamente estável. O módulo de elasticidade é inversamente proporcional à elasticidade.

Na Tabela 10, verifica-se que a flexibilidade da biomembrana reidratada e da biomembrana com adição de calêndula (0,03 Mpa) é maior que a das demais. Por outro lado, a biomembrana liofilizada mostrou-se mais rígida (0,55 MPa) do que as demais biomembranas. Portanto, a adição do extrato hidroalcoólico da calêndula à biomembrana liofilizada aumentou a flexibilidade de 0,55 mPa para 0,03 mPa. Isto indica que a interação entre o extrato hidroalcoólico de calêndula e as fibras de celulose foi positiva para a flexibilidade da biomembrana. A adição de vinho ao meio de cultivo de chá verde aumentou o módulo de elasticidade à punção de 0,09 para 0,27 mPa. Isto significa que a biomembrana obtida em meio de vinho é menos flexível que a biomembrana obtida em chá verde. A suplementação de laranja também aumentou o módulo de elasticidade à punção de 0,09 para 0,11 mPa. A biomembrana de laranja é mais flexível que a de vinho e 20% menos flexível que a de chá verde. O módulo de elasticidade à punção da biomembrana obtida em meio de laranja, em meio de chá verde e em meio de mamão foi similar. A biomembrana mais flexível foi aquela obtida em meio de chá verde, à qual foi incorporada extrato hidroalcoólico de calêndula. Dados similares foram descritos por Saibuatong et al. (2010), para a obtenção de celulose bacteriana com aloe vera.

5.11.2 Teste de tração e alongamento

A seguir, são apresentados dados dos testes de tração e alongamento da biomembrana de celulose obtida nos diferentes meios de cultivo (Tabela 11). Os ensaios foram realizados em triplicata, de acordo com norma da ABNT NBR ISO 1924-2 a 23°C, 50%, (umidade relativa), pelo laboratório SINPACEL, localizado em Curitiba, Paraná, Brasil.

As condições de obtenção da biomembrana para este teste foram:

- Volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), tempo de cultivo: 7 dias e pH inicial: 3,5.
- Meio de cultivo de beterraba (suco de beterraba: equivalente a 18 g/L de açúcar), meio de cultivo de colágeno (colágeno: 1,2% p/v e concentração de açúcar: 50 g/L),
- Meio de cultivo de vinho (vinho: 33% v/v, água destilada: 33% v/v, chá verde: 34% v/v e concentração de açúcar: 50 g/L),
- Meio de cultivo de chá verde (concentração de açúcar: 50 g/L), meio de cultivo de laranja (concentração de suco de laranja: 25% v/v, concentração de chá verde: 75% v/v e concentração de açúcar: 50 g/L),
- Meio de cultivo de mamão (concentração de suco de mamão: 50% v/v, concentração de suco de laranja: 19% v/v, concentração de chá verde: 31% v/v e concentração de açúcar: 50 g/L).

Não foi possível realizar o teste de resistência à tração e alongamento, na biomembrana obtida em meio de chá verde liofilizada com extrato hidroalcoólico de calêndula, devido às especificações do teste.

Tabela 11. Resistência à tração (média e desvios padrão) e TEA da biomembrana obtida nos diferentes meios de cultivo

	Resistência à Tração (kN/m)								
Corpo	Biomembrana	Biomembrana	Biomembrana	Biomembrana	Biomembrana	Biomembrana			
de	de	de	de	de	de	de			
Prova	Chá verde	Vinho	Colágeno	Mamão	Laranja	Beterraba			
1	0,94	1,11	0,76	0,92	1,72	4,35			
2	0,9	1,22	-	0,82	1,47	4,62			
3	1,1	1,16	-	0,69	-	3,99			
Média	0,98	1,16	0,76	0,81	1,60	4,32			
Desvio	0,11	0,06	-	0,12	0,18	0,32			
TEA									
(J/m ²)	6,57	123,985	-	10,34	127,51	108,54			

A biomembrana mais resistente à tração e mais flexível foi a biomembrana obtida em meio de beterraba, que é 4 vezes mais flexível que a biomembrana em meio de chá verde, provavelmente porque os componentes presentes no suco da beterraba interagem com as fibra de celulose, formando uma película mais flexível. A biomembrana menos resistente e menos flexível foi aquela biomembrana de colágeno, porque as moléculas de colágeno interagiram com as fibras de celulose e formaram uma biomembrana menos flexível. A resistência à tração e a flexibilidade das biomembranas obtidas no meio de chá verde, mamão e vinho foram muito semelhantes. A adição de suco de laranja ao meio de chá verde dobrou a elasticidade e a resistência à tração da biomembrana obtida em meio de chá verde, devido à interação positiva entre os componentes do suco de laranja e a fibras de celulose.

A Tabela 12 mostra os valores da porcentagem de alongamento (médias e desvios padrões) das biomembranas obtidas nos diferentes meios de cultivo.

Tabela 12. Porcentagem de alongamento com as respectivas médias e desvios padrões da biomembrana obtida nos diferentes meios de cultivo

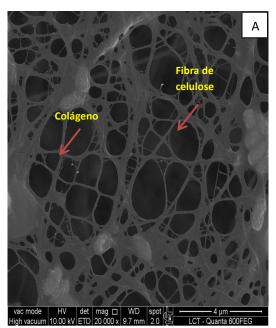
	Alongamento (%)							
Corpo de Prova	Biomembrana de Chá verde	Biomembrana de Vinho	Biomembrana de Colágeno	Biomembrana de Mamão	Biomembrana de Laranja	Biomembrana de Beterraba		
1	1,94	24,58	2,34	2,78	20,94	5,72		
2	1,56	21,65	-	2,79	21,00	6,68		
3	1,69	24,27	-	2,61	-	5,66		
Média	1,73	23,50	2,34	2,72	20,97	6,02		
Desvio	0,19	1,61	-	0,10	0,04	0,57		

Na Tabela 12, observa-se que a biomembrana que apresentou a maior porcentagem de alongamento foi aquela obtida em meio de vinho (23,50%), cuja porcentagem de alongamento foi aproximadamente 13 vezes maior do que a porcentagem de alongamento da biomembrana obtida em meio de chá verde, isso, provavelmente, devido ao ácido acético presente no vinho, que tem uma interação positiva com as fibras de celulose. A biomembrana obtida em meio de chá verde foi a que teve o menor grau de alongamento (1,73%). A adição de colágeno e de suco de mamão com suco de laranja ao meio de chá verde aumentou 35% e 57%, respectivamente, a porcentagem de alongamento da biomembrana obtida em meio de chá verde.

A porcentagem de alongamento da biomembrana obtida em meio de beterraba (6,02%) foi 3,5 vezes maior que a porcentagem alongamento da biomembrana obtida em meio de chá verde. A porcentagem de alongamento da biomembrana de laranja (20,97%) foi 12 vezes maior que a porcentagem de alongamento da biomembrana de chá verde. A porcentagem de alongamento da biomembrana de chá verde (1,73%) foi metade da porcentagem de alongamento da membrana de celulose (3,5%) obtida por SAIBUATONG et al. (2010). Porém, a porcentagem de alongamento da biomembrana obtida em meio de vinho (23,50%) foi 4,6 vezes maior que a porcentagem de alongamento da membrana de celulose, com 30% de aloe vera (5%) obtida por Saibuatong et al., 2010.

5.12 Microscopia eletrônica de varredura

As Figuras 49, 50, 51, 52, 54, 55 mostram as fotos da microscopia eletrônica de varredura das biomembranas obtidas em diferentes meios de cultivos.



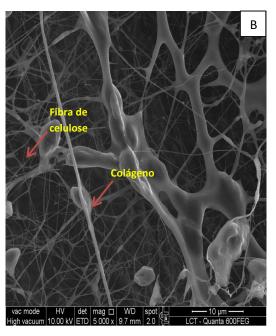
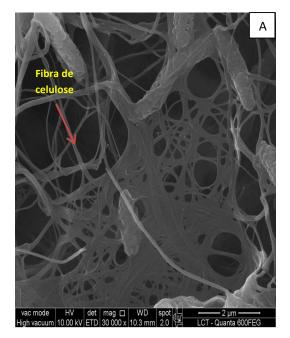


Figura 49. Microscopia eletrônica de varredura da biomembrana obtida em meio de colágeno (concentração de colágeno: 1,2% p/v e concentração de sacarose: 50 g/L), aumento 20.000 X (A) e aumento 5.000 X (B). (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)



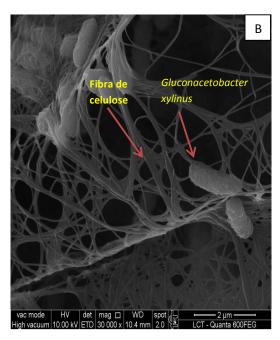
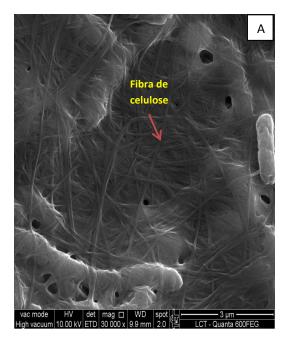


Figura 50. Microscopia eletrônica de varredura da biomembrana obtida em meio de beterraba (concentração de suco de beterraba: equivalente a 18 g/L de açúcar), aumento 30.000 X (A) e (B). (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)



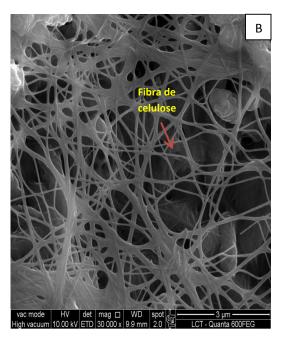
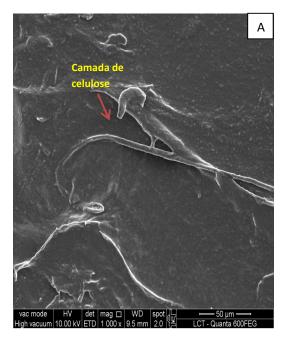


Figura 51. Microscopia eletrônica de varredura da biomembrana obtida em meio de mamão (concentração de suco de mamão: 50% v/v, concentração de suco de laranja: 19% v/v, concentração de chá verde: 31% v/v e concentração de sacarose: 50 g/L), aumento 30.000 X (A) e (B). (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)



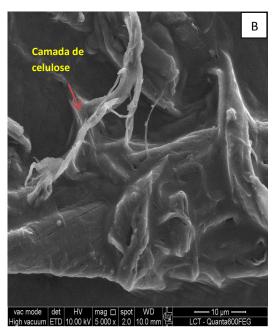
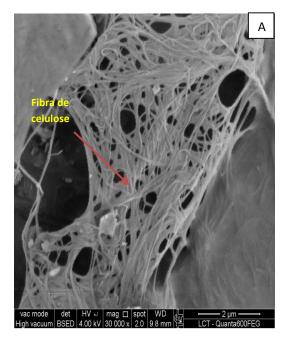


Figura 52. Microscopia eletrônica de varredura da biomembrana obtida em meio de vinho (concentração de vinho: 33% v/v, água destilada: 33% v/v, concentração de chá verde: 34% v/v e concentração de sacarose: 50 g/L), aumento 1.000 X (A) e aumento 5.000 X(B). (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)



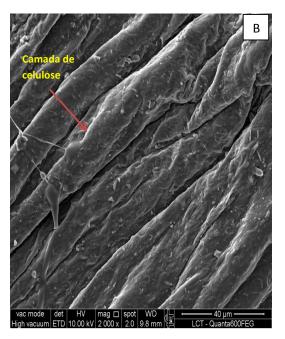
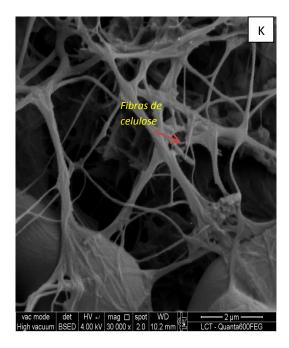


Figura 53. Microscopia eletrônica de varredura da biomembrana obtida em meio de chá verde (concentração de sacarose: 50 g/L), aumento 30.000 X (A) e aumento 10.000 X(B). (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)



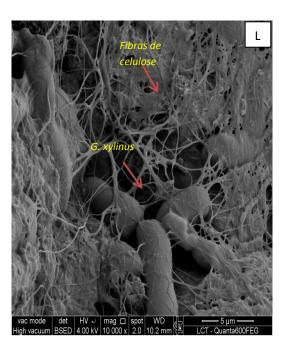


Figura 54. Microscopia eletrônica de varredura da biomembrana obtida em meio de laranja (concentração de suco de laranja: 25% v/v, concentração de chá verde 75% v/v e concentração de sacarose: 50 g/L), aumento 30.000 X (A) e aumento 10.000 X (B). (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)

As fotos de microscopia eletrônica da biomembrana obtida nos diferentes meios de cultura mostram que, morfologicamente, a biomembrana é constituída por finas camadas de fibras de celulose, independentemente da região analisada. A microscopia da biomembrana obtida em meio de chá verde (Figura 53) mostra a estrutura das fibras e a homogeneidade da biomembrana. Esta estrutura é similar a estrutura da membrana de celulose bacteriana com aloe vera obtida por Saibuatong et al. (2010). A estrutura da biomembrana obtida em todos os meios de cultivos foi semelhante. Dados similares foram reportados por Ruka et al. (2012).

A estrutura das biomembranas é semelhante à estrutura da polpa de papel. As pontes de hidrogênio entre as fibrilas são responsáveis pela resistência da biomembrana, no caso da celulose bacteriana, a densidade das pontes de hidrogênio interfibrilas é muito maior e o diâmetro das fibrilas é muito menor do que os das fibras de papel (YAMANAKA e BUDHIONO, 2000).

A estrutura das fibras de CB consiste em uma rede tridimensional não reticulada, compartilhando estrutura química semelhante à celulose vegetal, cuja interação entre as pontes de hidrogênio inter e intrafibrilar resulta em um hidrogel com elevada força (FU, ZHANG e Yang, 2013).

A formação da película de celulose bacteriana pode ser influenciada pela composição do meio, pela fonte de carbono, pela viscosidade do meio, pela cepa *Acetobacter xylinum* e por fatores operacionais, relacionados à síntese de celulose ao nível molecular (KLEMM et al., 2006). Na Figura 54, observa-se que os poros da biomembrana obtida em meio de laranja são menores que os poros daquela obtida em meio de chá verde, fazendo com que a biomembrana obtida em meio de laranja seja mais compacta. Nas fotos das microscopias da biomembrana obtida em meio de colágeno, observa-se que as moléculas de colágeno estão envolvidas pelas fibras de celulose. Todas as biomembranas apresentam estrutura similar, porém o tamanho e a quantidade dos poros são diferentes, devido à interação dos componentes dos meios e as fibras de celulose.

5.13 Espectroscopia – FTIR

A seguir, são apresentados os dados da espectroscopia infravermelho (FTIR), em comprimento de onda de 400 a 4.000 cm⁻¹, da biomembrana de celulose obtida nos diferentes meios de cultivo.

