



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MATHEUS DE OLIVEIRA BARROS

**PROPRIEDADES DE CELULOSE BACTERIANA: INFLUÊNCIA DO TEMPO DE
FERMENTAÇÃO EM DIFERENTES CEPAS DE *Komagataeibacter***

FORTALEZA

2021

MATHEUS DE OLIVEIRA BARROS

PROPRIEDADES DE CELULOSE BACTERIANA: INFLUÊNCIA DO TEMPO DE
FERMENTAÇÃO EM DIFERENTES CEPAS DE *Komagataeibacter*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: química.

Orientadora: Dra. Morsyleide de Freitas Rosa.

Coorientadora: Dra. Ana Iraídy Santa Brígida.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B279p Barros, Matheus de Oliveira.

Propriedades de celulose bacteriana: influência do tempo de fermentação em diferentes cepas de *Komagataeibacter* / Matheus de Oliveira Barros. – 2021.

71 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Morsyleide de Freitas Rosa.

Coorientação: Profa. Dra. Ana Iraidy Santa Brígida.

1. Biopolímero. 2. Fermentação estática. 3. Grau de polimerização. 4. Quimiometria. I.
Título.

CDD 540

MATHEUS DE OLIVEIRA BARROS

PROPRIEDADES DE CELULOSE BACTERIANA: INFLUÊNCIA DO TEMPO DE
FERMENTAÇÃO EM DIFERENTES CEPAS DE *Komagataeibacter*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química.

Aprovado em: 29/01/2021.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Morsyleide de Feitas Rosa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Elenilson de Godoy Alves Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que sempre estão ao meu lado, me apoiando e me fortalecendo sempre que necessário.

Agradeço também à toda minha família que sempre torceu por mim.

À Dr. Morsyleide de Freitas Rosa e a Dr. Ana Iraídy Santa Brígida, pela paciência, orientação e conhecimentos compartilhados.

Ao Adriano Mattos e ao Prof. Men de Sá que sempre estiveram dispostos a ajudar da forma que podiam a solucionar qualquer tipo de problema.

A todos do Laboratório de Tecnologia da Biomassa, que sempre estiveram presentes e solícitos, deixando o dia a dia sempre mais leve e descontraído e tornando o ambiente de trabalho um local muito agradável. Em especial à Jessica Silva que esteve junto em toda essa caminhada do mestrado, nas comemorações e nos problemas também.

À Embrapa Agroindústria Tropical que tem me acolhido desde 2014.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito Obrigado!

RESUMO

A celulose bacteriana (CB) é um biopolímero sintetizado por diversas espécies de bactérias, que apresenta propriedades superiores à celulose vegetal, como elevada cristalinidade, porosidade, resistência térmica e mecânica. Devidos às suas características, a CB possui diversas aplicações, como curativos, construção de vasos sanguíneos artificiais, etc... que demandam propriedades específicas, que podem ser obtidas através de funcionalizações ou a partir da manipulação do processo fermentativo. O presente trabalho teve como objetivo determinar o efeito do tempo de fermentação e da cepa de microrganismos nas propriedades da CB. O cultivo foi estático com as cepas *K. xylinus* ATCC 53582 e *K. hansenii* ATCC 23769, meio de cultura sintético HS e 4, 6, 8 e 10 dias de fermentação. As CBs obtidas foram purificadas e caracterizadas por espectroscopia de infravermelho (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), difração de raios-x (DRX), ensaios de tensão, absorção de água, termoporometria (TP-DSC), microscopia eletrônica (MEV), grau de polimerização (GP), produtividade e produção foram medidas para cada fermentação. Os resultados de FTIR, porosidade, resistência mecânica e absorção de água foram submetidos a uma análise estatística multivariada. O tempo de fermentação teve influência direta nas propriedades das CBs produzidas, independente da bactéria utilizada. Com exceção da composição química e da estabilidade térmica, a cepa de microrganismos também influenciou as propriedades das CBs obtidas.

Palavras-chave: Biopolímero. Fermentação estática. Grau de polimerização. Quimiometria.

ABSTRACT

Bacterial cellulose (BC) is a biopolymer synthesized by several bacteria, which has properties superior to plant cellulose, such as high crystallinity, porosity, thermal and mechanical resistance. Due to its characteristics, BC has several applications, such as dressings, construction of artificial blood vessels, etc ... that demand specific properties, which can be obtained through functionalization or through the manipulation of the fermentation process. This study aimed to determine the effect of fermentation time and the strain of microorganisms on the properties of BC. The cultivation was static with the strains *K. xylinus* ATCC 53582 and *K. hansenii* ATCC 23769, synthetic culture medium HS and 4, 6, 8 and 10 days of fermentation. The obtained BCs were purified and characterized by infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA), x-ray diffraction (XRD), stress tests, water absorption capacity, thermoporometry (TP-DSC), electron microscopy (SEM), degree of polymerization (DP), productivity and production were measured for each fermentation. The results of FTIR, porosity, mechanical resistance and water absorption were submitted to a multivariate statistical analysis. The fermentation time had a direct influence on the properties of the CBs produced, regardless of the bacteria used. Except for chemical composition and thermal stability, the strain of microorganisms also influenced the properties of the obtained CBs.

Keywords: Biopolymer. Static fermentation. Degree of polymerization. Chemometric analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Interações inter (a) e intramoleculares (b) da celulose	17
Figura 2	– Estrutura da fibra de celulose	18
Figura 3	– Polimorfismo da celulose	19
Figura 4	– Estruturas cristalinas da celulose tipo I, (a) triclínica e (b) monoclínica	19
Figura 5	– Microscopia eletrônica de transmissão da bactéria <i>K. hansenii</i> excretando microfibras de celulose	21
Figura 6	– Rota simplificada de biossíntese da celulose bacteriana	22
Figura 7	– Nata de Coco – sobremesa feita com celulose bacteriana	24
Figura 8	– Produção (g.L-1) de películas de celulose bacteriana por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (HSKx) e <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d). Letras iguais (a, b, c, d, e, f) não apresentam diferenças estatisticamente significativas $\alpha= (0,05)$	35
Figura 9	– Produtividade (g.L-1.dia-1) de películas de celulose bacteriana por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (HSKx) e <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d). Letras iguais (a, b, c, d, e, f) não apresentam diferenças estatisticamente significativas $\alpha= (0,05)$	36
Figura 10	– Diferença visual de películas de celulose bacteriana produzidas por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (HSKx) e <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d)	37
Figura 11	– Espectros de FTIR para de películas de celulose bacteriana produzidas por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (HSKx) e <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d)	38
Figura 12	– Termogramas (a) e derivadas (b) para de películas de celulose bacteriana produzidas por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582	

	(HSKx) e <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d), em atmosfera inerte (N ₂)	40
Figura 13	– Difractogramas para de películas de celulose bacteriana produzidas por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (HSKx) e <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d)	42
Figura 14	– Distribuição de poros para as amostras de HSKx e HSKh. Valores de FBW são cumulativos	48
Figura 15	– Distribuição relativa de poros em função do tamanho de todas as amostras de HSKx (a) e HSKh (b)	48
Figura 16	– Grau de polimerização vs. tempo de fermentação para de películas de celulose bacteriana produzidas por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (HSKx) e <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d)	50
Figura 17	– Micrografias da rede nanofibrilada das membranas de CB obtidas nos meios com o microrganismo <i>K. xylinus</i> ATCC 53582 com 4, 6, 8 e 10 dias de fermentação (aumento de 10000x)	53
Figura 18	– Micrografias da rede nanofibrilada das membranas de CB obtidas nos meios com o microrganismo <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 com 4, 6, 8 e 10 dias de fermentação (aumento de 10000x)	54
Figura 19	– Sistema de coordenadas de PCA para a avaliação da capacidade de absorção de água nos tempos de 0 a 180 min, para as CBs produzidas com <i>K. hansenii</i> e <i>K. xylinus</i> em 4, 6, 8 e 10 dias de fermentação: (a) CBs de ambas as bactérias, (b) apenas CB produzida com <i>K. hansenii</i> (HSKh) e (c) apenas CB produzida com <i>K. xylinus</i> . ^a eixos referentes aos scores; ^b eixos referentes aos <i>loadings</i> com as variáveis representadas por estrelas pretas	56
Figura 20	– Sistema de coordenadas de PCA para a avaliação dos ensaios mecânicos relacionados com módulo de Young (YM), tensão máxima (TS), tensão na ruptura (BS) e alongação na ruptura (EB) para as CBs produzidas com <i>K. hansenii</i> e <i>K. xylinus</i> em 4, 6, 8 e	

10 dias de fermentação: (a) CBs de ambas as bactérias, (b) apenas CB produzida com *K. hansenii* (HSKh) e (c) apenas CB produzida com *K. xylinus*. ^aeixos referentes aos scores; ^beixos referentes aos *loadings* com as variáveis representadas por estrelas pretas 57

Figura 21 – Sistema de coordenadas de PCA para a avaliação da porosidade nos intervalos 2 – 50 nm, 50 – 100 nm, 100 – 150 nm e 150 – 200 nm para as CBs produzidas com *K. hansenii* e *K. xylinus* em 4, 6, 8 e 10 dias de fermentação: (a) CBs de ambas as bactérias, (b) apenas CB produzida com *K. hansenii* (HSKh) e (c) apenas CB produzida com *K. xylinus*. ^aeixos referentes aos scores; ^beixos referentes aos *loadings* com as variáveis representadas por estrelas pretas 59

Figura 22 – Resultados da PCA dos dados de FTIR das amostras de CB produzidas com *K. hansenii* (em vermelho) e *K. xylinus* (em azul). O gráfico de scores (a) está apresentados em duas dimensões (PC1 x PC2) e os *loadings* estão apresentados na forma de linhas para os eixos PC1 (b) e PC2 (c) 60

Figura 23 – Gráfico de scores (PC1 x PC2) dos dados de FTIR das amostras de *K. hansenii* (a) com os *loadings* relevantes plotados em forma de linha (b). Gráfico de scores PC1 x PC2 para as amostras de *K. xylinus* (c) com os *loadings* relevantes plotados em forma de linha (d) 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do meio sintético HS	27
Tabela 2 – Umidade (%) de películas de celulose bacteriana produzidas por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (HSKx) e <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d)	36
Tabela 3 – Temperatura inicial de degradação (Tonset), temperatura máxima de degradação (Tmax) e perda de massa por degradação para películas de celulose bacteriana produzidas por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (HSKx) e <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d)	41
Tabela 4 – Índice de cristalinidade e tamanho do cristalito para de películas de celulose bacteriana produzidas por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (HSKx) e <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d)	43
Tabela 5 – Tensão máxima, tensão na ruptura, alongação na ruptura e módulo de Young para de películas de celulose bacteriana produzidas por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (HSKx) e <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d)	44
Tabela 6 – Capacidade de absorção de água para de películas de celulose bacteriana produzidas por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (HSKx) e <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d)	46
Tabela 7 – Grau de polimerização para de películas de celulose bacteriana produzidas por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (HSKx) e <i>K. hansenii</i> ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d)	50
Tabela 8 – Dimensões das fibras para de películas de celulose bacteriana produzidas por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (HSKx) e <i>K.</i>	

<i>hansenii</i> ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d)	52
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivos Gerais	16
2.1	Objetivos Específicos	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	Celulose: Visão Geral	17
3.2	Celulose Bacteriana (CB)	20
3.2.1	<i>Microrganismos</i>	20
3.2.2	<i>Síntese</i>	21
3.2.3	<i>Propriedades e Aplicações da Celulose Bacteriana</i>	22
3.2.4	<i>Variáveis do processo fermentativo</i>	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Processo fermentativo	27
4.1.1	<i>Meio de cultura e microrganismos</i>	27
4.1.2	<i>Preparação do inóculo</i>	27
4.1.3	<i>Produção da celulose bacteriana</i>	27
4.1.4	<i>Purificação e neutralização da celulose bacteriana</i>	28
4.2	Caracterizações da celulose bacteriana	28
4.2.1	<i>Umidade, produção e produtividade</i>	28
4.2.2	<i>Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier</i>	29
4.2.3	<i>Análises termogravimétricas (TGA)</i>	29
4.2.4	<i>Difração de Raios-X (DRX)</i>	29
4.2.5	<i>Ensaio mecânicos</i>	30
4.2.6	<i>Capacidade de absorção de água (CAA)</i>	31
4.2.7	<i>Termoporometria por calorimetria exploratória diferencial (TP-DSC)</i>	31
4.2.8	<i>Grau de polimerização (GP)</i>	32

4.2.9	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	33
4.3	Avaliações Estatísticas.....	34
4.3.1	<i>Análise de Variância (ANOVA)</i>	34
4.3.2	<i>Análise estatística multivariada (Quimiometria)</i>	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
5.1	Umidade, produção e produtividade.....	35
5.2	Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier	38
5.3	Análises Termogravimétricas (TGA).....	39
5.4	Difração de raios-X (DRX).....	42
5.5	Ensaio mecânicos.....	44
5.6	Capacidade de absorção de água (CAA)	46
5.7	Termoporometria por DSC (TP-DSC).....	47
5.8	Grau de polimerização (GP)	49
5.9	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	52
5.10	Análise estatística multivariada (Quimiometria).....	54
5.10.1	<i>Capacidade de Absorção de Água</i>	55
5.10.2	<i>Ensaio Mecânicos</i>	57
5.10.3	<i>Termoporometria</i>	58
5.10.4	<i>Espectroscopia de infravermelho</i>	60
6	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

O crescente impacto causado por plásticos e outros materiais de origem fóssil vem atraindo, cada vez mais, o interesse de estudiosos por alternativas menos poluentes com grande potencial para aplicação em larga escala. Nesse sentido, os polímeros biodegradáveis, obtidos a partir de fontes renováveis, se destacam, por suas propriedades únicas, apresentando características desejáveis para diversas aplicações, como é o caso da celulose bacteriana (CB) (ANDRIANI; APRIYANA; KARINA, 2020).

A celulose é um homopolissacarídeo composto por monômeros de celobiose (duas moléculas de β -D-glicopiranosose unidas por ligação β 1 \rightarrow 4) e é o polímero de origem natural mais utilizado por indústrias na atualidade sendo sua produção, em maior parte, de origem vegetal (LAMPUGNANI *et al.*, 2019). Entretanto, a celulose também pode ser produzida por bactérias, com destaque para o gênero *Komagataeibacter*, através da fermentação de meios ricos em carbono e nitrogênio, sendo denominada celulose bacteriana que, diferente da celulose vegetal, não possui outras macromoléculas, como lignina e hemicelulose, ligadas às suas fibras. Isso torna o processo de obtenção da celulose bacteriana mais simples e menos agressivo ao meio ambiente, quando comparado ao processo de obtenção da celulose vegetal (VASCONCELOS *et al.*, 2017).

Apesar de quimicamente semelhante à celulose vegetal, a celulose bacteriana, devido sua conformação tridimensional, garantida pelas interações intermoleculares das fibras, apresenta diversas características superiores à celulose vegetal, como elevada cristalinidade, alta capacidade de absorção de água, ótima resistência mecânica, elevado grau de polimerização, biocompatibilidade, entre outras (GAO *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019). Essas características garantem a esse material aplicações em biocurativos, membranas acústicas e como matéria prima em indústrias, onde a celulose vegetal dificilmente pode ser utilizada, como filme de carbono condutor, produtos para substituição de pele e tecidos danificados, membranas de ultrafiltração e comidas de baixo teor calórico (AZEREDO, 2018; NASCIMENTO, *et al.*, 2019; SHI *et al.*, 2013).

Atualmente, a comunidade científica adota algumas maneiras para a modificação dessas propriedades da celulose bacteriana, podendo serem feitas ainda no processo fermentativo, manipulando parâmetros como meio de cultivo, tipo

de cepa, adicionando aditivos, ou podem ser feitas pós-fermentação através de funcionalizações (CHOI; SHIN, 2020; SHCHANKIN *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2018). A modificação dessas propriedades pode definir a aplicabilidade da CB, uma vez que aplicações diferentes requerem propriedades específicas, como por exemplo para um biocurativos é interessante que a CB possua elevada porosidade, para uma embalagem a resistência mecânica é uma das principais propriedades de foco, etc...(CHEN *et al.*, 2018).

As mudanças feitas durante o processo fermentativo têm, normalmente, como foco principal o aumento da produção de celulose bacteriana ou a redução do custo da produção. O tempo de fermentação utilizado na produção de celulose bacteriana pode afetar diretamente as propriedades do material obtido, esse parâmetro sofre variações de estudo para estudo, mas são raros os trabalhos que avaliam a influência desse tempo em alguma propriedade da celulose bacteriana. Shi e colaboradores (2013), foram uns dos poucos que o fizeram, avaliando a influência do tempo de fermentação no grau de polimerização da celulose bacteriana.

Uma vez que o estudo as propriedades finais da celulose bacteriana são de extrema importância para o direcionamento da aplicação desse material e visando estudar de maneira aprofundada o efeito do tempo de fermentação e da cepa de microrganismos em diversas propriedades da celulose bacteriana, como estabilidade térmica, resistência mecânica, cristalinidade e capacidade de absorção de água, esse trabalho tem como objetivo investigar como essas e outras propriedades da celulose bacteriana podem ser afetadas por estes dois fatores, ainda no processo fermentativo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Determinar os efeitos de duas cepas de microrganismos e dos tempos de fermentação nas propriedades finais (químicas, físicas e morfológicas) das películas de celulose bacteriana produzidas em cultivo estático.

2.1 Objetivos Específicos

Sintetizar celulose bacteriana a partir da cepa *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582, avaliando a produção nos tempos de 4, 6, 8 e 10 dias de fermentação.

Sintetizar celulose bacteriana a partir da cepa *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769, avaliando a produção nos tempos de 4, 6, 8 e 10 dias de fermentação.

Caracterizar química, física e morfológicamente as películas de celulose bacteriana obtidas com diferentes tempos de fermentação e cepas de microrganismos.

Avaliar o efeito do tempo nas propriedades de absorção de água, porosidade, resistência mecânica e composição (espectroscopia) aplicando análise estatística multivariada.

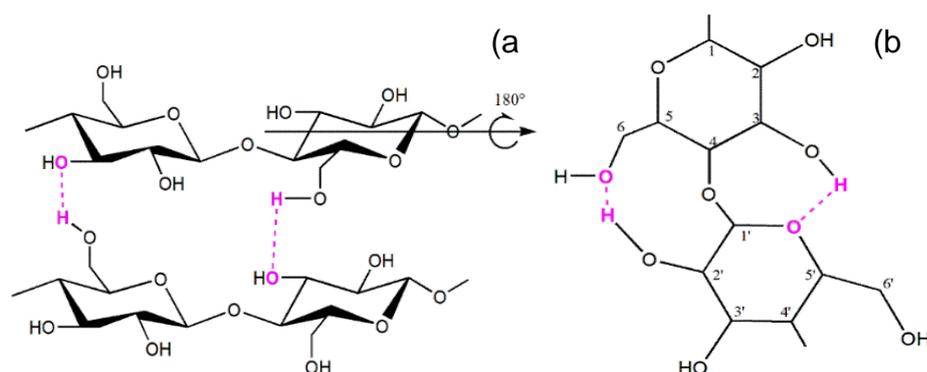
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Celulose: Visão Geral

A celulose, além de renovável e biodegradável, é o polímero natural mais abundante no mundo, por ser o principal componente da parede celular das plantas. Estima-se que 10^{12} toneladas desse polímero sejam obtidos por ano para aplicações industriais, com cerca de 60% desse material é destinado às indústrias de papel, têxteis e químicas (GUPTA *et al.*, 2019; KHANDELWAL; WINDLE, 2013; SIMON *et al.*, 1998). O Brasil, até o ano de 2015, foi considerado o importador com o menor preço para a tonelada de celulose, devido à grande aplicação de biotecnologia na agricultura e aos solos férteis que facilitam a produção deste polímero. (MOURA *et al.*, 2018).

A celulose é um homopolissacarídeo composto por monômeros de celobiose (duas moléculas de β -D-glicopiranosose unidas em ligações β 1 \rightarrow 4), onde a segunda molécula apresenta uma rotação de 180° no eixo molecular em relação a primeira (Figura 1) (ALTANER *et al.*, 2014).

Figura 1 – Interações inter (a) e intramoleculares (b) da celulose



Fonte: Nascimento, 2019 adaptado.

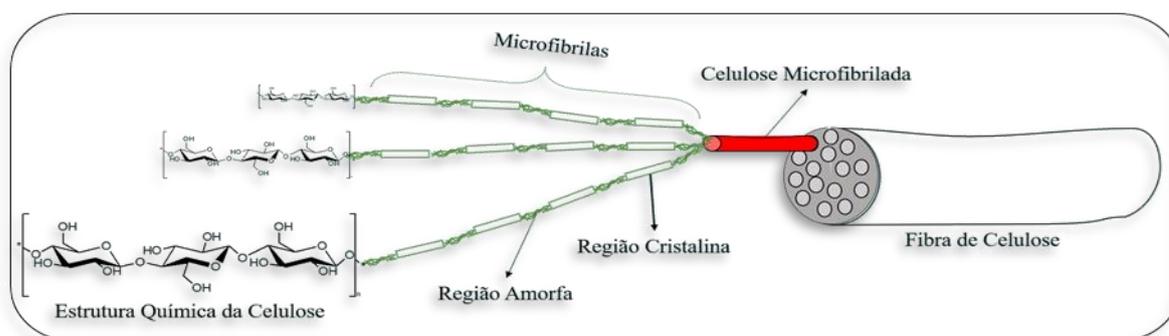
Os grupos hidroxila presentes na celulose tem uma forte tendência a formar interações intra e intermoleculares, do tipo ligação de hidrogênio, que influenciam na solubilidade e nas propriedades mecânicas deste material. A separação das cadeias celulósicas minimiza a força (influência) das ligações de hidrogênio e isso favorece a dissolução da molécula em água, como exemplo a adição de cargas em cadeias de

celulose aumenta a solubilidade devido ao intumescimento das microfibras (LANGAN *et al.*, 2014).

O efeito alavanca na interação 3O-H...5' garante à celulose um elevado módulo de Young axial. Durante a aplicação da tensão na celulose (elongação) o alinhamento da cadeia que possui um formato de zig-zag ocorre ao redor da ligação glicosídica C-O-C e ocorre a quebra da interação 3O-H...5', enquanto a distância da interação 6O-H...2' não sofre alteração. Portanto, uma pequena deformação na ligação glicosídica C-O-C previne a compressão da interação 6O-H...2' e aumenta a influência da interação 3O-H...5' na rigidez da celulose (ALTANER *et al.*, 2014; LANGAN *et al.*, 2014).

Ao se agruparem as moléculas de celulose tendem a formar microfibrilas, devido às interações intermoleculares, que por sua vez se unem formando fibras (Figura 2). Essas microfibrilas possuem regiões altamente organizadas, denominadas cristalinas, e regiões com baixa organização, conhecidas como amorfas (WANG *et al.*, 2019).

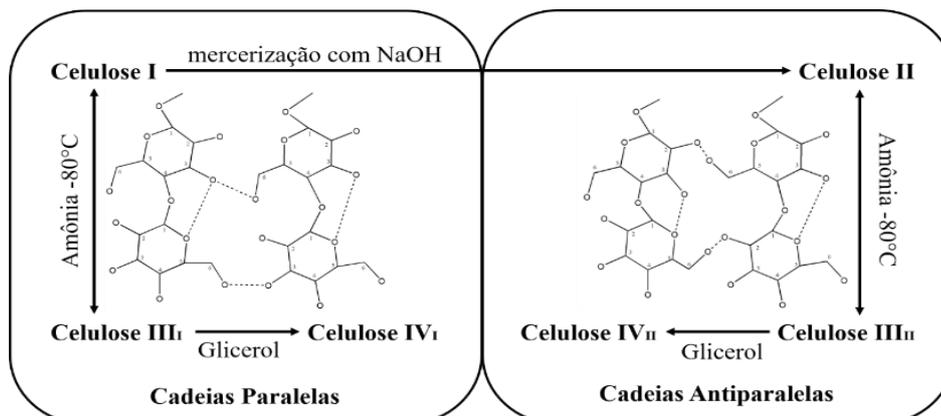
Figura 2 – Estrutura da fibra de celulose.



Fonte: Lavoine *et al.*, 2012 adaptado.

A celulose é um material polimorfo, ou seja, pode ser encontrada em diversas formas (I, II, III e IV) como pode ser observado na Figura 3.

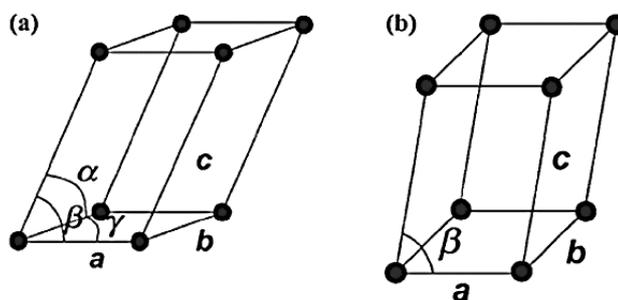
Figura 3 – Polimorfismo da celulose



Fonte: Lavoine et al., 2012 adaptado.