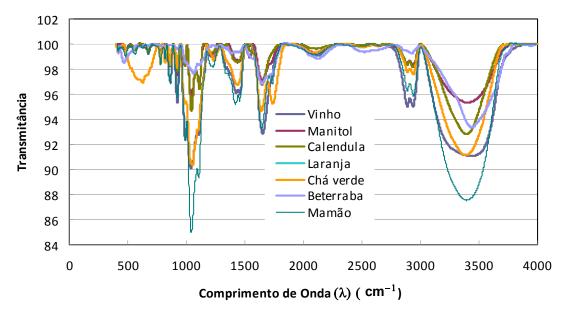


Figura 55. Espectroscopia (FTIR) da biomembrana obtida nos diferentes meios de cultivo.

As condições de obtenção da biomembrana para este teste foram:

- Volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), tempo de cultivo: 7 dias e pH inicial: 3,5:
- Meio de cultivo de beterraba (suco de beterraba: equivalente a 18 g/L de açúcar).
- Meio de cultivo de manitol (extrato de levedura (5g/L), peptona (3,0 g/L), manitol (25 g/L), ágar (15 g/L).
- Meio de cultivo de vinho (vinho: 33% v/v, água destilada: 33% v/v, chá verde: 34% v/v e concentração de açúcar: 50 g/L).
- Meio de cultivo de chá verde (concentração de açúcar: 50 g/L).
- Meio de cultivo de laranja (concentração de suco de laranja: 0, 150 L (25% v/v), concentração de chá verde 75% v/v e concentração de açúcar: 50 g/L).
- Meio de cultivo de mamão (concentração de suco de mamão: 50% v/v, concentração de suco de laranja: 19% v/v, concentração de chá verde: 31% v/v e concentração de açúcar: 50 g/L).
- Biomembrana com calêndula (biomembrana obtida em meio de chá verde liofilizada e com 3 mL de extrato hidroalcoólico de calêndula).

A FTIR da biomembrana de celulose obtida nos diferentes meios de cultivo foi feita para se determinar a ocorrência de novos picos ou a alteração de qualquer pico que pudesse ser atribuída à interação entre os componentes do meio de cultivo e a celulose (Figura 55). O espectro de absorção da celulose é a banda 1.642,9 cm⁻¹, que tem sido designada para o grupo carbonila, e a banda 1.090 cm⁻¹, que designa a ligação entre os grupos C-O.

Os espectros FTIR de todas as amostras foram conduzidos na faixa de comprimento de onda de 400 a 4.000 cm⁻¹ e estão descritos na Figura 55. Na região de 1.800 a 1.500 cm⁻¹, a absorção da celulose ocorreu na banda de 1.642,9 cm⁻¹ (grupo carbonila) (KLEMM et al., 2006). A banda 1.650 – 1.578 cm⁻¹, que caracteriza a ligação C-O, se sobrepõe com a ligação N-H. A absorção na banda 1.565 – 1.540 cm⁻¹ foi ocasionada pela deformação NH. Todas as biomembranas tiveram espectro FTIR semelhante. Os espectros FTIR demonstram que as biomembranas são compostas por celulose e que não houve interação entre os componentes do meio

de cultivo e as fibras de celulose. Dados similares foram relatados por Saibuatong et al. (2010), na produção de celulose bacteriana com aloe vera.

5.14 Porosidade

A porosidade da biomembrana de celulose obtida em meio de chá verde foi determinada por Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Figura 56). A porosidade da biomembrana obtida no meio de mamão, no meio de colágeno, no meio de beterraba e no meio de laranja foi determinada por microscopia eletrônica de varredura (Tabela 13 e Figura 57).

A Figura 56 descreve a curva do diâmetro do poro pelo volume do poro da biomembrana liofilizada, obtida em meio de chá verde, realizada através da metodologia de BET.

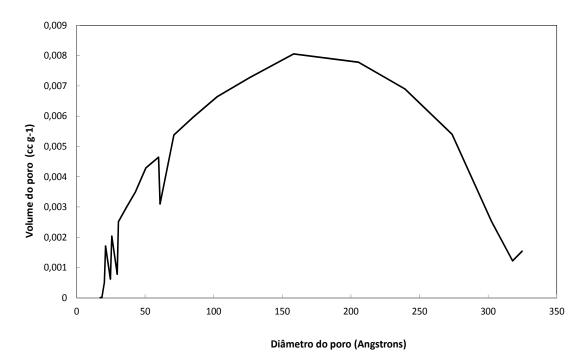


Figura 56. Volume do poro em função do diâmetro dos poros da biomembrana obtida em meio de chá verde (análise BET)

A área de superfície total e a média do tamanho dos poros da biomembrana obtidas em meio de chá verde liofilizado foram 2,07 m²/g e 158,2 Angstrons, respectivamente (determinada por BET). A Figura 56 mostra que a curva do volume

do poro pelo tamanho do poro é uma parábola, com ponto de máximo em 148 Angstrons (diâmetro do poro) e volume de poro de 0,08 cc/g. O tamanho do poro da biomembrana obtida em meio de chá verde é 33% menor que o tamanho do poro (224 Angstrons) da membrana de celulose seca desenvolvida por SAIBUATONG et al., 2010 e, semelhante ao da membrana de celulose reidratada com 10% de aloe vera (154 Angstrons) obtida por Saibuatong et al. (2010). A área da superfície total da biomembrana de chá verde (2,07 m²/g) é cerca de 6 vezes menor, que a área da superfície total (12,6 m²/g) da membrana de celulose seca, desenvolvida por Saibuatong et al. (2010).

Tabela 13. Média do tamanho dos poros das biomembranas obtidas em diferentes meios de cultivo

Biomembrana	Média dos	Desvio
	poros (nm)	Padrão
Beterraba	517,9	71,2
Colágeno	425,4	80,4
Mamão	315,1	66,0
Laranja	1123,8	9,2
Chá	1582,0	16,2

As condições de obtenção da biomembrana para este teste foram:

- Volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), tempo de cultivo: 7 dias e pH inicial: 3,5;
- Meio de cultivo de beterraba (suco de beterraba: equivalente a 18 g/L de açúcar).
- Meio de cultivo de colágeno (concentração de colágeno: 1,2% p/v e concentração de açúcar: 50 g/L)
- Meio de cultivo de chá verde (concentração de açúcar: 50 g/L).
- Meio de cultivo de laranja (concentração de suco de laranja: 25% v/v, concentração de chá verde 75% v/v e concentração de açúcar: 50 g/L).
- Meio de cultivo de mamão (concentração de suco de mamão: 50% v/v, concentração de suco de laranja: 19% v/v, concentração de chá verde: 31% v/v e concentração de açúcar: 50 g/L).

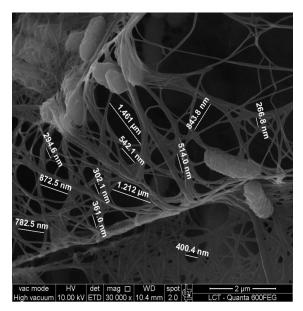


Figura 57 A. Microscopia eletrônica da da biomembrana de beterraba, aumento 30.000 X (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)



Figura 57 B. Microscopia eletrônica da biomembrana chá verde, 30.000X (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)

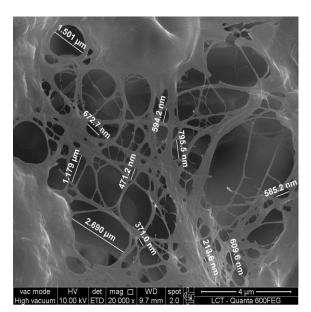


Figura 57 C. Microscopia eletrônica da da biomembrana de colágeno, aumento 20.000 X (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)

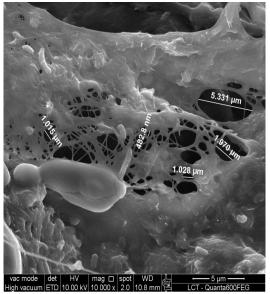


Figura 57 D. Microscopia eletrônica da biomembrana de laranja, 10.000X (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)

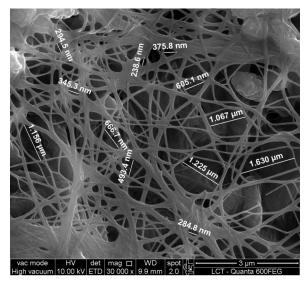


Figura 57 E. Microscopia eletrônica da da biomembrana de mamão, aumento 30.000 X (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)

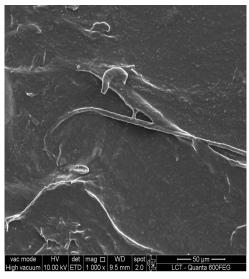


Figura 57 F. Microscopia eletrônica da biomembrana de vinho, 1.000X (Autor: Denise Vieira, Ano: 2012)

A média do tamanho dos poros da biomembrana obtida em meio de chá verde (1582 nm) e a média do tamanho dos poros da biomembrana obtida em meio de laranja (1123 nm) são semelhantes. A média do tamanho dos poros das biomembranas obtidas nos meios de laranja e chá verde é maior que a média do tamanho dos poros daquelas produzidas nos demais meios (beterraba, colágeno e mamão). A biomembrana obtida em meio de beterraba apresenta média de tamanho de poros (517,9 nm), que é metade da média do tamanho dos poros da daquela obtida em meio de chá verde e, aproximadamente 21% maior do que a média do tamanho dos poros da biomembrana obtida em meio de colágeno (425,4 nm). A biomembrana obtida em meio de mamão apresenta a menor média do tamanho de poros (315 nm), sendo 5 vezes menor que a média do tamanho dos poros da obtida em meio de chá verde. A biomembrana obtida em meio de vinho é muito densa e não foi possível medir o tamanho dos poros. Estes resultados estão de acordo com os dados da microscopia eletrônica de varredura.

5.15 DSC

A curva de DSC (temperature (temperatura) em função do Heat flow (taxa de aquecimento)) foi realizada para verificar se há variação no comportamento térmico da biomembrana obtida nos diferentes meios de cultivo.

A Figura 58, mostra as curvas de DSC da biomembrana de celulose obtida nos diferentes meios de cultivo (A e B: biomembrana obtida em meio de chá verde, C: biomembrana obtida em meio de mamão, D: biomembrana obtida em meio de laranja, E: biomembrana obtida em meio de beterraba, F: biomembrana obtida em meio de vinho e G: biomembrana obtida em meio de chá verde com calêndula).

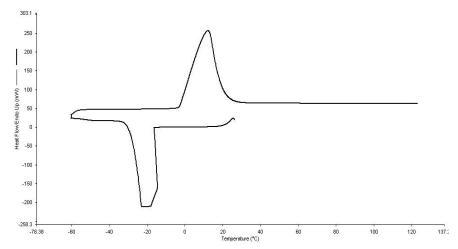


Figura 58 A. Curva de DSC da biomembrana obtida em meio de chá verde (concentração de açúcar: 50 g/L), faixa de temperatura: -60°C a 137°C.

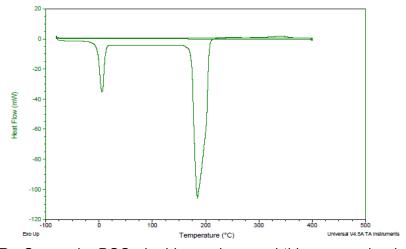


Figura 58 B. Curva de DSC da biomembrana obtida em meio de chá verde (concentração de açúcar: 50 g/L), faixa de temperatura: -100°C a 450°C.

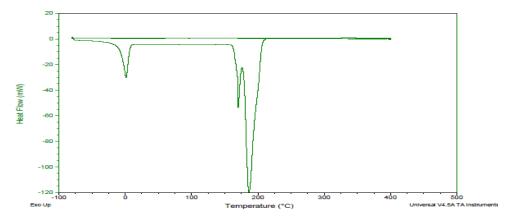


Figura 58 C. Curva de DSC da biomembrana obtida em meio de mamão (suco de mamão: 50% v/v, suco de laranja: 19% v/v, chá verde: 31% v/v e concentração de açúcar: 50 g/L), faixa de temperatura: -100°C a 450°C.

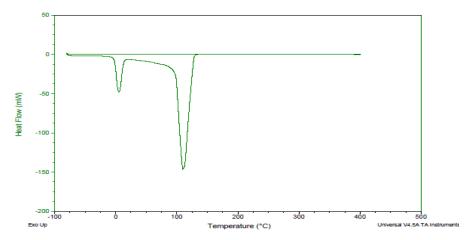


Figura 58 D. Curva de DSC da biomembrana obtida em meio de laranja (concentração de suco de laranja: 25% v/v, concentração de chá verde: 75% v/v e concentração de açúcar: 50 g/L), faixa de temperatura: -100°C a 450°C.

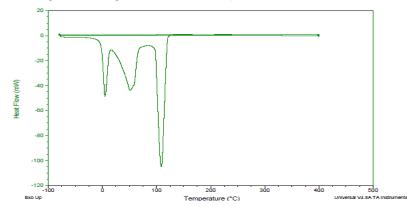


Figura 58 E. Curva de DSC da biomembrana obtida em meio de beterraba (suco de beterraba equivalente a 18 g/L de sacarose), faixa de temperatura: -100°C a 450°C.

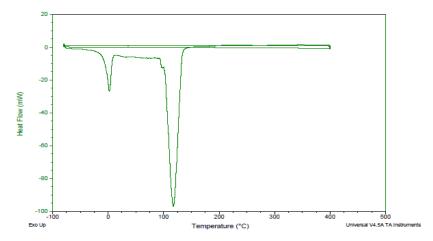


Figura 58 F. Curva de DSC da biomembrana obtida em meio de vinho (vinho: 33% v/v, chá verde: 34% v/v, água destilada: 33% v/v e concentração de açúcar: 50 g/L), faixa de temperatura: -100°C a 450°C.

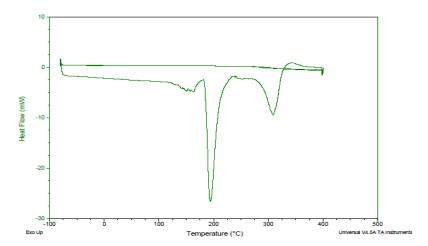


Figura 58 G. Curva de DSC da biomembrana obtida em meio de chá verde com calêndula, faixa de temperatura: -100°C a 450°C.

As condições de obtenção da biomembrana para este teste foram: volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), tempo de cultivo: 7 dias e pH inicial: 3,5.

A curva de DSC (Figura 58 A) da biomembrana de chá verde mostra que o ponto de vitrificação está em torno de -20°C, que o ponto de cristalização está em torno de 10°C e que não há degradação térmica até 137°C. Esta curva foi realizada para verificar se a biomembrana não sofreria degradação durante a esterilização em autoclave (121°C por 30 minutos).

A Figura 58 B mostra que a biomembrana em meio de chá verde apresenta 2 picos endotérmicos: um a 10°C e outro a 180°C. A biomembrana liofilizada de chá verde com calêndula (Figura 58 G) apresentou 2 picos endotérmicos, sendo um a

200°C e outro a 325°C. A biomembrana de vinho apresentou 2 picos endotérmicos, um a 110°C e outro, 10°C (Figura 58 F).

A Figura 58 C mostra que a biomembrana de mamão apresenta 2 picos endotérmicos, um a 10°C e o outro a 180°C.

A biomembrana de laranja (Figura 58 D) possui 2 picos endotérmicos (10°C e 110°C). A biomembrana de beterraba tem 3 picos endotérmicos, sendo um a 10°C, outro em 75°C e o último a 110°C. Estes dados indicam que a estabilidade térmica das biomembranas obtidas nos diferentes meios de cultivo é diferentes

Tabela 14. Picos endotérmicos das biomembranas obtidas nos diferentes meios de cultivo

Biomembrana	1º pico	2º pico	3º pico
Beterraba	10°C	75°C	110°C
Vinho	10°C	110°C	
Laranja	10°C	110°C	
Mamão	10°C	180°C	
Chá verde	10°C	180°C	
Calêndula	180°C	325°C	

Conforme se observa na Tabela 14, a maioria das biomembranas apresentou 2 picos endotérmicos. O primeiro pico endotérmico, da curva de DSC das biomembranas de chá verde, de mamão, de laranja, de beterraba e de vinho, ocorreu em torno de 10°C. Enquanto que o primeiro pico endotérmico da biomembrana de chá verde com calêndula ocorreu em torno de 180°C, mostrando que a interação da calêndula com as fibras de celulose da biomembrana de chá verde foi positiva, aumentando a estabilidade térmica da biomembrana formada em meio de chá verde. O segundo pico endotérmico da biomembrana de mamão e de chá verde foi em torno de 180°C. O segundo pico endotérmico da biomembrana de laranja e de vinho ocorreu em torno de 110°C, enquanto que o segundo pico da biomembrana de beterraba foi em 75°C, e o da biomembrana de chá verde com de calêndula foi a 320°C. A biomembrana de beterraba ainda apresentou um terceiro pico endotérmico, a 110°C. A diferença no comportamento térmico das biomembranas obtidas nos diferentes meios de cultivo são devidas à interação dos componentes dos meios de cultivo com a fibra de celulose.

5.16 Difração de Raio-X

O espectro da difração de Raio-X da biomembrana obtida nos diferentes meios de cultivo (ângulo 2θ variando 5 até 90°) foi realizado, para se verificar se os componentes dos meios de cultivo interferem na cristalinidade da biomembrana. A Figura 59 mostra o espectro da difração de Raio-X da biomembrana de celulose obtida nos diferentes meios de cultivo.

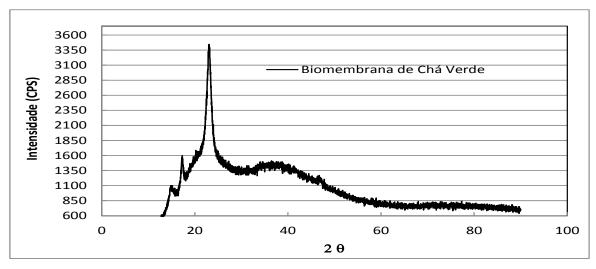


Figura 59 A. Espectro da difração de Raio-X da biomembrana obtida em meio de chá verde (concentração de açúcar: 50 g/L), 2θ (5 a 90°).

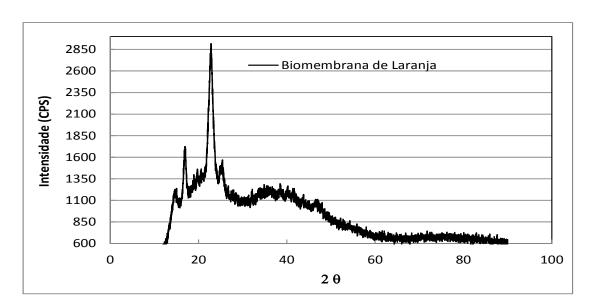


Figura 59 B. Espectro da difração de Raio-X da biomembrana obtida em meio de laranja (concentração de suco de laranja: 25% v/v, concentração de chá verde: 75% v/v e concentração de açúcar: 50 g/L), 20 (5 a 90°).

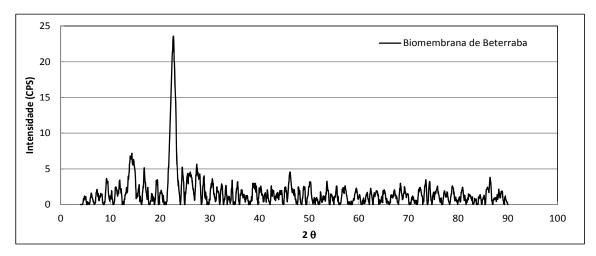


Figura 59 C. Espectro da difração de Raio-X da biomembrana obtida em meio de beterraba (suco de beterraba equivalente a 18 g/L de sacarose), 20 (5 a 90°).

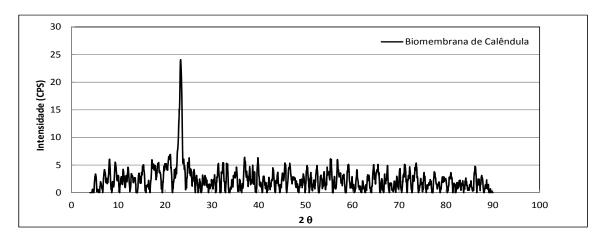


Figura 59 D. Espectro da difração de Raio-X da biomembrana obtida em meio de chá verde incorporada com calêndula, 20 (5 a 90°).

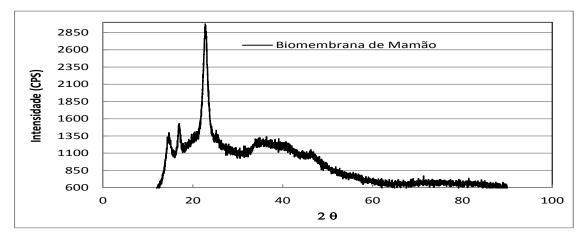


Figura 59 E. Espectro da difração de Raio-X da biomembrana obtida em meio de mamão (suco de mamão: 50% v/v, suco de laranja: 19% v/v, chá verde: 31% v/v e concentração de açúcar: 50 g/L), 2θ (5 a 90°).

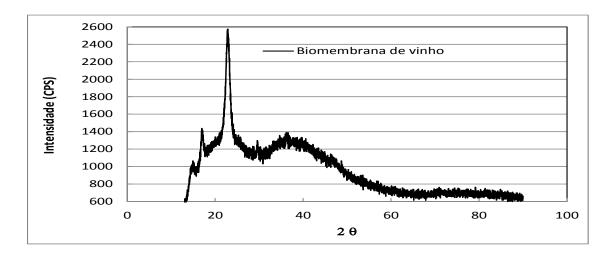


Figura 59 F. Espectro da difração de Raio-X da biomembrana obtida em meio de vinho (vinho: 33% v/v, água: 33% v/v, chá verde: 34% v/v e concentração de açúcar: 50 g/L), 20 (5 a 90°).

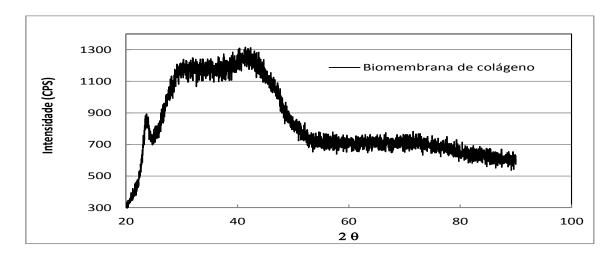


Figura 59 g. Espectro da difração de Raio-X da biomembrana obtida em meio de colágeno (colágeno: 1,2% v/v, chá verde: 98% v/v e concentração de açúcar: 50 g/L), 2θ (5 a 90°).

Tabela 15. Índice de cristalinidade (%) das biomembranas de celulose obtidas em diferentes meios de cultivo.

Biomembrana	Índice de Cristalinidade (%)
Chá verde	60
Beterraba	70
Calêndula	72
Laranja	61
Vinho	50
Mamão	59
Colágeno	47

O espectro de difração de Raio-X da biomembrana de celulose obtida nos diferentes meios de cultivo apresentaram um pico em torno de 22,4, que é o pico característico da celulose. Devido à celulose bacteriana não ser um material completamente cristalino, os espectros de difração apresentam picos largos. As biomembranas obtidas nos diferentes meios de cultivo apresentaram índices de cristalinidade diferentes. O índice de cristalinidade da biomembrana obtidas nos diferentes meios de cultivo, foi calculado de acordo com a fórmula 5, descrita na secção 4.4.9 e estão resumidos na Tabela 15.

Na Tabela 15, observa-se que a membrana de calêndula apresenta o maior índice de cristalinidade (72%), que é 20% maior que o índice de cristalinidade da biomembrana obtida em meio de chá verde, 18% menor que o da membrana de celulose sem adição de CMC obtida por Cheng, Catchmark e Demirci (2009) e similar ao índice de cristalinidade da membrana de celulose sem aloe vera obtida por Saibuatong et al. (2010). A adição de laranja ao meio de chá verde praticamente não alterou o índice de cristalinidade.

O índice de cristalinidade da biomembrana de beterraba é 17% maior que da biomembrana de chá verde e praticamente igual a membrana de celulose com aloe vera obtida por Saibuatong et al. (2010). Enquanto que, o índice de cristalinidade da biomembrana de vinho é 17% menor que o da biomembrana de chá verde.

A alta intensidade dos picos pode ser resultado da densa estrutura, principalmente no caso da biomembrana de beterraba e da biomembrana de chá verde liofilizada com calêndula.

No geral, os parâmetros, como composição do meio de cultivo, pH e temperatura, podem influenciar o crescimento bacteriano e a biossíntese de celulose bacteriana. O aumento do índice de cristalinidade da biomembrana pode ser devido ao aumento da organização das cadeias poliméricas.

A adição de colágeno 1,2% diminuiu o índice de cristalinidade da biomembrana de chá verde em 21%, resultados semelhantes foram encontrado por Cheng Cheng, Catchmark e Demirci (2009) com a adição de CMC ao meio de cultivo. Estes resultados indicam que os meios utilizados com exceção do colágeno aumentaram a organização das fibras de celulose, de modo a uniformizar e a formar uma rede de fibra de celulose mais estruturada que as fibras da biomembrana de chá verde.

5.17 Análise de custo

A seguir, é apresentada a análise de custo da obtenção da biomembrana de celulose em meio de chá verde e em meio de beterraba. Esta análise levou, em consideração, apenas os custos dos componentes do meio de cultivo, não sendo considerados a mão de obra, os equipamentos, a energia e os outros custos operacionais.

Os valores do chá verde, vinho e do açúcar cristal foram baseados nos preços do site www.extra.com.br acessado em 10/Jan/2013 e os preços das frutas do varejão localizado na Av. Agua Funda, São Paulo, SP.

Tabela 16. Custo do meio de cultivo de chá verde utilizado para obter a biomembrana de celulose

Componente	Quantidade	Valor	Total
Chá verde	6,7 g/L	R\$ 0,03/g chá verde	R\$ 0,20
Açúcar Cristal	50,0 g/L	R\$ 2,18/kg	R\$ 0,11
TOTAL			R\$ 0,31/L

Considerando que em meio de chá verde (volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), com concentração de açúcar de 50 g/L, pH inicial de 3,5 e tempo de cultivo de 7 dias) se obtém em média 24 g celulose/L, o cálculo do custo do meio de chá verde, para se obter 1 g de celulose, é:

Portanto, o custo do meio de cultivo para obter 1 g de biomembrana de celulose em meio chá verde é de R\$ 0,012.

Tabela 17. Custo do meio de cultivo de beterraba (concentração de suco de beterraba equivalente a 18 g/L de sacarose) utilizado para obter a biomembrana de celulose

Componente	Quantidade	Valor	Total
Chá verde	6,7 g/L	R\$ 0,03/g chá verde	R\$ 0,20
Beterraba	250 g/L*	R\$ 3,00/kg**	R\$ 0,60*
TOTAL			R\$ 0,80/L

^{*300} g de beterraba são necessárias para produzir 200 mL de suco de beterraba e 100 mL de suco de beterraba são usados para 600 mL de meio de cultivo.

Considerando que em meio de beterraba (equivalente a 18 g/L de sacarose, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), com pH inicial de 3,5 e tempo de cultivo 10 dias) se obtém, em média, 25,5 g celulose/L, o cálculo do custo do meio de beterraba, para produzir 1 g de celulose é:

Custo para obter 1 g de celulose em meio de beterraba (utilizando resíduo):

Portanto, o custo do meio de cultivo de beterraba para produzir 1 grama de celulose é de R\$ 0,032 por grama de celulose. O custo do meio de cultivo de beterraba é 3 vezes maior que o custo do meio de cultivo de chá verde para se obter 1 g de celulose. Porém, o custo do meio de beterraba pode ser reduzido a R\$ 0,008 g/ celulose, com a utilização de resíduo de beterraba. Redução de 50% no valor do meio de cultivo quando se compara com o meio de chá verde.

^{**} Valor do quilo da beterraba na feira livre. Este valor pode ser zero se for utilizado resíduo de beterraba.

Tabela 18. Custo do meio de cultivo de mamão (concentração de suco de mamão 33% v/v, 17% v/v de suco de laranja) utilizado para obter a biomembrana de celulose

Componente	Quantidade	Valor	Total
Chá verde	6,7 g/L	R\$ 0,03/g chá verde	R\$ 0,20
Mamão	500 g/L*	R\$ 1,50/kg*	R\$ 0,75***
Laranja	600 g/L**	R\$ 1,70/kg**	R\$ 1,00***
Açúcar Cristal	50,0 g/L	R\$ 2,18/kg	R\$ 0,11
TOTAL			R\$ 2,06/L

^{*500} g de mamão são necessárias para produzir 200 mL de suco de mamão e 200 mL de suco de beterraba são usados para 1 L de meio de cultivo.

Considerando que em meio de mamão (33% v/v de suco de mamão, 17% v/v se suco de laranja volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), com pH inicial de 3,5 e tempo de cultivo 10 dias) se obtém, em média, 70 g celulose/L, o cálculo do custo do meio de beterraba, para produzir 1 g de celulose é:

Custo para obter 1 g de celulose em meio de mamão (utilizando resíduo):

^{**600} g de laranja são necessárias para produzir 200 mL de suco de laranja e 200 mL de suco de laranja são usados para 1 L de meio de cultivo.

^{** *} Este valor pode ser zero se for utilizado resíduo de mamão e laranja.

Portanto, o custo do meio de cultivo para obter 1 g de biomembrana de celulose em meio mamão é de R\$ 0,028. Esse custo pode ser reduzido para R\$ 0,004 se for utilizado resíduo

Tabela 19. Custo do meio de cultivo de laranja (concentração de suco de laranja 15% v/v) utilizado para obter a biomembrana de celulose

Componente	Quantidade	Valor	Total
Chá verde	6,7 g/L	R\$ 0,03/g chá verde	R\$ 0,20
Laranja	600 g/L*	R\$ 1,70/kg*	R\$ 1,00**
Açúcar Cristal	50,0 g/L	R\$ 2,18/kg	R\$ 0,11
TOTAL			R\$ 1,31/L

^{*600} g de laranja são necessárias para produzir 200 mL de suco de laranja e 200 mL de suco de laranja são usados para 1 L de meio de cultivo.