A celulose tipo I pode ser encontrada naturalmente e classificada de duas maneiras celulose: tipo I α , (sistema cristalográfico triclinico que exhibe cristais de simetria mais pobre, com três eixos cristalográficos, todos diferentes entre si, o mesmo acontecendo com os ângulos entre eles) e tipo I β (sistema cristalográfico monoclinico com três eixos cristalográficos de comprimentos diferentes, onde os ângulos α e γ têm 90° e o ângulo β , um valor diferente de 90°) (Figura 4). A celulose tipo II pode ser obtida por duas rotas: recristalização ou mercerização partindo da celulose tipo I. A principal diferença estrutural entre a celulose tipo I e tipo II é que a tipo I possui um arranjo paralelo e a tipo II possui um arranjo antiparalelo, esses arranjos serão mantidos nos outros tipos de celulose provenientes destes dois. (CHAWLA *et al.*, 2009; KLEMM, D. *et al.*, 2005).

Figura 4 – Estruturas cristalinas da celulose tipo I, (a) triclinica e (b) monoclinica.



Fonte: Silva e D'Almeida, 2009.

As celulosas tipo III_I e III_{II} podem ser obtidas através do tratamento com amônia da celulose tipo I e tipo II, respectivamente. As celulosas tipo IV_I e IV_{II} são

obtidas através do aquecimento com glicerol das celuloses tipo III_i e III_{ii}, respectivamente (LAVOINE *et al.*, 2012; SIQUEIRA; BRAS; DUFRESNE, 2010).

3.2 Celulose Bacteriana (CB)

CB é um homopolissacarídeo de cadeia linear, quimicamente semelhante à celulose vegetal. Inicialmente descrita por Brown (1886), que, ao observar uma dorna de fermentação de vinagre, percebeu a formação de uma película gelatinosa na superfície, que foi identificada posteriormente como celulose e a bactéria produtora, como *Acetobacter xylinum* (BROWN, 1886)

3.2.1 Microrganismos

A CB pode ser sintetizada por vários gêneros de bactérias, como: *Komagataeibacter* (LIMA *et al.*, 2017), *Salmonella* (GARCÍA *et al.*, 2004), *Rizhobium* (ROBLEDO *et al.*, 2012), *Sarcina* (YANG *et al.*, 2013), *Alacaligenes* (FIEDLER; FÜSSEL; SATTTLER, 1989), *Agrobacterium* (BARNHART *et al.*, 2013), entre outros.

As bactérias utilizadas no presente estudo foram do gênero *Komagataeibacter* (antiga *Gluconacetobacter*), mais especificamente *K. xylinus* ATCC 53582 e *K. hansenii* 23769.

A *Komagataeibacter* é uma bactéria gram-negativa, aeróbia, que metaboliza de forma incompleta diversos álcoois e açúcares. Essas bactérias podem ser encontradas naturalmente em frutas e vegetais em processo de decomposição (COLLADO *et al.*, 2009).

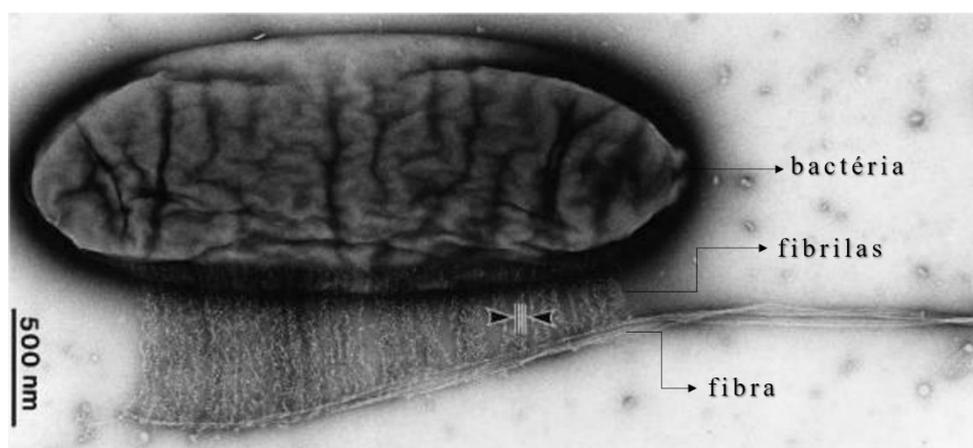
A *Komagataeibacter* é amplamente usada para produção de CB, que se dá em meios de cultura, sólidos ou líquidos, ricos em carbono e nitrogênio, sendo HS (HESTRIN; SCHRAMM, 1954) um dos mais comumente utilizados (COSTA, A. F. S. *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2018). A bactéria usa a CB produzida como um mecanismo de flotação, fazendo com que a bactéria permaneça na interface meio de cultura/ar facilitando a obtenção de oxigênio. A CB atua também como uma barreira que protege a bactéria de radiação ultravioleta, além de captar o substrato para a bactéria e seu caráter higroscópico previne a desidratação do substrato (WILLIAMS; CANNON, 1989).

A bactéria *K. xylinus* ATCC 53582 é conhecida como bactéria super-produtora devido sua capacidade elevada de produção de celulose bacteriana quando comparada a outras bactérias do mesmo gênero (AUGIMERI; STRAP, 2015; JACEK *et al.*, 2019). A *K. hansenii* ATCC 23769 é bastante referida em publicações acadêmicas associada ao meio de cultura sintético e alternativo e apresenta boa produção de CB (ILLA; SHARMA; KHANDELWAL, 2019; WU *et al.*, 2019; YE *et al.*, 2019).

3.2.2 Síntese

Bioquimicamente, a CB é sintetizada via fermentação através da metabolização de açúcares como glicose. Esse processo ocorre entre a membrana celular e a membrana plasmática da célula (CAMPANO *et al.*, 2016). As cadeias de glicose, após sua formação, são secretadas por poros existentes na membrana plasmática e então interagem entre si, por meio de ligações de hidrogênio, formando uma rede nanoestruturada de fibras de celulose (ribbons) como pode ser observado na Figura 5 (HIRAI; TSUJI; HORII, 2002).

Figura 5 – Microscopia eletrônica de transmissão da bactéria *K. hansenii* excretando microfibras de celulose.



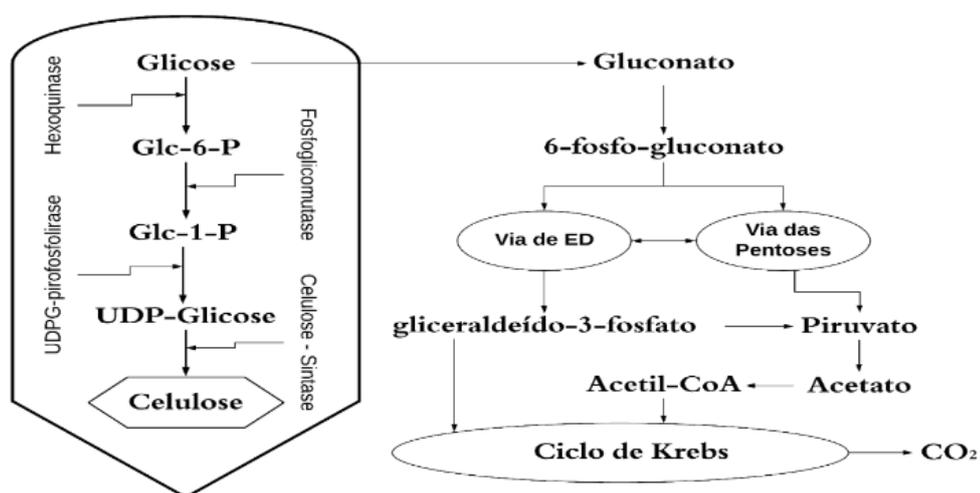
Fonte: Hirai, Tsuji e Horii (2002).

A biossíntese da celulose é uma reação com multi-etapas que envolvem enzimas individuais, complexos catalíticos e proteínas reguladoras, que contêm quatro principais etapas quando a fonte de carbono é a glicose. A etapa 1 se dá pela fosforilação da glicose pela hexoquinase, seguida pela isomerização da glicose-6-

fosfato (Glc-6-P) em glicose-1-fosfato (Glc-1-P) através da ação da fosfoglicomutase. Na etapa 3 há a formação da uridina-difosfato-glicose (UDP-Glic ou UDPG) através da ação da UDPG-pirofosforilase (UGPase), e, finalmente, a quarta etapa é a reação de síntese da celulose. UDPGlc, que é comum em muitos microrganismos, é o precursor direto da celulose e, possivelmente, desenvolve um importante papel na sua síntese já que microrganismos produtores de celulose possuem cerca de cem vezes mais UDPGlc do que os não produtores (LEE, K.Y. *et al.*, 2014; UL-ISLAM *et al.*, 2017).

Ullah e colaboradores (2016) sintetizaram celulose a partir de enzimas obtidas da bactéria *G. hansenii* PJK (KCTC 10505BP) e formularam rotas baseadas em seus estudos e literatura prévia associada à via das pentoses, à via de Entner Doudoroff (ED) e ao ciclo de Krebs. Grande parte das bactérias que produzem celulose oxidam etanol e produzem ácidos orgânicos a partir de açúcares (glicose sendo a mais comum) (CAMPANO *et al.*, 2016; ULLAH *et al.*, 2016). A rota simplificada da síntese de CB pode ser observada na Figura 6.

Figura 6 – Rota simplificada de biossíntese da celulose bacteriana.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.3 Propriedades e Aplicações da Celulose Bacteriana

Apesar de ser quimicamente semelhante à celulose vegetal, a CB apresenta propriedades químicas e físicas diferentes. As propriedades físicas superiores podem ser atribuídas ao elevado grau de polimerização (2000 – 6000) e as fibras de caráter

nanométrico desse material (TABUCHI, 2007). A CB tem propriedades como biocompatibilidade, elevada resistência mecânica, biodegradabilidade, elevada cristalinidade, elevada pureza e atoxicidade (ANDRIANI; APRIYANA; KARINA, 2020; CHAWLA *et al.*, 2009; PACHECO *et al.*, 2017).

Devido à alta aglomeração de fibras nanoestruturadas e ao elevado comprimento dessas fibras, a celulose bacteriana apresenta um elevado grau de polimerização, propriedade esta que mede a quantidade de mols de monômero (glicopiranoose) que estão presentes em um mol do polímero (CB). Esse elevado grau de polimerização favorece as propriedades mecânicas da CB e a utilização da CB como espessantes, uma vez que o grau de polimerização está diretamente ligado à viscosidade do material (KUMAR *et al.*, 2009; SHI *et al.*, 2013; SHINODA *et al.*, 2012).

Devido sua estrutura naturalmente nanométrica e tridimensional, a CB também possui uma elevada porosidade, característica que lhe confere uma alta capacidade de absorção de solventes de diferentes polaridades, como água e óleo por exemplo, e por isso, sua aplicação em diferentes áreas da biomedicina. Nesse contexto, o Biofill®, um curativo composto por celulose bacteriana, poroso, semitransparente, dotado de uma permeabilidade seletiva que permite a passagem apenas de vapor de água, bloqueando as bactérias, é um dos produtos pioneiros na aplicação da CB na biomedicina e que, na década de 1980, quando foi criado, recebeu várias patentes afirmando a eficácia do produto no auxílio do tratamento de queimaduras e úlceras (CZAJA, W. *et al.*, 2007). Além do Biofill®, outras aplicações da CB incluem os biomateriais da empresa norte-americana Xylos (CZAJA, Wojciech *et al.*, 2006), o implante vascular artificial da Basyc (KLEMM, Dieter *et al.*, 2001) e no diafragma de fones de alta performance da Sony (JONAS; FARAH, 1998).

A CB possui uma característica de poder ser moldada *in situ*, ou seja, capacidade de se adequar a diferentes formatos, dependendo das condições de cultivo. Essa característica permite a aplicação da CB em *scaffolds*, além de liberação controlada de fármacos e sensores baseados em células vivas (BADSHAH *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2018)

Na indústria sonora, empresas como a Sony Corporation® utilizam películas a base de CB como membranas acústicas em seus fones de ouvido e *headsets* (IGUCHI *et al.*, 1988).

Na indústria alimentícia, a CB pode ser encontrada como a Nata de Coco, uma sobremesa dietética típica das Filipinas, mas consumida no mundo inteiro. A nata de coco é uma película gelatinosa (CB) obtida através da fermentação da água de coco (Figura 7). Outras aplicações potenciais na área de alimentos podem incluir filmes para embalagens alimentícias e revestimentos e espessantes na culinária (AZEREDO *et al.*, 2019; AZEREDO, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2019).

Figura 7 – Nata de Coco – sobremesa feita com celulose bacteriana



Fonte: NATA DE COCO a; NATA DE COCO b.

3.2.4 Variáveis do processo fermentativo

As características da CB estão diretamente correlacionadas a sua forma de produção, pois a variação de meio de cultura, temperatura, tempo e pH durante o processo fermentativo pode alterar bastante suas propriedades e, conseqüentemente, direcionar as possíveis aplicações (CAMPANO *et al.*, 2016; KESHK; SAMESHIMA, 2006; WANG, S. *et al.*, 2018).

Essas variáveis, comumente, são investigadas com foco no aumento da produção de CB, diferentes fontes de carbono (mono, poli e dissacarídeos) e diferentes fontes de nitrogênio (orgânico e inorgânico), concentração inicial de glicose, pH, meio de cultura e temperatura são avariáveis muito abordadas em estudos que focam em aumentar a produção de CB. (ÇAKAR *et al.*, 2014; E. P. ÇOBAN, 2011; KESHK, 2014; LEE, KOON YANG *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2016; RAGHUNATHAN, 2013; RANI; APPAIAH, 2011; SON *et al.*, 2001).

Entretanto, além da influência direta destas variáveis na quantidade de CB produzida, elas também podem afetar diretamente as propriedades dessa CB. A mudança da fonte de carbono utilizada no meio de cultura, pode causar uma mudança expressiva na cristalinidade da CB, como estudado por Ruka e colaboradores (2012) onde um aumento de cristalinidade de 79% para 95% foi obtido apenas trocando a fonte de carbono usada no meio de glicose para manitol. Güzel e Özlem (2019) obtiveram variações nos valores de cristalinidade, capacidade de absorção de água e largura da fibra apenas com a mudança do meio de cultura utilizado, com o meio de hidrolisado de casca de limão apresentando a maior capacidade de absorção de água ($886\text{m}\cdot\text{m}^{-1}$), o meio de hidrolisado de casca de tangerina apresentando a melhor cristalinidade (92%) e o meio sintético HS produziu CBs com maior espessura de fibras (74 nm). Illa e colaboradores (2019) utilizando duas cepas distintas de bactérias (*K. hansenii* ATCC 23769 e Bactéria isolada de uvas) obtiveram mudanças expressivas na área superficial da CB produzida, 146 e $74\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$, para *K. hansenii* e bactéria da uva, respectivamente e um aumento no valor do módulo de Young com a bactéria isolada da uva (10,2 GPa) enquanto a *K. hansenii* obteve um valor aproximadamente 50% menor (5,6 GPa).

Outra variável da fermentação que contribui bastante para as propriedades finais da CB obtida é o tipo de fermentação. Existem duas formas gerais de processo fermentativo, o estático e o agitado, ambas podendo apresentar variações. Na fermentação estática, não há turbulência no meio de cultura o que permite que a CB seja produzida na forma de uma película gelatinosa e homogênea, que se forma na interface meio/ar. Isso se dá pelo acúmulo de bolhas de CO_2 presente nos poros da película, proveniente das bactérias (AZEREDO, 2018) e a alta pressão do oxigênio protege os microrganismos de condições ambientais não favoráveis, como baixa concentração de água, pHs extremos, microrganismos patogênicos, raios ultravioletas, etc...(GÜZEL; ÖZLEM, 2019; IGUCHI; YAMANAKA; BUDHIONO, 2000; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

A fermentação agitada pode produzir CB na forma de *pellets* ou uma massa sem forma definida, devido a turbulência presente no meio de cultura durante o processo agitado. As CBs obtidas dessa forma tendem a apresentar uma menor cristalinidade, menor resistência mecânica e menor grau de polimerização, mas, normalmente, apresentam uma maior produção quando comparadas à CB de cultivo

estático (CAMPANO *et al.*, 2016; KRYSZYNOWICZ *et al.*, 2002; SINGHSA, P.; NARAIN; MANUSPIYA, 2018).

O tempo de fermentação também pode causar modificações na produção da CB. A variação do tempo de fermentação na produção de CB é um tema pouco abordado nos trabalhos publicados, e quando abordado, são utilizados poucos tempos de fermentação (normalmente 2 tempos distintos) e o foco é sempre avaliar a produção (CHEN, G. *et al.*, 2018). Entre os trabalhos de CB existe uma variação dos tempos de incubação utilizados existindo trabalho que produzem CB com 3 dias (CHEN *et al.*, 2018) enquanto, em outros prolongam a fermentação até o 15º dia (BANDYOPADHYAY; SAHA; SAHA, 2018). O estudo aprofundado da influência do tempo de fermentação nas propriedades da CB será um dos focos principais deste trabalho.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Processo fermentativo

4.1.1 Meio de cultura e microrganismos

Para a produção de CB utilizou-se duas cepas de microrganismos provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC) sendo elas: *Komagataeibacter* (anteriormente conhecidos como *Gluconacetobacter*) *xylinus* ATCC 53582 e *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769. O meio de cultura utilizado para a produção das películas de CB neste trabalho foi o meio sintético HS (HESTRIN; SCHRAMM, 1954), cuja composição pode ser observada na Tabela 1:

Tabela 1 – Composição do meio sintético HS

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
Glicose	20,0
Extrato de levedura	5,0
Peptona	5,0
Fosfato de sódio	2,7
Ácido cítrico	1,5

Fonte: elaborado pelo autor

4.1.2 Preparação do inóculo

Os microrganismos utilizados foram espalhados em placas de petri contendo 25 mL do meio HS ágar a partir de um tubo contendo meio HS inclinado (estoque) e incubado em estufa B.O.D (biochemical oxygen demand) por 48 h à 30 °C. Após o período de incubação, a biomassa formada na superfície da placa foi transferida para um frasco Schott de 250 mL contendo 100 mL de meio HS e incubada, novamente, em estufa B.O.D por 48 h à 30 °C.

4.1.3 Produção da celulose bacteriana

Frascos Schott de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura HS foram inoculados utilizando 10% v.v⁻¹ do inóculo previamente preparado e incubados em estufa B.O.D à 30 °C em diferentes intervalos de tempo (4, 6, 8 e 10 dias). Esses tempos foram escolhidos com base nos seguintes fatos: o menor tempo de fermentação (4 dias) foi o mínimo de tempo necessário para se obter uma película de CB uniforme e manuseável e o tempo máximo de fermentação (10 dias) foi determinado com base em estudos realizados previamente pelo grupo de pesquisa que mostraram que do 10^o ao 15^o dia de fermentação praticamente não havia mudança na quantidade (em massa seca) de CB produzida (CHAGAS, 2018).

4.1.4 Purificação e neutralização da celulose bacteriana

Após os períodos de fermentação, as películas foram removidas do meio de cultura, lavadas em água corrente para retirar o excesso de meio e submetidas ao processo de purificação, que é constituído por duas etapas. Na primeira etapa, as películas de CB foram submersas em água a 100 °C por 1 h; esse procedimento foi repetido duas vezes. Na segunda etapa as películas foram submersas em uma solução alcalina (NaOH 2% m.v⁻¹) a 80 °C por 1 h, repetidas vezes, até completa remoção do meio de cultura e células residuais incorporadas a membrana. Após a purificação, as películas passaram por sucessivas lavagens em água corrente até pH 7, para garantir a completa remoção do NaOH residual da purificação. As películas neutras passaram por uma última lavagem em água destilada e foram armazenadas em frascos de plástico em uma câmara de resfriamento com temperatura controlada (~4 °C) para subseqüentes caracterizações.

4.2 Caracterizações da celulose bacteriana

4.2.1 Umidade, produção e produtividade

As películas purificadas e neutralizadas foram secas em balança de infravermelho (Marte – ID2000) a 170 °C, em triplicata, para a obtenção da massa seca de cada película. Com esse valor foi possível calcular a umidade, a produção e a produtividade da fermentação seguindo as equações 1, 2 e 3, respectivamente.

$$\text{Produção (g.L}^{-1}\text{)} = \frac{mcb_s \cdot 1000}{V_m} \quad (1)$$

$$\text{Produtividade (g.L}^{-1}\text{.dia}^{-1}\text{)} = \frac{mcb_s \cdot 1000}{V_m \cdot t} \quad (2)$$

$$\text{Umidade (\%)} = 100 - \left(\frac{mcb_u - mcb_s}{mcb_u} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

Onde mcb_s é a massa de CB seca, obtida, em gramas, por secagem em balança de infravermelho, mcb_u é a massa, em gramas, da película de CB úmida obtida em balança analítica, V_m é o volume do meio de cultura, em mililitros, utilizado na fermentação e t é a quantidade de dias que durou a fermentação.

4.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As medidas de FTIR foram realizadas em espectrômetro PerkinElmer® modelo Spectrum Two, com resolução de 4 cm^{-1} , faixa de leitura de 4000 a 400 cm^{-1} e 32 varreduras. Os espectros foram obtidos com CB na forma de pastilhas de KBr contendo 5% (m.m^{-1}). As amostras de CB foram previamente liofilizadas e moídas.

4.2.3 Análises termogravimétricas (TGA)

As medidas termogravimétricas foram realizadas utilizando amostras liofilizadas e moídas de CB ($\sim 4 \text{ mg}$) em equipamento PerkinElmer® modelo STA 6000 com faixa de temperatura de 50 a $600 \text{ }^\circ\text{C}$, taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de $40 \text{ mL}/\text{min}$.

4.2.4 Difração de Raios-X (DRX)

As análises de DRX foram realizadas no Laboratório de Raios-X do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará. Os gráficos de difração de DRX foram obtidos com difratômetro para amostras policristalinas modelo Xpert-Pro MPD – Panalytical, com tubo de Co em 40 kV e 40 mA na escala 2θ . O intervalo angular utilizado foi de 10 a 30° , com uma velocidade de varredura de $0,5 \text{ }^\circ/\text{min}$. O

índice de cristalinidade (IC) foi estimado pelo método descrito por Seagal et al. (1959) seguindo a equação 4:

$$IC (\%) = \left[\frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \right] \cdot 100 \quad (4)$$

onde I_{002} é a intensidade máxima do pico de difração para a região cristalina referente ao plano cristalográfico 002 (celulose I) e I_{am} é a intensidade da parte amorfa da amostra. Para difratogramas obtidos com tubo de Cu (radiação Cu-K α , $\lambda = 1,540562 \text{ \AA}$) I_{002} se localiza em $2\theta \sim 22^\circ$ e I_{am} em $2\theta \sim 18^\circ$ enquanto que para difratogramas obtidos com tubo de Co (radiação Co-K α , $\lambda = 1,788965 \text{ \AA}$) I_{002} se localiza em $2\theta \sim 26^\circ$ e I_{am} em $2\theta \sim 22^\circ$ (DEMUNER, 2017). O tamanho do cristalito (CrS) das amostras foi estimado pela equação 5, seguindo a metodologia proposta por Singhsa et al. (2018).

$$Crs (nm) = \left(\frac{K \cdot \lambda}{FWHM \cdot \cos\theta} \right) \quad (5)$$

onde K é o fator de forma (0,94), λ é o comprimento de onda do raio-x (1,788965 \AA), FWHM é a largura total em metade da altura do pico I_{002} e θ é o ângulo de Bragg referente ao pico I_{002} .

4.2.5 Ensaios mecânicos

Os ensaios de tração foram realizados em uma máquina universal de ensaios (modelo EMIC DL3000) utilizando corpos de prova retangulares (60 mm x 10 mm) obtidos a partir de CB seca em estufa (50 °C, 24 h). A espessura dos corpos de prova (quintuplicata) foi medida utilizando um micrômetro (Mitutoyo QuantunMike IP65) e, previamente aos ensaios, eles foram mantidos em dessecador com umidade controlada (~ 50%) com o auxílio de uma solução supersaturada de sulfato de magnésio por 48 h. Os ensaios foram realizados seguindo a metodologia ASTM D882 com adaptações, em temperatura ambiente (~ 23 °C) e umidade controlada (~ 50% UR). A distância inicial das garras foi ajustada para 40 mm e o ensaio teve início com velocidade de 12,5 mm/min e carga aplicada de 500 N (ou 50 kgf). Os valores de resistência a tração, tensão na ruptura e módulo de Young foram obtidos.

4.2.6 Capacidade de absorção de água (CAA)

As análises de absorção de água foram realizadas em triplicata utilizando amostras de CB liofilizada cortadas (2 cm x 2 cm). As amostras foram submersas em béqueres contendo 50 mL de água destilada e submetidas a sucessivas pesagens até não apresentar alteração significativa na massa (~3 h). Os valores de capacidade de absorção de água foram estimados utilizando a equação 6:

$$CAA(\%) = \left[\frac{(mcb_f - mcb_i)}{mcb_i} \right] \cdot 100 \quad (6)$$

onde mcb_i é massa, em gramas, do corpo de prova de CB utilizado antes do intumescimento em água/óleo mineral e mcb_f é a massa final, em gramas, do corpo de prova de CB após a análise.

4.2.7 Termoporometria por calorimetria exploratória diferencial (TP-DSC)

A termoporometria é uma técnica de verificação de tamanho de poros em sólidos que se baseia na análise de um sinal referente à fusão de uma substância contida nos poros. Para a Termoporometria por DSC esse sinal é associado ao calor de mudança de fase e para análise de celulose, a substância utilizada é água.

A TP-DSC difere 3 tipos de água de acordo com a interação delas com os poros. A FW é considerada a água livre, àquela que não está confinada no interior do material e congela a 0 °C. A FBW (água confinada congelável) se encontra dentro do poro e congela a uma temperatura inferior a FW, devido à pressão a qual ela está submetida. NFW (água não congelável) é a água que está interagindo de maneira tão forte com o material (dentro do poro) que não congela. A TP-DSC utiliza os valores de fluxo de calor obtidos na leitura de DSC para obter uma distribuição de poros por diâmetro através de modelos matemáticos descritos por Rojo e colaboradores (2015).