Considerando que em meio de laranja (15% v/v de suco de laranja, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), com pH inicial de 3,5 e tempo de cultivo 10 dias) se obtém, em média, 13 g celulose/L, o cálculo do custo do meio de beterraba, para produzir 1 g de celulose é:

Custo para obter 1 g de celulose em meio de laranja utilizando resíduo):

^{**} Este valor pode ser zero se for utilizado resíduo de laranja.

Portanto, o custo do meio de cultivo para obter 1 g de biomembrana de celulose em meio de laranja é de R\$ 0,09. Esse custo pode ser reduzido para R\$ 0,004 se for utilizado resíduo

Tabela 20. Custo do meio de cultivo de vinho (concentração de vinho 33% v/v) utilizado para obter a biomembrana de celulose

Componente	Quantidade	Valor	Total
Chá verde	6,7 g/L	R\$ 0,03/g chá verde	R\$ 0,20
Vinho	300 mL/L	R\$ 4,00/L	R\$ 1,20
Açúcar Cristal	50,0 g/L	R\$ 2,18/kg	R\$ 0,11
TOTAL			R\$ 1,51/L

Considerando que em meio de vinho (33% v/v de vinho, volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), com pH inicial de 3,5 e tempo de cultivo 10 dias) se obtém, em média, 50 g celulose/L, o cálculo do custo do meio de beterraba, para produzir 1 g de celulose é:

Portanto, o custo do meio de cultivo para obter 1 g de biomembrana de celulose em meio de vinho é de R\$ 0,03.

Tabela 21. Custo do meio de cultivo de colágeno 1,2 p/v utilizado para obter a biomembrana de celulose

Componente	Quantidade	Valor	Total
Chá verde	6,7 g/L	R\$ 0,03/g chá verde	R\$ 0,20
Colágeno	1,2 g/L	R\$ 1,00/g	R\$ 1,20
Açúcar Cristal	50,0 g/L	R\$ 2,18/kg	R\$ 0,11
TOTAL			R\$ 1,51/L

Considerando que em meio de colágeno 1,2 % v/v (volume de inóculo: 0,150 L (25% v/v), com pH inicial de 3,5 e tempo de cultivo 7 dias) se obtém, em média, 13 g celulose/L, o cálculo do custo do meio de beterraba, para produzir 1 g de celulose é:

Portanto, o custo do meio de cultivo para obter 1 g de biomembrana de celulose em meio de colágeno é de R\$ 0,12.

Para referência, atualmente, há no mercado o produto Membracel[®] (membrana de celulose), que é comercializado a R\$ 12,00/g (valor obtido no site www.membracel.com.br).

6 CONCLUSÃO

- Foi possível obter a biomembrana de celulose, a partir de uma técnica simples (cultura estática), em meios de cultivo naturais (chá verde, sucos de frutas e/ou de beterraba), cujo custo é baixo;
- A biomembrana em estudo tem o potencial de ser utilizada em procedimentos clínicos e cirúrgicos;
- No meio de mamão com suco de laranja (suco de laranja (19% v/v) e suco de mamão (50% v/v), pH inicial: 4,11, concentração de açúcar: 50 g/L, quantidade de inóculo: 0,150 L (25% v/v)) em 7 dias de cultivo, se obteve a maior produtividade (13,71 g de celulose/dia.L);
- No meio de mamão com suco de laranja (suco de laranja (17% v/v) e suco de mamão (50% v/v), pH inicial: 4,11, concentração de açúcar: 50 g/L, quantidade de inóculo: 0,150 L (25% v/v) em 15 dias de cultivo, se obteve a biomembrana com maior massa (78 g de celulose);
- O maior fator de conversão (2,36 g celulose/g de açúcar) foi obtido em meio de chá verde (pH inicial de 3,62, concentração de açúcar de 25 g/L, concentração de inóculo de 0,150 L (25% v/v)), em 25 dias de cultivo;
- Foi viável a utilização de sucos (resíduos) frutas estudadas (mamão, laranja e abacaxi), para obter a biomembrana;
- A adição de colágeno (1,5 % p/v), no meio de chá verde dobrou a massa da biomembrana;
- Foi possível substituir a sacarose proveniente do açúcar cristal pela sacarose do suco de beterraba;
- A biomembrana obtida em meio de chá verde apresentou boa capacidade de absorção de água (6 vezes o seu peso seco), enquanto que a capacidade de absorção de calêndula foi de 7 vezes o seu peso seco;
- A biomembrana, tem a capacidade de transferir extrato hidroalcoólico de calêndula, para uma biomembrana liofilizada (27%), isto indica que ela pode absorver e transferir extratos hidroalcoólicos;
- A incorporação do extrato de calêndula resultou no aumento da flexibilidade, da cristalinidade e das propriedades mecânicas da biomembrana obtida em meio de chá verde.

7 REFERÊNCIAS

- ADEJOYE, O.D.; ADEBAYO-TOYO, B.C.; OGUNJOBI, A.A.; OLAOYE, O.A.; FADAHUNSI, F.I. Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of Pleurotus florida, a Nigeria edible mushroom. African Journal of Biotechnology, v.5, p.1355–1359, 2006.
- 2. AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; YAMANOUCHI, S.; TAKIDO, M.; KUMAKI, K.; TAMURA, T. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. **Phytochemistry**, v.43, p.1255-1260, 1996.
- 3. ALONSO, L.R. **Tratado de fitomedicina**: bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires: Issis Ediciones, 1998. p.327-331.
- ALVARENGA, J. O. Padronização, classificação e rotulagem de frutas e hortaliças. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS CENTRAIS DE ABASTECIMENTO - ABRACEN. Manual operacional das Ceasas do Brasil. Belo Horizonte: AD2 Editora, 2011, p. 109-115.
- AUSMEES, N.; MAYER, R.; WEINHOUSE, H.; VOLMAN, G.; AMIKAM, D.; BENZIMAN, M.; LINDBERG, M. Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. FEMS Microbiology Letter, v. 204, n. 1, p. 163-167, 2001.
- 6. BAE, S.; SHODA, M. Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. **Biotechnology Progress**, v.20, p.1366–1371, 2004.
- 7. BAE, S.; SUGANO, Y.; SHODA, M. Improvement of bacterial cellulose production by addition of ágar in jar fermentor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.97, n.1, p.33-38, 2004.
- 8. BLUMENTHAL, M.; BUSSE, W.R. **The complete German Commission E monographs**: therapeutic guide o herbal medicines. Austin: American Botanical Council, Boston: Integrative Medicine Communications, 1998. 685p.
- 9. BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos**. 3.ed. São Paulo: Varela, 2001. p.60-62.
- 10.BORGOGNONI, C.F.; MAIZATO, M.J.S.; LEIRNER, A.A.; POLAKIEWICZ, B.; BEPPU, M.M.; HIGA, O.Z.; PITOMBO, R.N.M. Effect of freeze-drying on the mechanical, physical and morphological properties of glutaraldehyde-treated bovine pericardium: evaluation of freeze-dried treated bovine pericardium properties. Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics, v.8 n.3, p.186-190, 2010.
- 11. Brasil 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 89, de 16/03/2004. Dispõe sobre o registro de fitoterápicos simplificado. Diário Oficial da União, Brasília, DF, de 18 de março de 2004ª.

- 12.BROWN Jr., R.M.; WILLISON, J.H.M.; RICHARDSON, C.L. Cellulose biosynthesis in Acetobacter xylinum: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the *in vivo* process (darkfield microscopy/electron microscopy/bacterial envelope/microfibril/enzyme complex). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.73, n.12, p.4565-4569, 1976.
- 13. BROWN Jr., M.R.; SAXENA, I.M.; KUDLICKA, K. Cellulose biosynthesis in higher plants. **Trends in Plant Science**, v.1, n.5, p.149-156, 1996.
- 14. BUDHIONO, A.; ROSIDI, B.; TAHER, H.; IGUCHI, M. Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system. **Carbohydrate Polymers**, v.40, n.2, p.137-143, 1999.
- 15. CASTRO, C.; ZULUAGA,R. ÁLVAREZ, C.; PUTAUX, J.; CARO, G.; ROJAS, O. J.; MONDRAGON, I.; GAÑÁN, PIEDAD. Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter* genus. Carbohydrate Polymers V.89, p. 1033–1037, 2012
- 16. CASTRO, C.; EVORA, M.; BARO, M.; SORIANO, I.; SANCHEZ, E. Two-month ciprofloxacin implants for multibacterial bone infections. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.60, p.401-406, 2005.
- 17. CENTRAL DE ABASTECIMENTO PARA O ESTADO DE SÃO PAULO. Disponível em: http://www.ceagesp.gov.br. Acesso em: 8 fev. 2010.
- 18. CHANG, A. L.; TUCKERMAN, J. R.; GONZALEZ, G.; MAYER, R.; WEINHOUSE, H.; VOLMAN, G.; AMIKAM, D.; BENZIMAN, M.; GILLES-GONZALEZ, M. A. Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. **Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3420-3426, 2001.
- 19. CHEN, H.; PRITCHARD, H. W.; SEAL, C. E; NADARAJAN, J.; LI, W.; YANG, S.; KRANNER, I. Post desiccation germination of mature seeds of tea (Camellia sinensis L.) can be enhanced by pro-oxidant treatment, but partial desiccation tolerance does not ensure survival at −20°C. **Plant Science**, v. 184, p. 36–44, 2012.
- 20. CHENG, K.C.; CATCHMARK, J.M.; DEMIRCI. A. Effect of different additives on bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum and analysis of material property. Cellulose, v.16, n.6, p.1033-1045, 2009.
- 21. COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

- 22. CORDOVA, C.A.S.; SIQUEIRA, I.R.; NETTO, C.A.; YUNES, R.A.; VOLPATO, A.M.; CECHINEL FILHO, V.; CURI-PEDROSA, R.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Protective properties of butanolic extract of the *Calendula officinalis* L.(marigold) against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action as free radical scavenger. **Redox Report**, v.7, n.2, p.95-102, 2002.
- 23. CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINTAS, L.E.M. **Plantas medicinais, do cultivo à terapêutica**: contém formulação e modo de preparo de cosméticos. 2.ed. Rio de Janeiro: Petrópolis, Vozes, 2003. 246p.
- 24. DANESI, E.D.G.; WOSIACKI, G. Otimização da produção de nata (cellulose bacteriana) por fermentação em superfície. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.1, 1998. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611998000100027&Ing=en&nrm=iso&tIng=pt. Acesso em: 24 ago. 2008.
- 25. DAS, A. K.; COHEN, P. W.; BARFORD, D. The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. **Embo Journal**, v. 17, n. 5, p. 1192-1199, 1998.
- 26. DELLA-LOGGIA, R.; TUBARO, A.; SOSA, S.; BECKER, H.; SAAR, S.T.; ISSAC, O. The role of triterpenoids in the anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. **Planta Medica**, v.60, p.516-520, 1994.
- 27. DOBLIN, M. S.; KUREK, I.; JACOB-WILK, D.; DELMER, D. P. Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. **Plant and Cell Physiology**, v. 43, n. 12, p. 1407-1420, 2002.
- 28. EL-NAGGAR, A. Studies on cellulose production by tea fungus "kombucha". Tese (Mestrado em botânica (microbiologia)) – Universidade de Zagazig, Egito , 2007
- 29.ERENO, D. Celulose na pele. Bactéria produz substancia usada para tratar queimaduras e no revestimento de colete a prova de bala, 2004. Disponível em: http://revistapesquisa.fapesp.br/?art=2524&bd=1&pg=1&lg. Acesso em: 25 ago. 2008.
- 30. FAGUNDES, P.; SILVA, R.; NACHILUK, K.; MONDINI, L. Aproveitamento dos resíduos gerados no entreposto terminal de são paulo da CEAGESP. **Informações Econômicas**, SP, v. 42, n. 3, maio/jun. 2012.
- 31. FISHMAN, M. L.; CHAU, H. K.; COOKE, P. H.; YADAV, M. P.; HOTCHKISS, A. T. Physico-chemical characterization of alkaline soluble polysaccharides from sugar beet pulp. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1554–1562, 2009.
- 32.FONTANA, J.D.; JOERKE, C.G.; BARON, M.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, A.G.; TORRIANI, I.; SOUZA, A.M.; SOARES, M.B.; FONTANA, M.A.; GUIMARAES, M.F. Acetobacter cellulosic biofilms search for new modulators of cellulogenesis and native membrane treatments. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.63/65, p.327–338, 1997.

- 33. FRANCO, L.L. **As sensacionais 50 plantas medicinais campeãs de poder curativo**. Curitiba: Santa Mônica, 1996. 241p.
- 34. FRIESS, W.; ZHOU, W.; GROVES, M.J. *In vivo* activity of collagen matrices containing PS1, an antineoplastic glycan, against murine sarcoma cells. **Pharmacy and Pharmacology Communications**, v.2, n.3, p.121–124, 1996.
- 35.FRONZA, M.; HEINZMANN, B.; HAMBURGER, M.; LAUFER, S.; MERFORT, I. Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.126, p. 463–467, 2009.
- 36.FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1432–1442, 2013.
- 37.FUQUA, C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, n., p. 727-751, 1996
- 38. GALPERIN, M. Y.; NIKOLSKAYA, A. N.; KOONIN, E. V. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. **Fems Microbiology Letters**, v. 203, n. 1, p. 11-21, 2001.
- 39. GEIGER, M.; FREISS, W. The use of collagen as a biomaterial. **Pharmaceutical Technology Europe**, v.14, n.2, p.40–48, 2002a.
- 40. GEIGER, M.; FREISS, W. Collagen sponge implants. **Pharmaceutical Technology Europe**, v.14, n.4, p.58–66, 2002b.
- 41. GENEVAUX, P.; MULLER, S.; BAUDA, P. A rapid screening procedure to identify mini-Tn10 insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties. **FEMS Microbiology Letter**, v. 142, n. 1, p. 27-30, 1996.
- 42. GROMET-ELHANAN, Z.; HESTRIN, S. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. VI. Growth on citric acid-cycle intermediates. **Journal of Bacteriology**, v.85, p.284-292, 1963.
- 43. HENRISSAT, B.; DAVIES, G. J. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics. **Plant Physiology**, v. 124, n. 4, p. 1515-1519, 2000.
- 44. HENRISSAT, B.; CLAEYSSENS, M.; TOMME, P.; LEMESLE, L.; MORNON, J. P. Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. **Gene**, v. 81, n. 1, p. 83-95, 1989.