As medidas de termoporometria foram feitas com películas de CB úmidas por calorimetria exploratória diferencial utilizando um calorímetro Q20 TA Instruments® acoplado com um cooler RCS90 TA Instruments®. Os parâmetros utilizados na análise foram baseados em Rojo et al. (2015). O cadinho vazio e a amostra de CB úmida são pesados antes do início da análise. A análise tem início com uma isoterma de 5 minutos a 5 °C para garantir o equilíbrio inicial do sistema, seguida por

um processo de resfriamento a 5 °C/min até -35 °C com isoterma de 10 minutos para garantir o completo congelamento da água contida na amostra. Após essa etapa, a amostra foi aquecida em 14 etapas até atingir 5 °C, temperatura essa que garante o descongelamento de toda a água livre presente no material, por ser acima da temperatura de fusão da água (0 °C). Todas as 14 etapas de aquecimento são realizadas com uma taxa de 1 °C/min e as isotermas são utilizadas nas seguintes temperaturas: -30 °C, -20 °C, -15 °C, -6 °C, -4 °C, -2 °C, -1,5 °C, -1,1 °C, -0,8 °C, -0,5 °C, -0,3 °C, -0,2 °C, 0,5 °C e 5 °C. Obtém-se, ao fim da análise, curvas de tempo (min) por temperatura (°C) e fluxo de calor (mW). Após a análise, o cadinho é furado e colocado em estufa para completa remoção da água na amostra (24 h) e, em seguida, pesado para se obter, por diferença, a massa seca da amostra.

Com esses valores e utilizando a teoria matemática descrita por Rojo *et al.* (2015) se obtém um gráfico de FBW (água confinada congelável) por diâmetro de poros. Entretanto, a unidade de FBW ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) é dada pela razão entre a massa de FBW e a massa da amostra seca. Devido aos cálculos envolvidos na técnica, os valores de FBW são cumulativos, ou seja, o valor obtido no ponto 100 nm é referente à toda a quantidade de poros daquele ponto para baixo. Visando melhorar a exibição desses resultados, procurou-se uma função que se adequava aos gráficos de distribuição de poros e foi realizada uma regressão. A função utilizada foi uma função sigmoideal que pode ser vista na equação 9:

$$f(x) = A_1 + \left(span \cdot \frac{p}{1 + 10^{(b1-x) \cdot h1}} \right) + \left(span \cdot \frac{1-p}{1 + 10^{(b2-x) \cdot h2}} \right) \quad (7)$$

onde os fatores A_1 , span, p, b_1 , b_2 , h_1 e h_2 foram obtidos por meio da regressão da curva de distribuição de poros de cada amostra. Com a regressão foi possível calcular valores de uma distribuição relativa de poros (DRP) em função do tamanho de poros.

4.2.8 Grau de polimerização (GP)

Em uma sala a 25 °C, as amostras de CB liofilizadas foram diluídas em 20 mL de solução de cobre-etilenodiamina ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). De acordo com o método TAPPI T 230-08, 0,01 g de CB liofilizada são adicionadas a 25 mL de água destilada e 25 mL de solução de cobre-etilenodiamina $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A solução foi agitada (~18h), para

garantir a completa dissolução da CB, e o tempo de escoamento foi medido com o auxílio de um viscosímetro Canon-Fenske. A viscosidade relativa (η_r) e a viscosidade específica (η_{sp}) foram calculadas pelas equações 8 e 9, respectivamente (BOZTUĞ; BASAN, 2004).

$$\eta_r = t/t_0 \quad (8)$$

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 \quad (9)$$

onde t é o tempo de escoamento da solução com celulose e t_0 é o tempo de escoamento da solução de cobre-etilenodiamina ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$) sem celulose.

De acordo com o método de ponto único, a viscosidade intrínseca (η) foi determinada usando a fórmula geral (equação 10) (BOZTUĞ; BASAN, 2004).

$$\eta = \frac{\sqrt{2(\eta_{sp} - \ln \eta_r)}}{c} \quad (10)$$

onde c é a concentração da solução de CB em g.mL^{-1} .

O grau de polimerização foi determinado pela equação de Mark-Houwink-Sakurada para grau de polimerização superior a 950 (equação 11) (BLANCO *et al.*, 2018; COSTA, 2009).

$$\eta = 2,28 \cdot GP^{0,76} \quad (11)$$

4.2.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens de MEV foram realizadas na Central Analítica da Universidade Federal do Ceará. Para a visualização por microscopia eletrônica de varredura, fragmentos das amostras liofilizadas de CB foram montadas em “*stubs*”, cobertas com uma fina camada de ouro em aparelho de cobertura metálica Emitech, modelo K550 e encaminhadas ao microscópio eletrônico de varredura MEV Quanta 450-FEG (FEI) e visualizadas sob uma aceleração de voltagem de 15 kV, em diferentes aumentos.

4.3 Avaliações Estatísticas

4.3.1 Análise de Variância (ANOVA)

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada aos dados de produção, produtividade, umidade, termogravimetria, cristalinidade, ensaios mecânicos, capacidade de absorção de água, grau de polimerização e dimensões de fibras para verificar se as variações entre os tratamentos foram estatisticamente relevantes. As avaliações foram desenvolvidas utilizando o teste de Tukey, com valores de $p < 0,05$ sendo estatisticamente significantes.

4.3.2 Análise estatística multivariada (Quimiometria)

Uma matriz numérica foi construída usando dados de propriedades das CBs produzidas com os dois microrganismos de estudo (*K. xylinus* ATCC 53582 e *K. hansenii* ATCC 23769) e os quatro tempos de fermentação (4, 6, 8 e 10 dias).

As propriedades submetidas a essa análise foram: capacidade de absorção de água, ensaios mecânicos, termoporometria e FTIR. As matrizes obtidas com os dados supracitados foram importadas para o software PLS Toolbox™ (versão 8.6.2, Eigenvector Research Incorporated, Manson, WA USA). Uma avaliação estatística multivariada não supervisionada por análise de componente principal (PCA) foi desenvolvida, separadamente, para cada uma das propriedades analisadas. Antes da abordagem quimiométrica, os dados foram autoescalados, ou seja, foram centralizados em torno da média com posterior escalonamento pela variância, dando o mesmo peso (força) às variáveis, aumentando assim a variabilidade das amostras e permitindo a comparação entre amostras de unidades diferentes.

O algoritmo da decomposição em valor singular (SVD) foi aplicado para decompor as matrizes principais em matrizes de *scores*, *loadings* e erros de modelagem. As informações relevantes das amostras ficaram contidas nas duas componentes principais (PC), com um nível de confiança de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

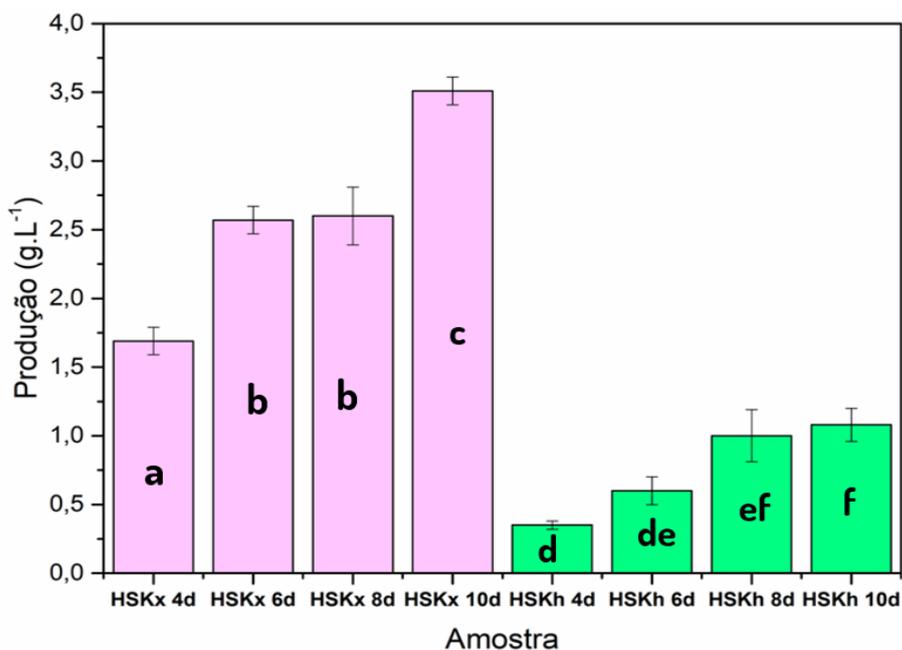
Nesta seção são apresentados os resultados referentes a umidade, produção, produtividade, cristalinidade, espectroscopia de infravermelho, estabilidade térmica,

porosidade, grau de polimerização, resistência mecânica, capacidade de absorção de água e estrutura das amostras de CB produzidas com *K. xylinus* ATCC 53582 e *K. hansenii* ATCC 23769 com meio HS e diferentes tempos de fermentação (4, 6, 8 e 10 dias). As amostras obtidas utilizando as cepas *K. xylinus* ATCC 53582 e *K. hansenii* ATCC 23769 serão referidas como HSKx e HSKh, respectivamente, e o tempo de fermentação representado pelo número de dias seguido pela letra d (4d, 6d, 8d e 10d).

5.1 Umidade, produção e produtividade

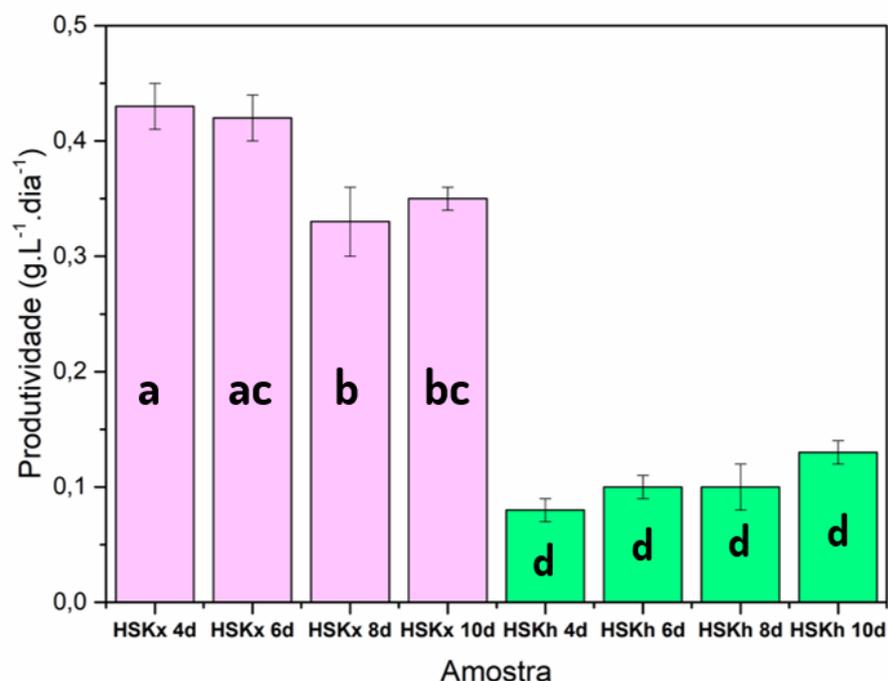
Nas Figuras 8 e 9 é possível observar os valores de produção (g.L^{-1}) e produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) das amostras estudadas no presente trabalho e na Tabela 2 os valores de umidade (%).

Figura 8 – Produção (g.L^{-1}) de películas de celulose bacteriana por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (HSKx) e *K. hansenii* ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d). Letras iguais (a, b, c, d, e, f) não apresentam diferenças estatisticamente significativas $\alpha = (0,05)$.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 9 – Produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) de películas de celulose bacteriana por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (HSKx) e *K. hansenii* ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d). Letras iguais (a, b, c, d, e, f) não apresentam diferenças estatisticamente significativas $\alpha= (0,05)$.



Fonte: elaborado pelo autor

Tabela 2 – Umidade (%) de películas de celulose bacteriana produzidas por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (HSKx) e *K. hansenii* ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d).

Amostra	Umidade (%)	Amostra	Umidade (%)
HSKx 4d	$99,17 \pm 0,10^a$	HSKh 4d	$99,64 \pm 0,01^a$
HSKx 6d	$99,04 \pm 0,10^a$	HSKh 6d	$99,28 \pm 0,10^a$
HSKx 8d	$98,93 \pm 0,10^a$	HSKh 8d	$99,27 \pm 0,10^a$
HSKx 10d	$98,93 \pm 0,10^a$	HSKh 10d	$99,25 \pm 0,03^a$

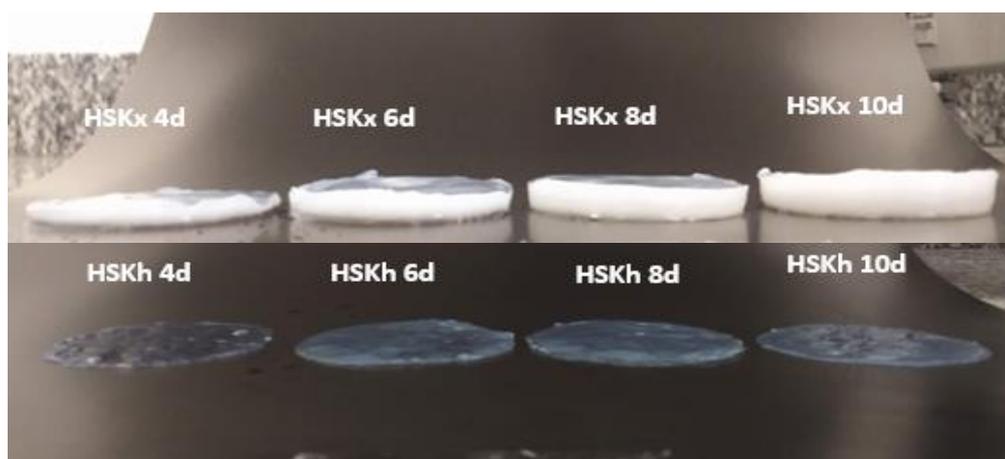
Letras iguais (a, b, c, d, e, f) na mesma coluna não apresentam diferenças estatisticamente significativas $\alpha= (0,05)$.

Fonte: elaborado pelo autor

Na HSKx é possível observar que os valores de produção, de maneira geral, aumentam com o tempo de fermentação, com exceção dos tempos 6d e 8d, que apresentaram produção igual, segundo teste Tukey. Já na HSKh é possível observar que a produção nos tempos 4d e 6d assim como os tempos 8d e 10d, são

estatisticamente iguais, ou seja, nesses intervalos de tempo de fermentação não houve uma biossíntese significativa de CB. Isso pode indicar que as células produtoras de CB entraram em estado de latência. A literatura mostra que, uma vez que a bactéria produz CB suficiente para se envolver por completo, ela entra em um estado de latência, cessando a produção do biopolímero (STEPANOV; EFREMENKO, 2018). A Figura 10 evidencia a diferença visual entre as produções obtidas.

Figura 10 – Diferença visual de películas de celulose bacteriana produzidas por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (HSKx) e *K. hansenii* ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d).



Fonte: elaborado pelo autor

Os valores de produtividade dão uma ideia de quantidade de CB seca produzida por dia de fermentação, o que, de um ponto de vista industrial, pode ser mais interessante do que o resultado de produção, uma vez que pode ajudar a otimizar o processo e diminuir gastos referentes a fermentação (CHEN et al., 2018).

A HSKx apresentou maiores valores de produção que a HSKh, evidenciando a maior eficiência da *K. xylinus* sobre a *K. hansenii*, esse comportamento pode ser observado em diversos estudos. Cao e colaboradores (2018) obtiveram melhores resultados de produção com a *K. xylinus* do que com a *K. hansenii*, incubando ambas no mesmo meio e com os mesmos parâmetros de fermentação. Todos os resultados de produtividade da HSKh foram estatisticamente iguais, enquanto os

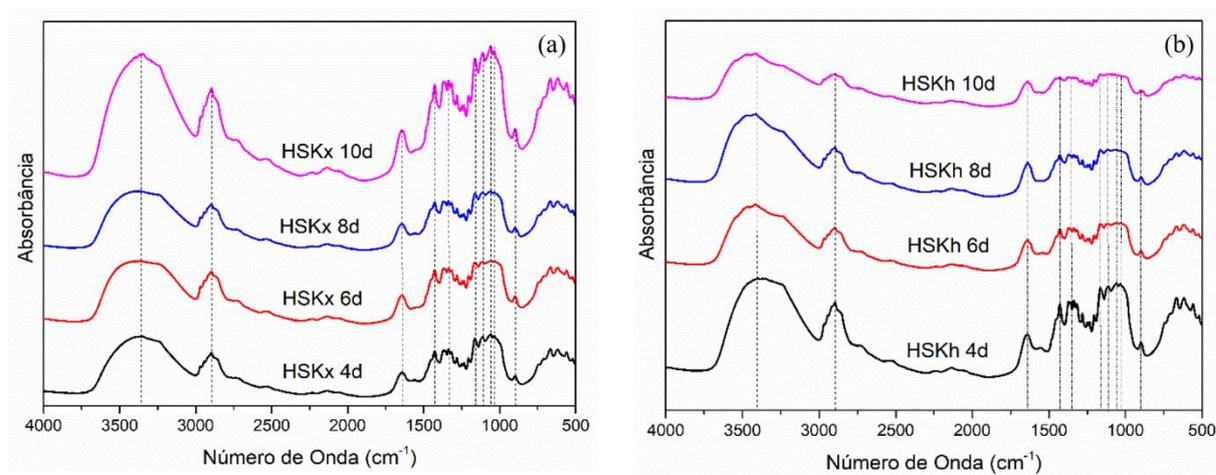
resultados da HSKx apresentaram maiores valores nos dois primeiros dias de fermentação estudados (4d e 6d) ($\sim 0,40 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ para ambos) indicando uma maior produção de CB pela bactéria no início da fermentação.

As umidades de todas as CBs produzidas foram iguais ($\sim 99\%$), o que condiz com a literatura e indica que esse material se comporta como um hidrogel que possui capacidade de retenção de água de $\sim 99\%$ (NASCIMENTO, 2019; ZMEJKOSKI et al., 2018).

5.2 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 11 é possível observar os espectros de infravermelho para todas as amostras estudadas.

Figura 11 – Espectros de FTIR para de películas de celulose bacteriana produzidas por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (HSKx) e *K. hansenii* ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d).



Fonte: elaborado pelo autor

Os resultados dos espectros de FTIR mostraram bandas típicas de CB, coincidindo com as mesmas características das bandas de celulose vegetal, uma vez que ambas possuem a mesma composição química (ANDRIANI; APRIYANA; KARINA, 2020).

A banda larga na faixa de $3300 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ é correspondente ao estiramento dos grupos hidroxila. A banda 2890 cm^{-1} está associada ao estiramento $-\text{CH}$ de alcanos e estiramento assimétrico de $-\text{CH}_2$ dos grupos $-\text{CH}-\text{OH}$ e $-\text{CH}_2-\text{OH}$.

Múltiplas bandas entre 1300 e 1430 cm^{-1} são associadas à deformação angular das ligações C—OH e —CH. As bandas em torno de 1060 cm^{-1} e 1030 cm^{-1} podem ser relacionadas com deformações C—O e C—OH, típicas de carboidratos. A vibração C—C dos anéis da glicose pode ser observada em 1111 cm^{-1} (DU *et al.*, 2018; GEA *et al.*, 2011). A banda em 1650 cm^{-1} pode ser referente ao estiramento da ligação O—H referente a água adsorvida na amostra, o que indica que a amostra ainda apresentava umidade no momento da análise, mesmo que baixa (GAO *et al.*, 2020; GEA *et al.*, 2011; GÜZEL e ÖZLEM AKPINAR, 2019).

A ausência de bandas em 1700 – 1735 cm^{-1} referentes ao estiramento de ligações C=O indica a ausência de amidas proveniente das bactérias e a ausência de banda em 1538 cm^{-1} exclui a presença de compostos nitrogenados provenientes do meio. A presença de múltiplas bandas entre 1150 e 1300 cm^{-1} é comumente relacionada a estiramento da ligação C—N, mas também são consideradas bandas características de celulose e sinais referentes ao estiramento da ligação P-OC, proveniente de ácidos nucleicos, são localizados entre 1100 e 1050 cm^{-1} . Esses sinais não mostram grande evidência nas amostras estudadas, indicativo de que o processo de purificação das amostras foi eficaz (FULLER; ANDAYA; MCCLAY, 2018; GEA *et al.*, 2011).

De acordo com Molina-Ramírez e colaboradores (2018) as bandas presentes entre 1150 e 1300 cm^{-1} apresentam uma duplicidade de significado, pois elas são características de CB mas alguns compostos nitrogenados também aparecem nessa faixa, o que faz com que não se possa concluir sobre a presença de contaminantes, provenientes de resíduos de meio de cultura e células mortas de microrganismos apenas com o FTIR. Outras análises, como TGA podem corroborar para um veredito mais preciso de uma purificação eficaz (MOLINA-RAMÍREZ *et al.*, 2018).

5.3 Análises Termogravimétricas (TGA)

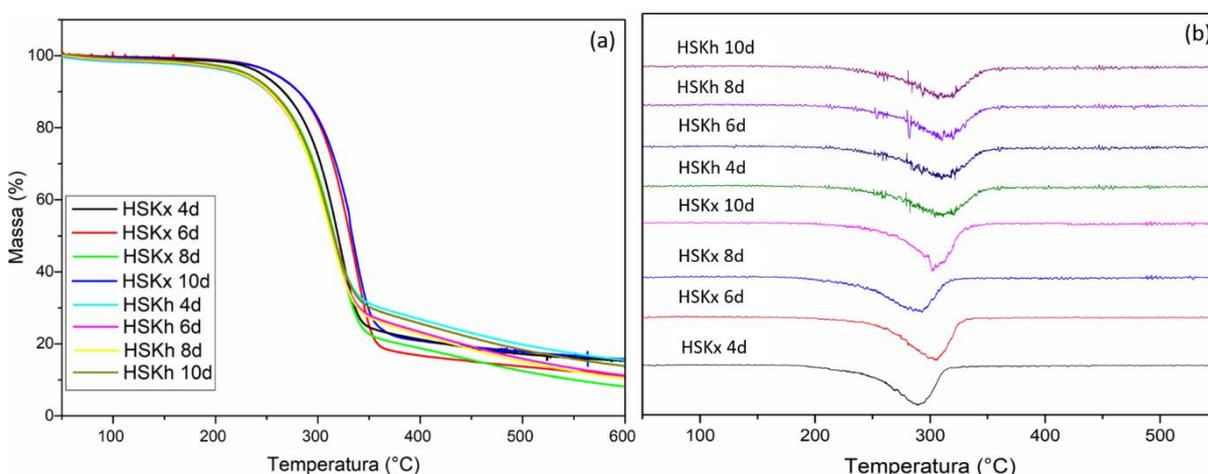
A análise de TGA foi realizada para se obter o perfil de comportamento térmico das amostras estudadas. Os termogramas obtidos e as derivadas dos mesmos podem ser observados na Figura 12.

É possível observar um único evento de perda de massa em todas as amostras analisadas. O evento é referente a degradação das cadeias glicosídicas

que compõem a celulose, que ocorreu em ~ 250 °C para todas as amostras, o que corrobora com as referências bibliográficas que reportam a degradação da CB entre 200 e 300°C (GÜZEL; ÖZLEM, 2019; MOLINA-RAMÍREZ *et al.*, 2018; VAZQUEZ *et al.*, 2013).

Eventos entre 150 e 250 °C são associados à degradação de proteínas residuais do microrganismo e do meio de cultura utilizados no processo fermentativo e a ausência desses e de outros eventos não característicos de CB apontam que a purificação realizada foi efetiva e não existem contaminantes na amostra (GEA *et al.*, 2011; MOLINA-RAMÍREZ *et al.*, 2018).

Figura 12 – Termogramas (a) e derivadas (b) para de películas de celulose bacteriana produzidas por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (HSKx) e *K. hansenii* ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d), em atmosfera inerte (N₂).



Fonte: elaborado pelo autor

Os valores de temperatura inicial de degradação (Tonset), temperatura máxima de degradação (Tmax) e perda de massa por degradação podem ser observados na Tabela 3. Todas as amostras apresentaram resistência a elevadas temperaturas (~ 237 °C) e comportamento térmico semelhantes. A amostra que apresentou maior temperatura inicial de degradação foi a HSKx 10d (~ 261 °C), enquanto a menor foi apresentada pela amostra HSKx 4d (~ 237 °C). Esse comportamento pode ser explicado por uma maior interação entre as moléculas de celulose das CBs produzidas nas amostras com maior tempo de fermentação (maior grau de polimerização), o que torna a rede de fibras tridimensional dessas amostras mais resistente, sendo assim necessário uma maior quantidade de energia para

romper essas ligações, garantindo a elas uma maior estabilidade térmica quando comparadas com amostras obtidas com menores tempos de fermentação.

Tabela 3 – Temperatura inicial de degradação (Tonset), temperatura máxima de degradação (Tmax) e perda de massa por degradação para películas de celulose bacteriana produzidas por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (HSKx) e *K. hansenii* ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d).