- 45. HEROLD, A.; CREMER, L.; CÃLUGARU, A.; TAMAS, V.; IONESCU, F.; MANEA, S.; SZEGLI, G. Hydroalcoholic plant extracts with anti-inflammatory activity. Roumanian Archives of Microbiology and Immunology, v.62, n.1/2, p.117-129, 2003.
- 46. HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum. **Biochemical Journal**, v.58, p.345–352, 1954.
- 47. IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose a masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**, v.35, n.2, p.261-270, 2000.
- 48. ISHIHARA, M.; MATSUNAGA, M.; HAYASHI, N.; TISLER, V. Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p.986–991, 2002.
- 49. JONAS, R.; FARAH, L.F. Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, v.59, n.1, p.101-106, 1998.
- 50. KARADENIZ, F. Main organic acid distribution of authentic citrus juices inTurkey, **Turkish Journal of Agriculture and Forestry.** v.28, p. 267–271, 2004.
- 51. KELEBEK, H.; SELLI, S.; CANBAS, A.; CABAROGLU, T. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. **Microchemical Journal**, v. 91, p. 187–192, 2009.
- 52.KIM, M. K.; PARK, S. R.; CHO, S. J.; LIM, W. J.; RYU, S. K.; AN, C. L.; HONG, S. Y.; PARK, Y. W.; KAHNG, G. G.; KIM, J. H.; KIM, H.; YUN, H. D. The effect of a disrupted yhjQ gene on cellular morphology and cell growth in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 1-2, p. 134-138, 2002.
- 53. KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.-P.; BOHN, A.; A. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International Edition**, v.44, n.22, p.3358-3393, 2001.
- 54.KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; KRAMER, F.; HESSLER, N.; HORNUNG, M.; SCHMAUDER, H.P. Nanocelluloses as innovative polymersin research and application. **Advances in Polymer Science**, v.205, p.49–96, 2006.
- 55. KORBES, V.C. **Plantas medicinais**. 53.ed. Francisco Beltrão: Associação de Estudos, Orientação e Assistência Rural, 1995. 188p.
- 56. KUROSUMI, A.; SASAKI, C.; YAMASHITA, Y.; NAKAMURA, Y. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. **Carbohydrate Polymers**, v.76, p.333–335, 2009.
- 57.LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 167–198, 2003.

- 58.LIMA, A.F.M.; PASSERI, L.A. Enxerto gengival: procedimento alternativo. **Revista Paulista de Odontologia**, v.13, n.4, p.25-27, 1991.
- 59. LOCILENTO, D. A. Preparo, obtenção e caracterização de esponjas de quitosana/colágeno para liberação controlada de extrato de semente de uva. 2012. 95 p. Dissertação (Mestrado em Interunidades Bioengenharias) - Programa de Pós-Graduação em Interunidades Bioengenharias, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo. 2012.
- 60.LOOZE, Y.; PAULE, B.; HUET, J.; VANDENBUSSCHE, G.; RAUSSENS, V.; WINTJENS, R. Purification and characterization of a wound-inducible thaumatin-like protein from the latex of Carica papaya. Phytochemistry, v. 70, p. 970–978, 2009.
- 61. MAHN, K.; HOFFMANN, C.; MARLANDER, B. Distribution of quality components in different morphological sections of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **European Journal of Agronomy**, v. 17, p. 29–39, 2002.
- 62. MATTHYSSE, A. G.; THOMAS, D. L.; WHITE, A. R. Mechanism of Cellulose Synthesis in *Agrobacterium-Tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 4, p. 1076-1081, 1995.
- 63. MAYALL, R.C.; MAYALL, A.C.; MAYALL, L.C.; ROCHA, H.C.; MRQUES, L.C.B. Tratamento das úlceras tróficas dos membros com um novo substituto da pele. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v.80, n.4, p.257-283, 1990.
- 64. MELLO, L.R.; FELTRIN, Y.; SELBACH, R.; MACEDO Jr., G.; SPAUTZ, C.; HAAS, L.J. Uso da celulose liofilizada em lesões de nervos periféricos com perda de substância. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.59, n.2B, p.372-379, 2001.
- 65.MELLO, L.R.; FELTRIN, L.T.; FONTES NETO, P.T.L.; ABREU, A.R. Duraplastia com celulose biossintética: estudo experimental. **Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia**, v.15, p.14-21, 1996.
- 66. MICHALAK, E. **Apontamentos fitoterápicos da Irmã Eva Michalak**. Florianópolis: Epagri, 1997. 94p.
- 67. MORESCHI, J.C. Processo para a obtenção de malhas de microfibrilas de celulose bacteriana para usos médicos e veterinários, e malhas de microfibrilas assim obtidas. BL Pat. Pl9204232-5, 27 out. 1992. 30p.
- 68. MOON, S.H.; PARK, J.M.; CHUN, H.Y.; KIM, S.J. Comparison of physicalproperties of bacterial celluloses produced in different culture conditions using Saccharified food wastes. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.11, p.26–31, 2006.
- 69. NAROTZKI, B.; REZNICK, A.Z.; AIZENBUD, D.; LEVY, Y. Green tea: a promising natural product in oral health. **Archives of Oral Biology**, v.57, n.5, p.429-435, 2012.

- 70. NEUKIRCH, H.; D'AMBROSIO, M.; SOSA, S.; ALTINIER, G.; DELLA LOGGIA, R.; GUERRIERO, A. Improved Anti-Inflammatory Activity of Three New Terpenoids Derived, by Systematic Chemical Modifications, from the Abundant Triterpenes of the Flowery Plant *Calendula officinalis*. Chemistry & Biodiversity, Vol. 2, issue 5, p. 657 671, May 2005.
- 71. NGUYEN, V.T.; GIDLEY, M.J.; DYKES, G.A. Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit Listeria monocytogenes on processed meats, **Food Microbiology**, v.25, p.471–478, 2008.
- 72.NOVAES JÚNIOR, A.B.; NOVAES, A.B.; GRISI, M.F.M.; SOARES, U.N.; GABARRA, F. Gengiflex, an alkalicellulose membrane for GTR: histologic observations. **Brazilian Dental Journal**, v.4, n.2, p.65-71, 1993.
- 73. O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm Formation as Microbial Development. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000.
- 74.O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 295-304, 1998.
- 75. PACHECO, J.L.C.; YEE, S.M.; ZENTELLA, M.C.; MARVÁN, E.E. Celulosa bacteriana en Gluconacetobacter xylinus: biosíntesis y aplicaciones. **Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, v.7, n.1, p.18-25, 2004.
- 76. PAOLINI, J.; BARBONI, T.; DESJOBERT, J.; DJABOU, N.; MUSELLI, A.; COSTA, J. Chemical composition, intraspecies variation and seasonal variation in essential oils of *Calendula arvensis* L. Biochemical Systematics and Ecology, v. 38, p. 865–874, 2010.
- 77. PARENTE, L.M.L.; COSTA, E.A.; MATOS, L.G.; PAULA, J.R., JÚNIOR, G.V., SILVEIRA, N. Estudos das atividades farmacológicas do extrato hidroalcoólico das flores de *Calêndula officinalis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA, 35, Aguás de Lindóia, 2003. Tipo de trabalho: **Resumos**. Aguás de Lindóia, 2003. Pag. 181
- 78. PAUL, R.; WEISER, S.; AMIOT, N. C.; CHAN, C.; SCHIRMER, T.; GIESE, B.; JENAL, U. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. **Genes e Development**, v. 18, n. 6, p. 715-727, 2004.
- 79. PEI, J. M.; GRISHIN, N. V. GGDEF domain is homologous to adenylyl cyclase. **Proteins-Structure Function and Genetics**, v. 42, n. 2, p. 210-216, 2001.
- 80. PENG, L.; KAWAGOE, Y.; HOGAN, P.; DELMER, D. Sitosterol-beta-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. **Science**, v. 295, n. 5552, p. 147-150, 2002.

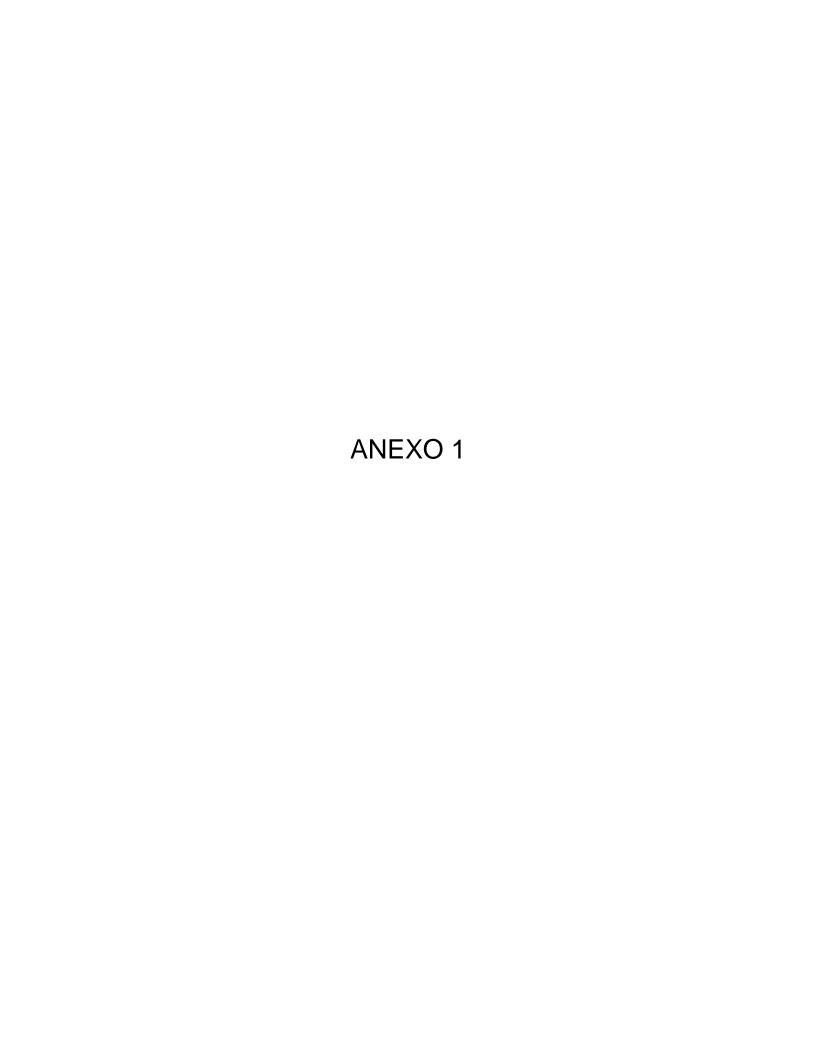
- 81.PITANGUY, I.; SALGADO, F.; MARACAJÁ, P.F. Utilização de película de celulose (Biofill) como curativo biológico. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v.78, n.5, p.317-326, 1988.
- 82. PRIM, M. B. da S. Análise do desperdício de partes vegetais não consumíveis. 2003. 112 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção)
 Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2003.
- 83. RAMOS, A.; PEDREIRA, A.; VIZOSO, A.; BETANCOURT, J.; LÓPEZ, A.; DÉCALO, M. Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.61, p.49-55, 1998.
- 84.RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906p.
- 85. REBELLO, C.; ALMEIDA, D.A.; LIMA Jr., E.M.; DORNELAS, M.P. Biofill, um novo substituto de pele: nossa experiência. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v.26, p.1561-1603, 2001.
- 86.RECOUVREUX, D.O.S.; CARMINATTI, C.A.; PITLOVANCIV, D.G.A.; MIQUELETO, A.P.; OLIVEIRA, I.L.; ANTONIO, R.V.; PORTO, L.M. Evidências da presença de celulose no Biofilme formado por *Chromobacterium violaceum*. Acesso em: 22 set. 2010. Disponível em: html://www.Intelab.ufsc.br:8080/port/public/sinaferm2005-Recowvreux %20et%20 al%2002.pdf.
- 87.REZZADORI, K.; BENEDETTI, S.; AMANTE, E.R. Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products. **Food and bioproducts processing**, v. 90, p. 606–614, 2012.
- 88.ROJAS, J.; PEREA, A.; SÁEZ, R.T.; ORTIZ-LÓPEZ, C. **Determination of flavonone compounds in citrus juices by high performance liquid chromatography.** Journal of Biotechnology, 131S, S130–S132, 2007.
- 89. RÖMLING, U. Molecular biology of cellulose production in bacteria. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 4, p. 205-212, 2002.
- 90. ROSS, P.; MAYER, R.; WEINHOUSE, H.; AMIKAM, D.; HUGGIRAT, Y.; BENZIMAN, M.; DEVROOM, E.; FIDDER, A.; DEPAUS, P.; SLIEDREGT, L. A. J. M.; VANDERMAREL, G. A.; VANBOOM, J. H. The Cyclic Diguanylic Acid Regulatory System of Cellulose Synthesis in *Acetobacter xylinum* Chemical Synthesis and Biological-Activity of Cyclic-Nucleotide Dimer, Trimer, and Phosphothioate Derivatives. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 31, p. 18933-18943, 1990.
- 91.ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 35-58, 1991.

- 92.RUKA, D.R.; SIMON, G.P.; DEAN, K.M. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v.89, n.2, p.613-622, 2012.
- 93. SAIBUATONG, O.; PHISALAPHONG, M. Novo Aloe Vera bacterial cellulose composite film from biosynthesis. **Carbohydrate Polymers**, v.79, n.2, p.455–460, 2010.
- 94. SALATA, L.A.; HATTON, P.V.; DEVLIN, A.J.; BROOK, I.M.; CRAIG, G. *In vitro* and *in vivo* evaluation of e-PTFE and alkali-cellulose membranes for guided bone regeneration. **Clinical Oral Implants Research**, v.12, n.1, p.62-68, 2001.
- 95. SANCHO, L. E. G-G.; YAHIA, E. M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (Carica papaya L., cv. Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI. **Food Research International**, v. 44, p.1284–1291, 2011.
- 96.SANDBERG, D.; DAHLIN, C.; LINDE, A. Bone regeneration by the osteopromotion technique using bioabsorbable membranes: an experimental study in rats. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.51, n.10, p.1106-1114, 1993.
- 97. SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Abastecimento e Agricultura. **Estimativa da Secretaria de Abastecimento e Agricultura do Estado de São Paulo (relatório de 1992)**. Disponível em: http://www.agricultura.sp.gov.br/ Acesso em: 15 jan. 2010.
- 98. SAXENA, I. M., BROWN, R. M.; FEVRE, M.; GEREMIA, R. A.; HENRISSAT, B. Multidomain architecture of β-glycosyl transferases: implications for mechanism of action. **Journal Bacteriology**, v. 77, p.1419–1424, 1995.
- 99. SAXENA, I. M.; BROWN, R. M., JR.; DANDEKAR, T. Structure-function characterization of cellulose synthase: relationship to other glycosyltransferases. **Phytochemistry**, v. 57, n. 7, p. 1135-1148, 2001.
- 100. SETYAWATI, M.I.; CHIEN, L.; LEE, C. Self-immobilized recombinant *Acetobacter xylinum* for biotransformation. **Biochemical Engineering Journal**, v.43, p.78–84, 2009.
- 101. SILVA, L.L. Obtenção de cultura pura da bactéria Acetobacter xylinum a partir de água de coco para produção de fibras de celulose. Ponta Grossa, 2003. Trabalho de Conclusão de Curso Campus Ponta Grossa Universidade Tecnológica Federal do Paraná
- SILVA Jr., A.A. Essentia herba: plantas bioativas. Florianópolis: Epagri, 2006.
 633p.
- 103. SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GROSMANN, G., orgs. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2004. p.473-474.