Amostra	Tonset (°C)	Tmax (°C)	Perda de Massa (%)
HSKx 4d	238,3 ± 1,2 ^a	291,8 ± 1,2 ^a	85
HSKx 6d	244,6 ± 1,2 ^b	304,6 ± 1,3 ^b	90
HSKx 8d	244,8 ± 2,6 ^b	294,5 ± 1,2 ^a	92
HSKx 10d	265,5 ± 2,5 ^c	302,3 ± 1,7 ^b	85
HSKh 4d	256,2 ± 1,2 ^d	312,1 ± 0,5 ^c	84
HSKh 6d	252,6 ± 2,1 ^c	311,2 ± 1,7 ^c	90
HSKh 8d	255,4 ± 1,3 ^d	312,1 ± 1,7 ^c	90
HSKh 10d	255,1 ± 0,5 ^d	311,3 ± 0,8 ^c	88

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

Fonte: elaborado pelo autor

Nas amostras de HSKx é possível observar que houve o aumento da Tonset com o aumento do tempo de fermentação o que indica que, para esse tratamento, a película de CB se torna termicamente mais resistente com o passar do tempo. Assim como nos resultados de produção (Figura 8) é possível perceber uma diferença de Tonset significativa de 4d para 6d e de 8d para 10d, indicando que esse aumento no tempo de fermentação causou de fato uma mudança estrutural na CB. Já em HSKh não houve uma grande variação na estabilidade térmica em diferentes tempos de fermentação com exceção da amostra HSKh 6d que apresentou um Tonset um pouco inferior aos demais do mesmo tratamento (~252°C). É importante ressaltar que mesmo as temperaturas de início de degradação mais baixas ainda se

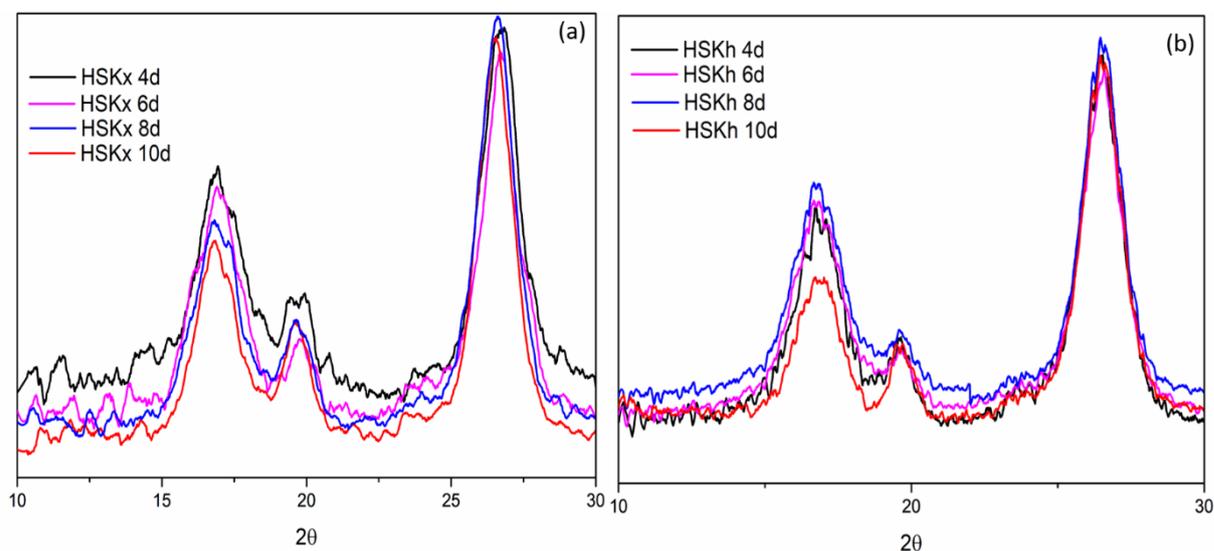
encontram na faixa referida como padrão para CB na literatura (200 – 300 °C) (GÜZEL e ÖZLEM AKPINAR, 2019; NASCIMENTO et al., 2016).

Os valores de temperatura máxima de degradação se encontram na faixa de 290 – 311°C e não apresentam padrão evidente, a semelhança desses valores destaca a alta resistência térmica da CB mesmo quando se varia o tempo de fermentação. Análise análoga pode ser feita com os valores de perda de massa que se encontram todos no intervalo de 84 – 92%. Vale ressaltar que não há nenhum trabalho publicado, de conhecimento do autor, que estude a influência do tempo de fermentação na estabilidade térmica da celulose bacteriana.

5.4 Difração de raios-X (DRX)

A Figura 13 apresenta os difratogramas das amostras de CB. Todos os difratogramas apresentam picos característicos de celulose bacteriana que se encontram em, aproximadamente, 2θ igual a 16° , 19° e 26° relacionados aos planos cristalográficos (101), (10-1) e (002), característicos de celulose tipo I, que é reportada na literatura como a celulose produzida por bactérias (MAEDA *et al.*, 2006; TSOUKO *et al.*, 2015; VAZQUEZ *et al.*, 2013). O uso do tubo de Co, ao invés do tubo de Cu, nas análises realizadas causa um deslocamento dos picos referentes a celulose tipo I, que originalmente se encontrariam em 14° , 16° e 22° .

Figura 13 – Difratogramas para de películas de celulose bacteriana produzidas por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (HSKx) e *K. hansenii* ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d).



Fonte: elaborado pelo autor

Os índices de cristalinidade (IC) e o tamanho dos cristalitos (CrS) das amostras podem ser observados na Tabela 4. As amostras apresentaram tamanhos de cristalito variando de 8,1 a 15,5 nm. Esses valores justificam a utilização do método proposto por Seagal e colaboradores (1959) para o cálculo do índice de cristalinidade, a utilização deste método para amostras com tamanho de cristalito superior a 5 nm se torna igualmente eficiente ao método que utiliza a deconvolução dos picos cristalinos (FRENCH; SANTIAGO CINTRÓN, 2013).

Tabela 4 – Índice de cristalinidade e tamanho do cristalito para de películas de celulose bacteriana produzidas por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (HSKx) e *K. hansenii* ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d).

Amostra	IC (%)	CrS (nm)	Amostra	IC (%)	CrS (nm)
HSKx 4d	97,6 ± 0,6 ^c	15,5	HSKh 4d	96,7 ± 0,5 ^a	8,1
HSKx 6d	95,4 ± 0,4 ^b	14,9	HSKh 6d	97,8 ± 0,3 ^{ab}	8,3
HSKx 8d	94,6 ± 0,3 ^{bc}	12,0	HSKh 8d	97,0 ± 0,1 ^b	8,4
HSKx 10d	93,1 ± 0,6 ^a	8,9	HSKh 10d	97,9 ± 0,3 ^b	8,4

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

Fonte: elaborado pelo autor

Nas amostras de HSKx foi possível observar um pequeno decréscimo no valor do índice de cristalinidade com o aumento do tempo de fermentação, passando de ~97% com 4 dias para ~93% com 10 dias de fermentação, o que indica uma redução no nível de organização das fibras para este tratamento. Já nas amostras de HSKh, os índices de cristalinidade não apresentaram variações significativas, obtendo-se valores de ~97% para todas as amostras deste tratamento.

Essa redução que ocorre nas amostras de HSKx pode se dar pelo aumento da pressão hidráulica no interior do frasco quando a película de CB começa a ocupar toda a superfície do meio de cultura, isso pode ocasionar contorções nas fibras excretadas pelas bactérias enquanto flutam para a superfície para se unir com a película de CB já formada. O mesmo comportamento não é evidente em HSKh provavelmente pela espessura bem reduzida das películas e baixa produção,

quando comparadas a HSKx, o que causaria uma pressão hidráulica menor no meio de cultura e não influenciaria na conformação das fibras excretadas. Apesar dessa redução observada nas amostras de HSKx, todas as amostras de HSKx e HSKh apresentaram elevada cristalinidade quando comparadas à celulose de origem vegetal, que varia de 56 a 65% e IC dentro do padrão reportado na literatura para CB que varia de 65 a 95% (PECORARO *et al.*, 2008; TSOUKO *et al.*, 2015). Essa característica garante a CB maior resistência mecânica quando comparada à celulose vegetal. É válido ressaltar que não há, de conhecimento do autor, trabalhos publicados que estudem a influência do tempo de fermentação na cristalinidade da CB de forma aprofundada.

5.5 Ensaio mecânicos

Na Tabela 5 é possível observar os valores de tensão máxima, tensão na ruptura e módulo de Young para todas as amostras estudadas obtidas através do ensaio de tração.

Tabela 5 – Tensão máxima, tensão na ruptura, alongação na ruptura e módulo de Young para de películas de celulose bacteriana produzidas por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (HSKx) e *K. hansenii* ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d).

Amostras	Tensão Máxima (MPa)	Tensão na Ruptura (MPa)	Elongação na Ruptura (%)	Módulo de Young (GPa)
HSKx 4d	133,2 ± 1,5 ^a	135,3 ± 1,6 ^a	3,0 ± 0,2 ^a	6,40 ± 0,02 ^a
HSKx 6d	154,0 ± 1,5 ^b	156,5 ± 2,6 ^b	2,1 ± 0,2 ^b	9,42 ± 0,04 ^b
HSKx 8d	176,5 ± 2,8 ^c	177,8 ± 2,6 ^c	3,0 ± 0,2 ^a	10,51 ± 0,09 ^c
HSKx 10d	254,3 ± 3,3 ^d	255,6 ± 1,6 ^d	3,1 ± 0,1 ^a	11,09 ± 0,04 ^d
HSKh 4d	20,6 ± 0,5 ^e	20,9 ± 0,2 ^e	1,0 ± 0,1 ^d	2,08 ± 0,07 ^e
HSKh 6d	22,6 ± 1,2 ^e	23,4 ± 1,0 ^e	1,3 ± 0,4 ^c	2,50 ± 0,04 ^f
HSKh 8d	24,9 ± 2,6 ^e	25,0 ± 2,4 ^e	1,5 ± 0,2 ^c	2,70 ± 0,09 ^g
HSKh 10d	106,9 ± 0,9 ^f	108,3 ± 0,8 ^f	2,7 ± 0,4 ^a	5,10 ± 0,04 ^h

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

Fonte: elaborado pelo autor

As amostras de HSKx apresentaram valores crescentes de tensão máxima, tensão na ruptura, e módulo de Young com o aumento do tempo de fermentação utilizado. Conforme citado no preparo das amostras para esta análise, as membranas são secas em estufas e posteriormente cortadas em formato retangular (60mm x 10mm), em prensa estampadora pneumática. Os valores obtidos para HSKx são maiores do que aqueles para HSKh (Tabela 5). Isso pode ser explicado pela maior quantidade de CB, em massa, presente nas amostras HSKx, representada por maiores valores de produção (Figura 8). O que torna a rede de fibras tridimensional mais densa e compacta quando comparada com as amostras de HSKh que, por possuírem menor quantidade CB, em massa, apresentam uma rede menos compacta e menos densa o que influi diretamente nas propriedades mecânicas do material (STEPANOV; EFREMENKO, 2018).

Para as amostras de HSKh, durante os três primeiros tempos estudados (4d, 6d e 8d) não houve diferença estatística nos valores de tensão e módulo de Young ocorrendo apenas um aumento desses valores na amostra HSKh 10d.

Os baixos valores de alongação na ruptura para ambas as amostras podem ser relacionado com a alta cristalinidade das amostras, o que contribui para uma maior resistência mecânica, mas deixa o material mais rígido e menos elástico (CHEN, S. Q. *et al.*, 2018; SINGHSA, Pratyawadee; NARAIN; MANUSPIYA, 2018).

A tensão máxima e a tensão na ruptura sempre se mostram bem próximas, em valor numérico, para amostras de CB. O comportamento semelhante exibido pela tensão máxima e o módulo de Young das amostras é explicado pelo fato de que o módulo de Young é um valor obtido em função da tensão e da deformação, como a deformação não apresenta alteração significativa nos dois tratamentos, o aumento da tensão máxima acarreta, de maneira direta, o aumento do módulo de Young (CHEN *et al.*, 2018).

A amostra com melhores resultados de propriedades mecânicas foi a HSKx 10d que apresentou tensão máxima ~255 MPa e módulo de Young ~11 GPa, valores estes considerados altos quando comparados à celulose vegetal. Essa elevada resistência mecânica pode direcionar a aplicação desta amostra para a indústria alimentícia no setor de embalagens, uma vez que essa propriedade é de fundamental importância para esse tipo de aplicação (AZEREDO, 2018; AZEREDO

et al., 2019). Todos os valores obtidos para as amostras estudadas se encontram dentro dos padrões citados na literatura para CB que reportam valores de tensão máxima variando de 7 a 280 MPa e módulos de Young 6 a 10 GPa (ILLA *et al.*, 2019; MOLINA-RAMÍREZ *et al.*, 2018; STEPANOV e EFREMENKO, 2018).