- 104. SIQUEIRA, J.J.P.; MORESCHI, J.C.M. Membranas de celulose porosas desidratadas para curativos em úlceras, escoriações e queimaduras. Revista da Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular, v.16, n.5, p.179-180, 2000.
- 105. SOBRINHO, A.G. Uma película celulósica no tratamento de queimaduras do I e II graus. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v.79, n.1, p.45-51, 1989.
- 106. SON, H.J.; HEO, M.S.; KIM, Y.G.; LEE, S.J. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated Acetobacter sp A9 in shaking cultures. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.33, pt.1, p.1–5, 2001.
- 107. SOUZA RJ; FONTANETTI A; FIORINI CVA; ALMEIDA K. 2003. Cultura da beterraba: Cultivo, convencional e cultivo orgânico. Lavras: UFLA. 37 p. (Texto acadêmico).
- 108. SOUZA, D.M.; GARCIA-CRUZ, C.H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Seminário de Ciências Agrárias**, v.25, n.4, p.331-340, 2004.
- 109. SPIERS, A. J.; BOHANNON, J.; GEHRIG, S. M.; RAINEY, P. B. Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 15-27, 2003.
- 110. SPINOSA, A.M. **Bactérias acéticas**: interesse industrial pelas bactérias acéticas. 2002. Acesso em: 21 ago. 2008. Disponível em: http://www.fai.com.br/cursos/biologicas/engen/download/agosto/industrial.ppt.
- 111. STASZEWSKI, M.; PILOSOF, A.M.R.; JAGUS, R.J. Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins. **Food Chemistry**, v.125, n.1, p.186-192, 2011.
- 112. SULEWSKI, M.E.; KRECHER, G.P.; GOTTSCH, J.D.; STARK, W.J. Use of disposable contact lens as a bandage contact lens. **Archives of Ophthalmology**, v.109, p.318-320, 1991.
- 113. SUNTHERLAND, I. W. The biofilm matrix an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 222-227, 2001.
- 114. SVENSSON, A.; NICKLASSON, E.; HARRAH, T.; PANILAITIS, B.; KAPLAN, D.L.; BRITTBERG, M.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomaterials**, v.26, p.419–431, 2005.
- 115. TIVELLI SW; TRANI PE. 2006. Hortaliças Beterraba (Beta vulgaris L.). IAC: Instituto Agronômico de Campinas. Disponível em: http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Beterraba/Beterraba.htm. Acessado em 20/04/2010

- 116. TABATA, Y. Recent progress in tissue engineering. **Drug Discovery Today**, v.6, n.1, p.483-487, 2001.
- 117. TODA, K.; ASAKURA, T.; FUKAYA, M.; ENTANI, E.; KAWAMURA, Y. Cellulose production by acetic acid-resistant *Acetobacter xylinum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.84, n.3, p.228-231, 1997.
- 118. TOMAZ, J.B.; CASTRO HERDY, C.D.C. Fundamentos de cirurgia vascular e angiologia. São Paulo: BYK, 1977. p.303.
- 119. UKIYA, M.; AKIHISA, K.T.; YASUKAWA, K.; TOKUDA, H.; SUZUKI, T.; KIMURA, Y. Anti-inflammatory, antitumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. **Journal of Natural Products**, v.69, p.1692-1696, 2006.
- 120. VAL, A. Desperdício de alimentos amplia o 'Custo Brasil'. **Ecodebate** Cidadania e Meio Ambiente, 2012
- 121. VANDAMME, E.J. BAETS, S.; VABAELEN, A.; JORIS, K.; DE WULF, P. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. **Polymer Degradation and Stability**, v.59, n.1/3, p.93-99, 1998.
- 122. VERSCHUREN, P.G.; CARDONA, T.D.; NOUT, M.J.R.; DE GOOIJER, K.D.; VAN DEN HEUVEL, J.C. Location and limitation of cellulose production by Acetobacter xylinum established from oxygen profiles. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.89, n.5, p.414–419, 2000.
- 123. VUCUROVIC, V. M.; RAZMOVSKI, R. N. Sugar beet pulp as support for Saccharomyces cerivisiae immobilization in bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 39, p. 128–134, 2012
- 124. YOSHIKAWA, M.; MURAKAMI, T.; KISHI, A.; KAGEURA, T.; MATSUDA, H. Medicinal flowers. III. Marigold: hypoglycemic, gastric emptying inhibitory, and gastroprotective principles and New Oleanane-Type triterpene oligoglycosides, calendasaponins A, B, C, and D, from Egyptian *Calendula officinalis*. **Chemical Pharmaceutical Bullettim** 49: 863-870, 2001.
- 125. YOSHINAGA, F.; TONOUCHI, K.; WATANABE, K. Advance on research of bacterial cellulose. **Kagaku to Seibutsu**, v.35, n.11, p.772-779, 1997.
- 126. ZHANG, J.; GREASHAM, R. Chemically defined media for commercial fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.51, p.407–421, 1999.
- 127. ZITTERL-EGLESSER K.; SOSSA, S.; JURENITSCH, J.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; DELLA-LOGGIA, R.; TUBARO, A.; BERTOLDI, M.; FRANZ, C. Anti-odematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v.57, p.139-144, 1997.

- 128. WATNICK, P. I.; KOLTER, R. Biofilm, City of Microbes. **Journal Bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2675-2679, 2000.
- 129. WULFF, N. A. Caracterização Enzimática das Celulases Xf–810, Xf–818 E Xf–2708 de *Xylella Fastidiosa* e Purificação da Proteína XF-818, expressa em *Escherichia coli.* 2002. Tese (Doutorado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, São Paulo.
- 130. XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. Boletim de Biotecnologia. Sociedade Portuguesa de Biotecnologia, v. 76, n., p. 2-13, 2003.
- 131. ZHANG, L.N.; XI, Q.; MO, Z.S. Current researching methods on polymer physics. **Wuhan College Press**, Hubei, pp 194–195, 2003
- 132. ZOGAJ, X.; NIMTZ, M.; ROHDE, M.; BOKRANZ, W.; RÖMLING, U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 1452-1463, 2001.





Asian Journal of Pharmaceutical and Health Sciences

www.ajphs.com



Bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum and Saccharomyces cerevisiae in green tea leaves and fruits juice medium.

DC Moretti Vieira*, BTG Senna, M Ishii, TC Vessoni Penna

Department of Pharmaceutical Technology, Pharmaceutical Science College, University of São Paulo, Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: 18.12.2012

Accepted: 18.01.2013

Available online: 10.05.2013

Keywords:

cellulose; fruits residues; *Camellia sinensis* (green tea); *Gluconacetobacter xylinus*

*Corresponding author:

Email: vieirade2003@yahoo.com.br

Tel: 55 11 99309 7005

ABSTRACT

The biomembrane (bacterial cellulose) was developed by Gluconacetobacter xylinus ATTC 23769, associated to Saccharomyces cerevisiae, for 7-10 days cultivation, from residual fruit-vegetable juices added to green tea broth, was studied and hydroalcoholic Calendula officinalis extract (1:1) was incorporated into biomembrane. Cultures were grown 1200 mL flasks with 80% v/v broth (Green Tea, Orange, Papaya, Wine, Collagen and Beet broths) and 20% v/v inoculum, incubated for 7-10 days at 28±2°C under static conditions, pH initial 3.5 4.0. The biomembrane thickness, diameter and weight were measured. The DSC, FTIR, BET analyses were performed Water and Marigold absorption capacity were and calculated. The highest bacterial cellulose yield (6.1±0.5 g cellulose/day) was obtained in green tea medium with 40% v/v papaya juice and also 10% v/v orange juice. Moreover, the addition of 1.2% w/v collagen to the green tea medium increased by 1.5 times the biomembrane weight. The developed biomembrane is composed by cellulose (confirmed by infrared spectroscopy (FTIR) at $\lambda_{max} = 1644$ cm⁻¹), with a total surface of 2.07 m²/g, an average porous size of 158 Å (BET), strength and elasticity between 0.09-0.5 MPa, (similar to Young's model for indentation) and thermal stability up to 137 °C (DSC). The biomembrane absorption capacity for water and hydroalcoholic Calendula officinalis extract (1:1), was six and five times higher than its dry weight, respectively. The Marigold extract was incorporated into the biomembrane due to its suitable topical properties, such as antioxidant, anti-inflammatory and wound healing.

INTRODUCTION

ellulose is the most abundant, renewable, biodegradable and sustainable biopolymer. It is a polysaccharide, consisting of linear β -1,4-D-glucose units [1], which can be obtained from plants or be synthesizing by different types of microorganisms such as algae (*Vallonia*), fungi (*Saprolegnia*) and bacteria (*Acetobacter, Agrobacterium, Rhizobium*).

Plant cellulose and bacterial cellulose (BC) have a similar chemical structure. However, bacteria cellulose (BC) is different from plant cellulose in some aspects, including finer structure (nanoscale microfibrils < 10 nm in width), higher purity (hemicellulose and lignin free), longer fiber length (polymerization degree between 2000 6000), higher crystallinity, better morphological control (it can be grown into many shapes

under static cultivation conditions in different fermentation vessels) [1], strong biological adaptability, nontoxic and non-allergenic [2-4].

The increasing demand for cellulose has resulted in extreme negative pressure on the delicate ecological balance of the plant world. One approach to reduce the demand for cellulose of plant origin is the production of cellulose using a microbial system [5].

The Gram-negative bacterium Acetobacter xylinum is the most studied and promising microorganism that produce BC. Two culture methods can be used to synthesize the extracellular cellulose by Acetobacter xylinum. One is the static culture, which is used to create a gelatinous membrane of cellulose on the interface between the air and the liquid medium. The other is the agitated culture, where the synthesized cellulose is distributed

throughout the culture medium as a fibrous structure [1]. The BC produced in these agitated systems exhibits a lower degree of polymerization (DP), crystallinity, and Young's modulus than that produced under static cultivation. The less-organized form of BC may result from shear stress during agitation [5].

Bacterial cellulose biosynthesized by *Acetobacter xylinum* was first discovered in the late nineteenth century and has been used in practical applications for several decades. In the 80s, a pure microfibrilar biosynthetic cellulose membrane was developed through a fermentative process and since then, the BC has been utilized as skin substitute for the recovery of burned and injured skin, to repair defects of the abdominal wall in aponeurotic muscles, bandages for periodontal surgery, artificial blood vessel, tourniquets, dura mater substitute, stent coating, food packaging, dietary fibers, culture substrate for mammalian cells, biofuel and others [6 - 9].

In Brazil, 13 million tons of food/year is wasted by Markets. These fruit wastes have abundant sugars, such as glucose and fructose that could be bio-converted into useful products with high aggregate value as BC by acetic acid bacterium such as *A. xylinum*. Although coconut water is known to produce bacterial cellulose [10], there is a lack of articles about BC by fruits-vegetable wastes.

Green tea (*Camellia sinensis*), also known as *bancha*, has been a leading beverage in the Far East for thousands of years. Green tea contains a high percentage of polyphenol (potent antioxidant and antimicrobial agents), catechins, methylxanthines, manganese, potassium, acid folic and vitamins (C, K, B1 and B2) and has the local ability to induce apoptosis in oral cancer cells [11 - 12].

Calendula officinalis (Asteraceae) is an Egyptian ornamental and medicinal plant. The Marigold tincture, gel, infusion, cream and ointment are widely used as an anti-inflammatory and healing agent for skin and mucous membranes [13-15]. The Marigold flower contains flavonoids, essential oils, sesquiterpene, triterpenes and saponins [16]. The main marigold components with anti- inflammatory activity are faradiol (aromatic rings A, D and E I), arnidiol and calenduladiol [17].

In this article the biomembrane weight (g cellulose), productivity (g cellulose/day) and conversion factor (g cellulose/g sugar) were evaluated in different culture medium (green-tea, fruit juices (orange, papaya), and vegetable (beet) and wine), as well as was studied the effect of collagen on the biomembrane production. Marigold hydroalcoholic extract was added into the BC due it healing, anti-inflammatory and analgesic propriety. The biomembranes produced in the different media were also characterized.

MATERIALS AND METHODS

Inoculum

The strains of *Acetobacter xylinum* (ATCC 23769) were obtained from Fundação André Tosselo located in Campinas, São Paulo.

Lyophilized cells of *A. xylinum* (ATCC 23769) (10 mg) and dry cells of *S. cerevisiae* (bakery source) (2.5 g) were dissolved in 250 mL of green tea (17.5 g green tea leaves in 250 mL distilled water) with 25 g sugar, and kept in static condition at $28 \pm 2^{\circ}$ C for 10 days; after this period, a pellicle was formed on the surface. After this time, 250 mL of supernatant and the pellicle were used as pre-inoculum for 600 mL of green tea medium (7% w/v green

tea leaves, 10% w/v sugar and distilled water qsp 1L). The media inoculated with the pre-inoculum was kept in static condition at 28 ± 2 °C for 10 days and used as the inoculum.

Medium

In this study, a very ripe $Citrus\ simensis\$ (orange), $Carica\ papaya$ (papaya) and $Beta\ vulgaris\ L$ (beet) were provided by a local market in São Paulo. The fruits and vegetables were washed, crushed and squeezed to prepare the juices.

The medium used to produce BC were: Green tea medium (GT) (7% w/v green tea leaves, 10% w/v sugar and distilled water qsp 1L); Orange medium (80% v/v GT and 20% v/v orange juice); Papaya medium (40% v/v GT , 50% v/v papaya juice and 10% v/v orange juice); Wine medium (33% v/v GT , 34% v/v wine and 33% v/v water); Collagen medium 0.5% (100% v/v GT, 0.5% w/v collagen); Collagen medium 1.0% (100% v/v GT, 1.0% w/v collagen); Collagen medium 1.2% (100% v/v GT, 1.2% w/v collagen); Beet medium 8% (92% v/v green tea (7% w/v green leaves, and distilled water qsp 1L) and 8% v/v beet juice) and Beet medium 17% (85% v/v green tea (7% w/v green leaves, and distilled water qsp 1L) and 17% v/v beet juice).

Culture Condition

Cultures were grown in 1200 mL flasks containing 600 mL of media (Green tea medium, Orange medium, Papaya medium, Wine medium, Collagen medium, Beet medium) and 150 mL of inoculum. Cultures were incubated for 10 days at $28 \pm 2^{\circ}$ C under static conditions, pH: 3.5 ± 0.5 . A pellicle (biomembrane) was formed at the air/surface interface.

Bacterial Cellulose Purification and Dryness

After the cultivation period, the harvested biomembrane was washed with distilled water to remove medium components, dried until constant weight by lyophilization or oven at 50°C and autoclaved by 30 minutes at 121°C. After this, the biomembrane was weighed in a semi-analytic scale and the diameter and thickness were measured using digital calipers [18-19]. Productivity (g cellulose/day) and conversation factor (g cellulose/g sugar) were then calculated.

Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy

FTIR spectroscopy was used primarily to identify the chemical structure of the membrane. The FTIR spectra of the membranes were measured at wave numbers ranging from 4000 to 400 cm⁻¹ with a Bomem MB100 FTIR spectrometer [20].

Mechanical Properties

The indentation tests were performed on a Stable Microsystem TA-XT2 texturometer. The device consists of a spherical probe 5 mm in diameter and a film holder. The samples were put in the holder between the two plates.

The probe was driven through the sample at a speed of $0.2 \,$ mm/s. The tests were done in triplicate of $3 \,$ cm². The equipment determined the load required for indentation (F1), the displacement of the probe from the point of contact to the point of indentation (D1) and the area under the curve related to energy to the indentation. Then, the indentation strength (F1/Acs, where Acs is the cross-sectional area of the film located in the cylindrical opening of the film holder) and the elongation to the indentation ([{(R2 + D1 2)1/2 - R}/R].100, where R is the radius of the film exposed in the cylindrical hole of the film holder) were calculated [21].

Scanning Electron Microscopy (SEM)

BC samples after cell removal were lyophilized and then coated with a thin Platinum film of around 5 nm. A SEM-FEI field emission scanning electron microscope (Leo Co., Oberkochen, Germany) was used, operating at 4 kV 10 kV and imaging magnification about 5,0 00 30,000 was used for examination of BC samples.

Brunauer-Emmett-Teller (BET) Surface Analysis

The pore size and surface area of the membranes were determined with a BET surface area analyzer. To remove moisture from the film samples, the samples were placed in sample cells, which were then heated up to 348 K (75°C) for 3 h and cooled down to room temperature before the BET analysis. The BET pore size and surface area were determined with N_2 adsorption at 77 K (-196°C) in a Micromeritics (Atlanta, GA) ASAP 2020. [20]

Water Absorption Capacity (WAC) and Marigold Absorption Capacity (MAC)

To determine the WAC and MAC, the dried biomembranes (surface area 1 cm², thickness 1.5 mm) were immersed respectively in distilled water and Marigold hydroalcoholic extract (diluted with alcohol 70%, 1:1), at room temperature until equilibration. After that, the biomembranes were removed from the water/Marigold hydroalcoholic extract; the excess on the surface of the biomembranes was blotted out with Kim wipes paper.

The weights of the swollen biomembranes were measured, and the procedure was repeated until no further weight change was observed. The WA/MAC was calculated according to the following formula:

WAC (%) or MAC (%) = (Mh - Md / Md).100

Where: Mh and Md represent the weight of the hydrated and dry membrane, respectively [20].

Marigold Transfer Capacity (MTC)

The MTC was performed to verify the deliverable capacity of the biomembrane. The lyophilized biomembrane was put in contact with the Marigold biomembrane (lyophilized green tea biomembrane rehydrated with 3 mL of Marigold hydroalcoholic extract) at room temperature until equilibration. The Marigold biomembrane weight was measured before and after the contact. The transference capacity was calculated using the following formula

MTC(%) = (W1a W1b/W1a).100

Where: W1a and W1b are the Marigold biomembrane weight before and after the transference, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Cellulose production (weight, productivity and thickness)

The culture was carried out in static condition around $28 \pm 2^{\circ}$ C by adding an aliquot of activated seed medium to the culture medium. The system becomes turbid and after 3-5 days, a pellicle (biomembrane) appears on the surface.

The mechanism of biomembrane formation was considered as follows. In the initial stage, the bacteria increase their population by taking dissolved oxygen and producing a certain amount of cellulose in the entire liquid phase, as observed by the appearance

of turbidity. When the dissolved oxygen is used up, only bacteria existing in the surface vicinity can maintain their activity to produce cellulose. The bacteria below the surface are not 'dead' but 'asleep', so they can be reactivated and used as the seed for new culture operation [1].

A general trend observed is that the thickness, as well as the yield of cellulose, increases sharply after a few days of induction period, until the rate starts to slow down after a week or ten days. It was considered as glucose the kind of saccharide that was digested by bacteria and converted to cellulose [2]. The pH value during the fermentation varied $\pm\,0.5$, because gluconic acid is not produced during cultivation [2].

As observed in Figure 1, the heaviest biomembrane is the one produced in the papaya medium (61.4 g), followed by the wine (35.0 g) and orange biomembrane (20.5 g). The weight of green tea and papaya biomembranes is respectively 3.6 and 61.8-fold greater than the weight of the biomembrane produced by Iguchi [2] in coconut medium. The biomembrane weight produced in the papaya medium was 12.5-fold greater than the bacterial cellulose produced by Cheng [5] in corn steep liquor with fructose with 0.5% CMC in agitated culture and 6 times greater than BC obtained by Ruka [2] in yamaka-manitol medium in static condition. The orange biomembrane weight was 17 greater than the BC produced by Kuroshimi in orange medium without a nitrogen [5].

The biomembrane produced in the green tea medium (0.6 mg/mL) and papaya medium (10.23 mg/mL) were respectively 1.5 and 25.6-fold greater than that obtained by Hu, 2010 [1], during cellulose sphere production by *Acetobacter xylinum* NCIMB(ATCC 23769) in agitated culture.

Under the studied conditions, the most productive medium was the papaya medium (6.14 g cellulose/day), followed by wine (3.50 g cellulose/day) and orange media (2.93 g cellulose/day). The BC productivity in the papaya medium was 2.1-fold and 12.80-fold greater than that in the orange and in green tea media, respectively. The BC productivity in the orange medium was 7.3-fold greater than that in green tea medium. Kurosumi [18] described that the orange medium is the most productive in comparison of other media studied by his group [pineapple, apple, Japanese pear and grape medium].

These results show that adding orange and papaya to the green tea medium increased the biomembrane productivity and weight. Also, the acetic acid present in the wine improved the biomembrane weight. The substitution of sugar by beet juice 17% (v/v) increased 3.0-fold the BC productivity and 4.3-fold the biomembrane weight, while adding 8% beet juice (v/v) increased 2.1- fold the BC productivity and 3.0-fold biomembrane weight in relation to green-tea medium, probably because the beet juice contains nutrients that enhance cellulose production. This fact will be further evaluated in a future study.

During the cultivation, a pellicle appeared on the surface and its thickness increased steadily with time, reaching over 7 mm in 10 days (papaya biomembrane). It is important to note that during the pellicle growth process, the aerobic bacteria generate cellulose only in the surface vicinity. As long as the system is kept unshaken, the pellicle is suspended by cohesion to the inner container wall and slides steadily downwards as it thickens. Iguchi [2] showed that the continuous growth of the pellicle layer tended to fail if a container with a tapered wall, such as a conical flask, was used. The pellicle thickness increases until all sugar is

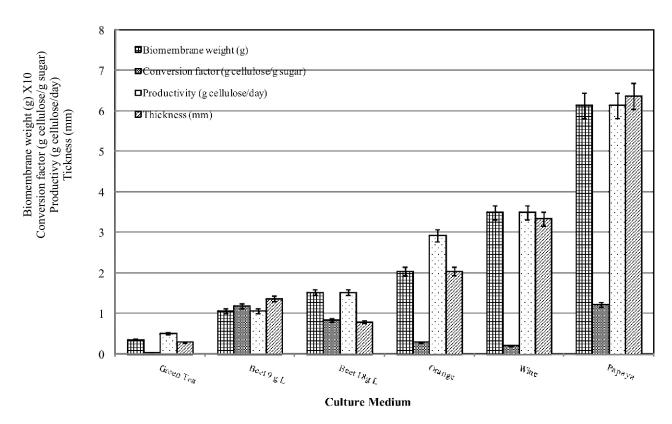


Figure 1: Biomembrane weight (g); productivity (g cellulose/day); conversion factor (g cellulose/ g sugar) and thickness (mm) in the green tea medium (green tea), orange medium (orange), wine (wine medium); papaya (papaya medium); beet 8% (beet medium with 8% v/v beet juice) and beet 15% (beet medium with 15% v/v beet juice), 10 days of cultivation, initial pH = 3.5.

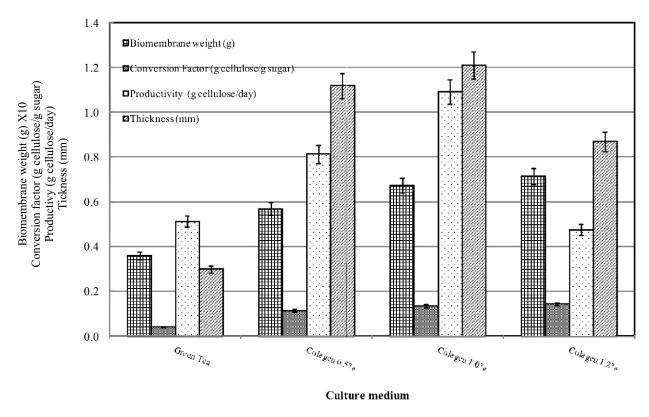


Figure 2: Biomembrane weight (g); productivity (g cellulose/day); conversion factor (g cellulose/g sugar) and thickness (mm) in the green tea medium (green tea), Collagen 0.5% (collagen medium 0.5%); Collagen 1.0% (collagen medium 1.0%); Collagen medium 1.2% (collagen medium 1.2%); 10 days of cultivation, initial pH = 3.5.

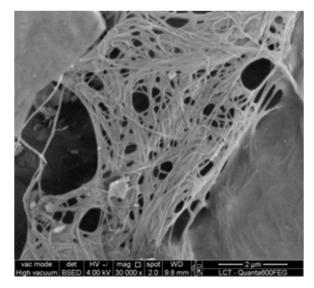


Figure 3a: Green tea biomembrane, 10-day cultivation.

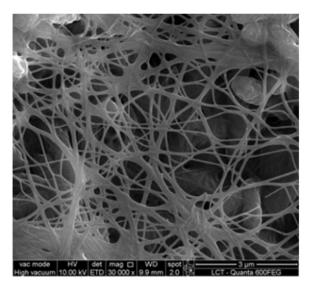


Figure 3c: Papaya biomembrane, 10-day cultivation

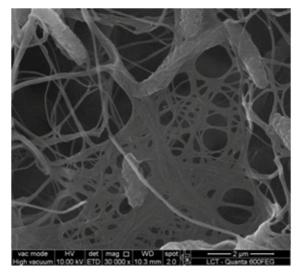


Figure 3e: Beet biomembrane, 10-day cultivation

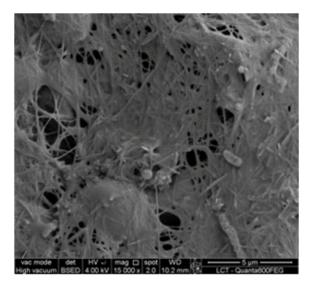


Figure 3b: Orange biomembrane, 10-day cultivation.

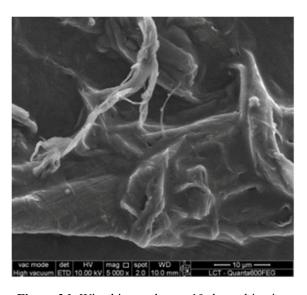


Figure 3d: Wine biomembrane, 10-day cultivation

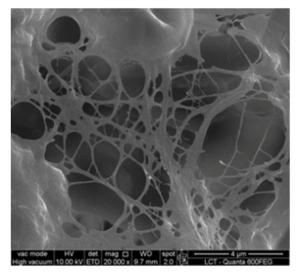


Figure 3f: Collagen biomembrane, 10-day cultivation

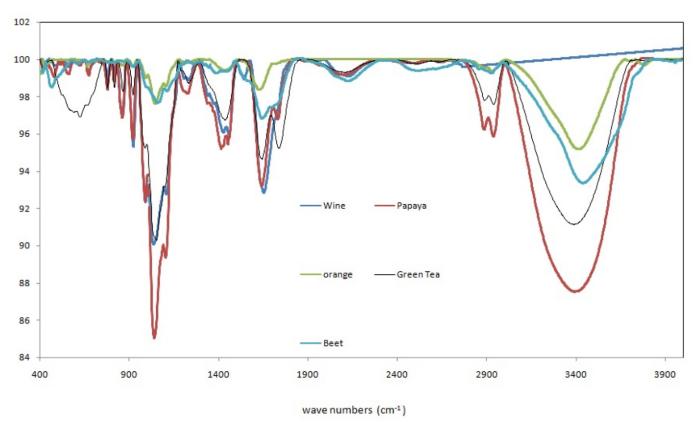


Figure 4: The FTIR spectra of biomembranes, after 7 days of cultivation and initial pH = 3.5, at wave numbers ranging from 400 to 4000 cm⁻¹ in green tea (green tea medium); orange medium (orange medium); papaya (papaya medium); wine (wine medium); Marigold (green tea biomembrane rehydrated with 3 mL of Marigold hydroalcoholic extract)

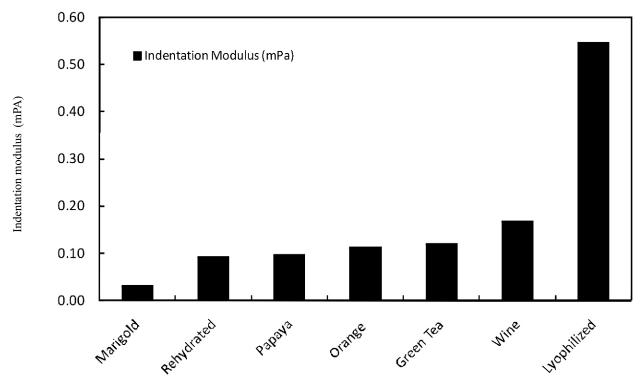


Figure 5: Indentation module of biomembrane, after 7 days of cultivation, initial pH = 3, in green tea medium (green tea); orange medium (orange medium); papaya medium (papaya); wine medium (wine), Marigold (GT biomembrane rehydrated with 3 mL Marigold hydroalcoholic extract), Rehydrated (GT biomembrane rehydrated with 3 ml water) and Lyophilized (lyophilized green tea biomembrane).

TABLE 1: WAC, MAC and MTC

Biomembrane	WAC	MAC
Beet	73	24
Papaya	197	68
Wine	227	11
Green tea	525	400
Orange	663	125
Capacity Transfer	27%	
Absorption	0.25 g of Marigold/g cellulose	

consumed by A. Xylinium.

The addition of papaya with orange juice (papaya: 50% v/v and orange: 10% v/v), wine (34% v/v) and orange juice (20% v/v) increased green tea biomembrane thickness 21.3, 11.1 and 6.3-fold, respectively and it is 3.13-fold thinner than the one produced by Iguchi [2] in coconut medium. The substitution of sugar by beet juice 8% v/v (9 g/L) and 17% v/v (18 g/L), increased the biomembrane thickness 2.8 and 2.7-fold, respectively (Figure 1). Probably these results are due to the fact that wine, orange, papaya and beet contain substances that reinforce the biomembrane structure, consequently improving thickness.

The adding of papaya with orange juice (papaya: 50% v/v and orange: 10% v/v), wine (34% v/v) and orange juice (20% v/v) increased the conversion factor 30.7, 5.25 and 7.43-fold, respectively. The substitution of sugar by beet juice 8% v/v (9 g/L) and 17% v/v (18 g/L), increased the conversion factor 29.72 and 21.25-fold, respectively (Figure 1). The ethylic alcohol and sugars present in the wine, the citric acid present in the orange juice, and sugars that compose the papaya and beet juices are easily converted into cellulose, consequently improving the conversion factor.

Collagen Effect

As other polymeric additives such as agar, acetan, xanthan and CMC, collagen exhibited its ability to hinder formation of large clumps of BC and enhanced BC production during fermentation.

The Figure 2 is observed that the collagen addition to the green tea medium has a tendency to increase the biomembrane weight, probably due to collagen incorporation into the biomembrane, producing a more robust biomembrane. This probably occurs because collagen has affinity with the biomembrane during the BC formation.

In this study, different collagen concentrations (0.5%, 1% and 1.2%) were added to the green tea medium, and their BC production (weight, productivity, conversion factor and thickness) were compared with the BC production in the green tea medium. BC production in the control case (green tea medium) was 6 g/L, 4.3-fold greater than that found by Cheng [5]. BC production with 0.5% w/v collagen (9.7 g/L) and 1.0% w/v collagen (11.3 g/L) were 1.6 and 1.8-fold larger than control, respectively and somewhat greater than that found by Cheng [5] with 0.5% (w/v) CMC (7.2 g/L), and approximately 2.1 - 2.5-fold greater than that found by them when microcrystalline cellulose

(0.5% - 4.37 g/L) and agar (0.2% - 4.49 g/L), were added, respectively.

Productivity in the medium containing 1.2% w/w collagen was very similar to the control medium (0.5 g cellulose /day) and the addition of 1.0% w/w collagen improved the productivity by 2.1 fold. The addition of 0.5% w/w, 1% w/w and 1.2% w/w of collagen in the green tea medium increased the thickness 3.7, 4.0 and 3-fold, respectively.

The conversion factor was also improved 2-fold and 1.6-fold when 0.5% w/ and 1.0% w/w collagen was added to green tea medium, respectively. The conversion factor in green tea medium with 1.2% w/w collagen was very similar to control (green tea medium).

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Biomembranes seem to be composed of piles of thin cellulose layers, regardless of the direction in which it is analyzed. In the BC, the density of interfibrillar hydrogen-bonds must be much higher, as the diameter of fibrils is much smaller [2] than pulp paper. The fiber structure and homogeneity of the biomembrane are showed in Figure 3. Similar structure was found by Saibuatong [20] for the production of BC with aloe vera.

The formation of BC pellicle may be impacted by the overall medium composition, carbon source, medium viscosity *A. xylinum* strain and factors related to the operational conditions (eg. pH, temperature, agitation or not of the medium, size and shape of the container, etc.) [1]. As shown in figure 3, the biomembrane produced in orange medium has smaller pores than the ones produced in green tea medium and are also more compacted. In the biomembranes produced using collagen, it can also be observed that the collagen molecules are involved/intertwined with cellulose fibers. All produced biomembranes have similar structures.

Brunauer-Emmett-Teller (BET) Surface Analysis and DSC Analyses

The total surface area and average pore size determined by BET for Green Tea biomembrane were $2.07~\text{m}^2/\text{g}$ and 158.2~Å (1 Å = 0.1~nm) in dry form. It means the network resulted in a mean porosity of 20 nm. The porous size was a little small than the value obtained for dry biomembrane and similar to the rehydrated membrane with 10% of aloe vera developed by Saibuatong [20], but the area is about 26 times smaller than the dried membrane developed by Saibuatong [20]. The BET result were in accordance with the observations from the SEM micrographs.

The DSC analyses showed that the glassing point is around -20°C, the crystallization points is around 10°C and there is no thermal degradation until 137°C. These results confirm that the biomembrane is composed by cellulose and can be sterilized by autoclaving.

FTIR Analysis

The cellulose absorption spectrum is the band at 1642.9 cm⁻¹, which has been assigned to carbonyl groups and the band of 1090 cm⁻¹ that has been assigned to the ligation between C-O groups.

FTIR spectroscopy of BC films developed in different media were carried out in order to detect the occurrence of new peaks or any peak shift that could be attributed to interactions between cellulose and medium components.

The FTIR spectra of all samples were detected at

wavenumbers ranging from 400 to 4000 cm⁻¹ as shown in Figure 4. In the region from 1800 to 1500 cm⁻¹, the intense absorption in the cellulose spectrum was the band at 1642.9 cm⁻¹, which has been assigned to the carbonyl groups [1]. The bands at 16501578 cm⁻¹ were assigned to C-O stretching, which overlaps with NH bending. The absorption band at 1565 1540 cm⁻¹ was NH deformation. All biomembranes have a similar spectrum (Figure 4) that shows that the biomembrane (1600-4000 cm⁻¹) is composed by cellulose and there is no interaction between the medium components and biomembrane. Similar data was found by Saibuatong [20] for the production of bacterial cellulose with aloe vera.

Mechanical Properties

Although bacterial cellulose is obtained in the form of a highly swollen gel, the texture is quite unique and different from typical hydro-gels. The original elasticity would never recover once the gel is crashed. This is due to the fact that the elements that constitute the gel are microfibrils, not the segments of chain molecules, such as in agar or gelatin gels, which can take a thermodynamically stable form [2]. Figure 5 shows that the elasticity of the rehydrated and marigold biomembranes (0.05 MPa) is higher than in the others. On the other hand, the lyophilized biomembrane showed to be more rigid (0.55 MPa) than the others. Therefore, the addition of Marigold to the lyophilized biomembrane improved its flexibility from 0.09 to 0.03 MPa, probably because of the interaction between the fibril network and marigold extract, resulting in improvement of biomembrane flexibility. The wine biomembrane increased the indentation module from 0.09 to 0.27 MPa. The orange supplement increased the indentation module from 0.09 to 0.11 MPa. The indentation module was similar to that obtained with the orange, green tea and papaya biomembranes. The most flexible membrane was the Marigold membrane. Similar data were found by Saibuatong [20] for the production of BC with aloevera.

Water Absorption Capacity (WAC), Marigold Absorption Capacity (MAC) and Marigold Transfer Capacity (MTC)

The effect of the medium components on the biomembrane WAC was analogous to the medium effect on the mechanical proprieties (Table 1). The papaya medium decreased the WAC of the biomembrane from 525 % to 197% (328%), which is approximately 2.7- fold lower than the green tea biomembrane. The degree of water swelling and WAC can be increased with the introduction of a hydrophilic component to the culture medium. The WAC of the wine biomembrane is 2.3-fold lower than the green tea biomembrane. The WAC value for the orange biomembrane (663%) is similar to that of the cellulose membrane with 30% of aloe vera (around 700%) [20]. The orange biomembrane has the highest WAC (663%), which is 1.3-fold greater than that of the green tea biomembrane.

The MAC of green tea biomembrane is 400%, which means that the biomembrane absorbs 1.3 times more water than marigold and this probably happens due to the hydrophilic proprieties of Marigold extract. The green tea biomembrane absorbed 0.25 g of Marigold/g cellulose. The Marigold transfer capacity to dry biomembrane is 27%. It means that the biomembrane can transfer marigold extract through concentration gradient. This is an indication that the biomembrane can transfer marigold and other hydrophilic extracts. Moreover, the values of MAC and MTC indicate that

the marigold biomembrane could have a therapeutic effect, as according to the Brazilian regulation, it is necessary to have a marigold concentration of 8.8 to 17.6 mg of flavonoids for topic use. Additionally, one can consider that these WAC and MAC values indicate that the different biomembrane may have different uses, such as the orange biomembrane can be applied to the region with more exudates and the green tea biomembrane use to absorb more hydrophilic compounds.

CONCLUSION

It is possible to produce cellulose by using fruit (papaya and orange) wastage and green tea. The best cellulose production was obtained with the papaya medium (6.14 g cellulose/day). The addition of 1.0% (w/v) collagen increased 2.1-fold the cellulose productivity. The green tea biomembrane has good water absorption capacity (6 times the dry weight) and Marigold absorption capacity (5 times the biomembrane dry weight) and the green tea biomembrane has the capacity to transfer Marigold extract to other dry biomembranes (27%). The incorporation of Marigold hydroalcoholic extract into the biomembrane improved its flexibility and added antioxidant, anti-inflammatory and wound healing topical effects to the green tea biomembrane. The developed biomembrane is suitable to be used in the treatment of skin burns.

ACKNOWLEDGMENT

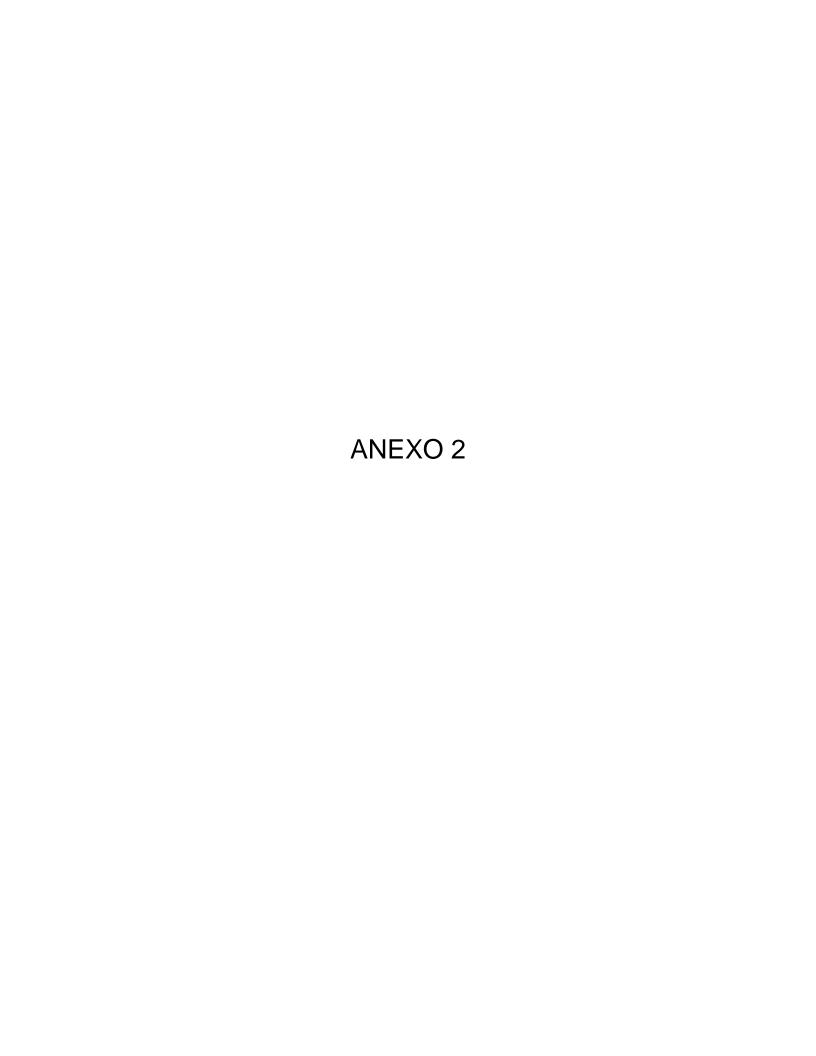
The authors would like to thank CAPES for financial support.

REFERENCES

- 1. Klemm A, Schumann D, Kramer F, Hessler N, Hornung M, Schmauder HP. Nanocelluloses as innovative polymersin research and application. *Adv. Polym. Science*. 2006: 205: 4996.
- 2. Iguchi M, Yamanaka S, Budhiono A. Bacterial cellulose a masterpiece of nature's arts. *J. Mat. Science*. 2000: 35: 261-270.
- 3. Moon SH, Park JM, Chun HY, Kim SJ. Comparison of physicalproperties of bacterial celluloses produced in different culture conditions using Saccharified food wastes. *Biot. Biop. Eng.* 2006:11:2631.
- 4. Backdahl H, Helenius G, Bodin A, Nannmark U, Johansson BR, Risbergb B. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomater*: 2006: 27:2141-2149.
- 5. Cheng KC, Catchmark JM, Demirci A. Effect of different additives on bacterial 430 cellulose production by Acetobacter xylinum and analysis of material property. *Cellul*. 2009: 16(6): 431: 1033-1045.
- 6. Iguchi M, Yamanaka S. Industrial use of bacterial cellulose A review. Proceedings of International Workshop Green Polymer, Bandung-Bogor. 1997: 4754.
- Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S. Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. *Progr. Polym. Science*. 2001:26:1561-1603.
- 8. Setyawati MI, Chien LJ, Lee CK. Expressing Vitreoscilla hemoglobin in statically cultured *Acetobacter xylinum* with reduced O(2) tension maximizes bacterial cellulose pellicle production. *J. Biotech.* 2007:123:38-43.
- 9. Okiyama A, Motoki M, Yamanaka S. Bacterial cellulose

- III. Development of a new form of cellulose. *F. Hydroc*. 1993:6:493-501.
- Adejoye OD, Adebayo-Toyo BC, Ogunjobi AA, Olaoye OA, Fadahunsi FI. Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of Pleurotusflorida, a Nigeria edible mushroom. *Afric. J. Biotech.* 2006:5:13551359
- 11. Narotzki B, Reznick AZ, Aizenbud D, Levy Y. Green tea: A promising natural product in oral health. *Arch. Or. Biol.* 2012. Available online 5 January 2012.
- 12. Staszewski M, Pilosof AMR, Jagus RJ. Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins. *F. Chem.* 2011:125(1):186-192.
- Brown D, Dattner A. Phytoterapeutic approaches to common dermatologic conditions. Archive Dermato. 1998:134:1401-1404.
- Zitterl-Eglseer K, Sosa S, Jurenitsch J, Schubert-Zsilavecz M, Della Loggia R, Tubaro A, Bertoldi M, Franz C. Antioedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis L.*). *J. Ethnopharm*. 1997:57:139144.
- 15. Blumenthal M, Busse WR. The complete german commission e monographs: therapeutic guide to herbal medicines. Boston: American botanical Council, 1998.

- 16. Bruneton. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants, Paris: Lavoisier Publishing, 1995
- 17. Akihisa T, Yasukawa K, Oinuma H, Kasahara Y, Yamanouchi S, Takido M, Kumaki K, Tamura, T. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochem*. 1996:43:1255-1260.
- Kurosumi A, Sasaki C, Yamashita Y, Nakamura Y. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. *Carboh.Polym.* 2009:76:333-335
- 19. Nguyen T, Gidley MJ, Dykes GA. Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. *F. Microbiol*. 2008:25:471478.
- 20. Saibuatong O, Phisalaphong M. Novo aloe vera bacterial cellulose composite film from biosynthesis. *Carboh. Polym.* 2010:79:455460.
- 21. Borgognoni FC, Maizato M.JS, Leirner AA, Polakiewicz I B, Beppu MM, Higa OZ, Pitombo RNM. Effect of freezedrying on the mechanical, physical and morphological properties of glutaraldehyde-treated bovine pericardium: evaluation of freeze-dried treated bovine pericardium properties. *J. Appl. Biomater. Biomech.* 2010:8(3):186-190.





UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica

Declaramos para os devidos fins que a o projeto intitulado "Produção de biofilme (membrana de biocelulose) por *Glunacetobacter xylinus* em meio de resíduos de frutas e folha de chá verde" não requer aprovação do comitê de ética em pesquisa.

Denise Cristina Moretti Vieira

Doutoranda

161 Jul 12012

Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna

Orientadora