Nenhum trabalho publicado, de conhecimento do autor, estuda a influência direta do tempo de fermentação nas propriedades mecânicas da CB. O valor máximo de tensão máxima reportado na literatura (280 MPa) é maior que o obtido neste trabalho. No trabalho citado foi utilizado um meio de cultura diferente (banana podre) e uma bactéria diferente (*Komagataeibacter medellinensis*) resultando em um valor de produção superior ao maior obtido neste trabalho ($\sim 4,8 \text{ g.L}^{-1}$) o que tem influência direta na resistência mecânica da CB (MOLINA-RAMÍREZ *et al.*, 2018).

5.6 Capacidade de absorção de água (CAA)

Os valores de capacidade de absorção de água para as amostras estudadas podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 – Capacidade de absorção de água para de películas de celulose bacteriana produzidas por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (HSKx) e *K. hansenii* ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d).

Amostra	CAA (%)	Umidades após absorção (%)	Espessuras dos corpos de prova (mm)
HSKx 4d	3218 \pm 150 ^c	96,9 \pm 0,1 ^a	1,43 \pm 0,10 ^e
HSKx 6d	3226 \pm 144 ^c	96,9 \pm 0,1 ^a	1,47 \pm 0,10 ^e
HSKx 8d	3299 \pm 123 ^c	97,0 \pm 0,1 ^a	1,53 \pm 0,30 ^e
HSKx 10d	3360 \pm 125 ^c	97,1 \pm 0,1 ^a	1,55 \pm 0,20 ^e
HSKh 4d	2213 \pm 78 ^a	97,8 \pm 0,1 ^a	0,03 \pm 0,12 ^a
HSKh 6d	2486 \pm 93 ^a	96,1 \pm 0,1 ^a	0,27 \pm 0,10 ^b
HSKh 8d	2904 \pm 96 ^b	96,6 \pm 0,1 ^a	0,46 \pm 0,11 ^c
HSKh 10d	3261 \pm 111 ^c	97,0 \pm 0,1 ^a	0,73 \pm 0,11 ^d

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

Fonte: elaborado pelo autor

A capacidade de absorção de água das películas de CB estudadas não variou significativamente com o aumento do tempo para HSKx. Para HSKh houve o aumento em função do tempo de fermentação, o que pode ser explicado pelo aumento na espessura dos corpos de prova mais acentuado nas amostras de HSKh do que nas amostras de HSKx. Isso pode indicar uma área superficial de contato semelhante entre os dias de fermentação para amostra HSKx e um aumento no volume de poros para HSKx.

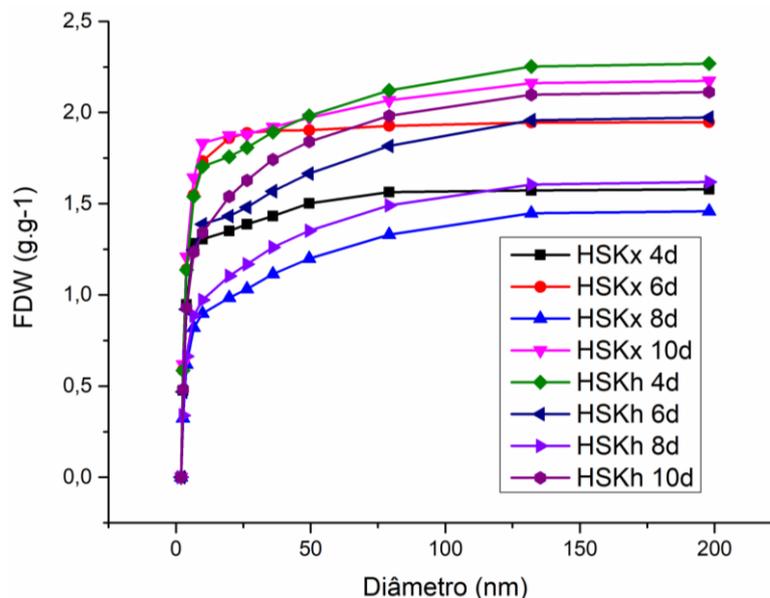
O maior valor de CAA foi observado nas amostras de HSKx, enquanto o menor foi observado na amostra HSKh 4d. Phisalaphong e colaboradores (2008) obtiveram valores de CAA variando de 500% a 600% para CB adicionada de diferentes concentrações de quitosana, todas as amostras apresentaram valores de absorção de água superiores aos reportados na literatura, o que indica que o material é obtido é de alto interesse para aplicações em biocurativos, uma vez que a capacidade de absorção de fluidos polares é uma propriedade muito importante para esse tipo de aplicação (PHISALAPHONG; JATUPAIBOON, 2008; SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010).

Pelos valores de umidade calculados ao final da análise de absorção de água (~98%) é possível inferir que, mesmo que a CB tenha absorvido uma quantidade significativa de água durante a análise, esse material não consegue voltar ao seu estado de umidade inicial (pré liofilização) (~99%), o que pode ser resultado de um colapso parcial dos poros das amostras durante o processo de secagem.

5.7 Termoporometria por DSC (TP-DSC)

Na Figura 14 é possível observar a distribuição de poros em função de FBW (água confinada congelável) para as amostras de CB estudadas.

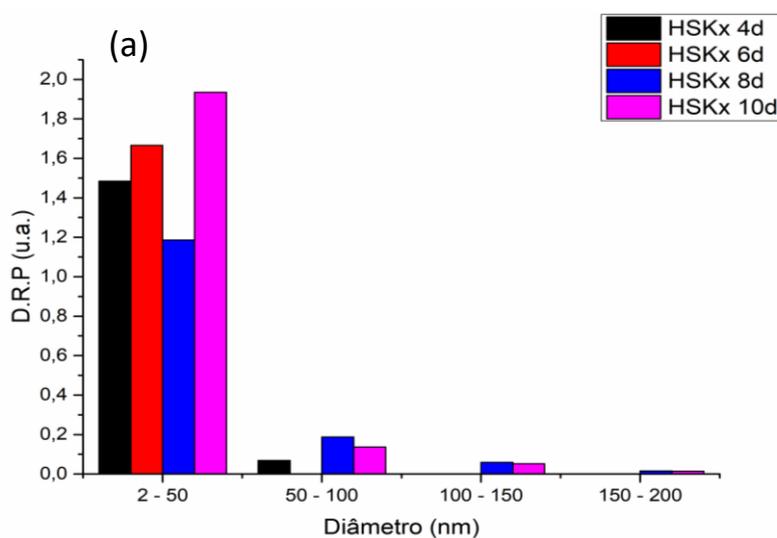
Figura 14 – Distribuição de poros para as amostras de HSKx e HSKh. Valores de FBW são cumulativos.

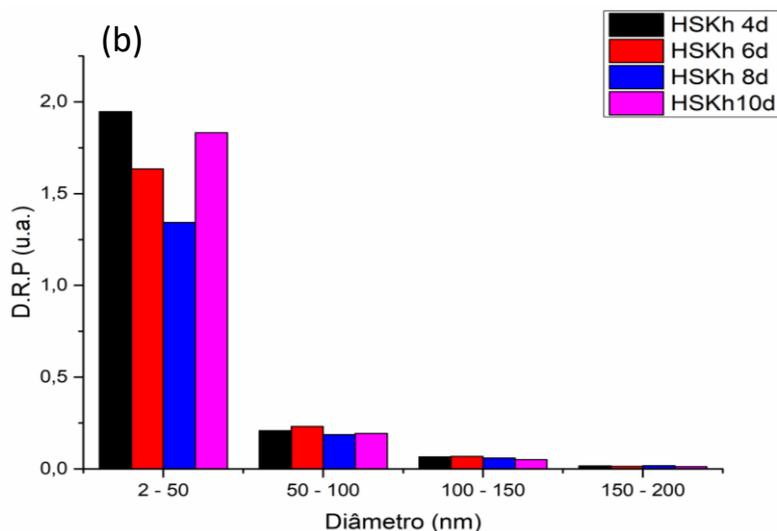


Fonte: Elaborado pelo autor

Como explicado na seção 4.2.7 os valores exibidos na Figura 14 são valores cumulativos e com o intuito de deixar os resultados mais didáticos foi realizada uma regressão para se obter a distribuição relativa de poros (D.R.P.) por diâmetro de poros (Figura 15). Vale ressaltar que todas as regressões foram muito efetivas apresentando $R^2 \sim 0,999$ para todas as amostras estudadas.

Figura 15 – Distribuição relativa de poros em função do tamanho de todas as amostras de HSKx (a) e HSKh (b).





Fonte: elaborado pelo autor

É possível observar que para todas as amostras a maior densidade de poros se encontra na faixa entre 2 e 50 nm, o que indica uma presença intensa de mesoporos no material, já que, segundo a IUPAC, poros abaixo de 2 nm são considerados microporos, entre 2 e 50 nm estão os mesoporos e acima de 50 nm se encontram os macroporos (LANDRY, 2005). A HSKx 10d se destaca entre todas as amostras estudadas mostrando uma elevada intensidade de poros seguida pela HSKh 4d. A maior intensidade de poros da HSKx 10d pode ser corroborada com os resultados de capacidade de absorção de água nos quais essa amostra apresentou os melhores resultados. Orsolini (2017) relata resultados semelhantes (poros inferiores a 50nm) para a porometria por adsorção de nitrogênio da celulose nanofibrilada seca e destacou que isso se deve a polidispersão dos diâmetros das nanofibrilas.

Essa porosidade dos materiais estudados torna estes materiais interessantes para aplicações em biocurativos, pois a presença de poros elevada possibilita a imobilização de enzimas e fármacos nos biocurativos, o que aumenta a eficiência do produto.

5.8 Grau de polimerização (GP)

Os valores de grau de polimerização para as amostras estudadas estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Grau de polimerização para de películas de celulose bacteriana produzidas por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (HSKx) e *K. hansenii* ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d).

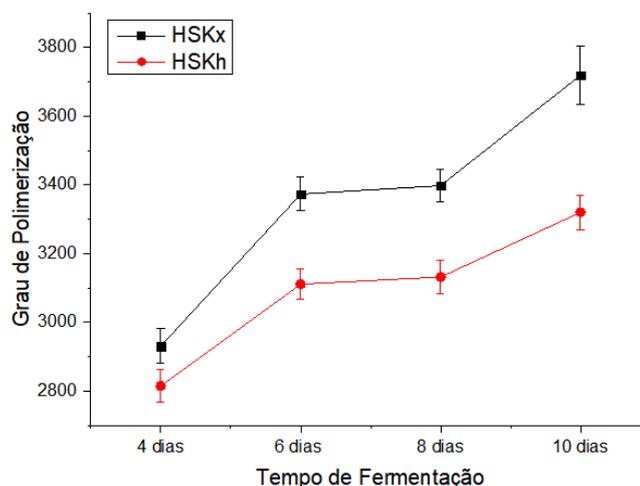
Amostra	Grau de Polimerização	Amostra	Grau de Polimerização
HSKx 4d	2931 ± 50 ^{ab}	HSKh 4d	2815 ± 47 ^a
HSKx 6d	3373 ± 49 ^d	HSKh 6d	3111 ± 44 ^{bc}
HSKx 8d	3398 ± 48 ^d	HSKh 8d	3132 ± 49 ^c
HSKx 10d	3719 ± 84 ^e	HSKh 10d	3320 ± 50 ^d

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

Fonte: elaborado pelo autor

Observando os dados da Tabela 7, os valores de grau de polimerização para as amostras de HSKx foram superiores quando comparados às amostras de HSKh, inferindo que a bactéria *K. xylinus* tende a formar fibras de CB com uma maior quantidade de monômeros (glicopirranose) do que a *K. hansenii*. Entretanto todos os valores de grau de polimerização obtidos se encontram dentro do padrão esperado para CB (2000 – 6000), que apresenta um grau de polimerização elevado quando comparado a celulose de origem vegetal (300 – 1700) (BLANCO *et al.*, 2018; IGUCHI; YAMANKA; BUDHIONO, 2000).

Figura 16 – Grau de polimerização vs. tempo de fermentação para de películas de celulose bacteriana produzidas por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (HSKx) e *K. hansenii* ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d).



Fonte: elaborado pelo autor

Na Figura 16, fica mais evidente que os valores de grau de polimerização aumentaram, para ambas as amostras (HSKx e HSKh), com o aumento do tempo de fermentação, apresentando um comportamento bem semelhante para os dois microrganismos. Esse comportamento também é observado nos valores de produção (tópico 5.1), e essa relação pode se dar pelo fato de que, com o aumento da excreção de fibrilas de CB pelo microrganismo, as fibras formadas tendem a ter um maior comprimento, indicando maior polimerização de unidades de glicanopirranose que resulta em maior grau de polimerização, uma vez que o GP está relacionado ao número de unidades de glicanopirranose em um mol de CB (HIRAI; TSUJI; HORII, 2002; SHINODA *et al.*, 2012).

O estudo de grau de polimerização para amostras de CB é pouco abordado na literatura. Shi e colaboradores (2013) avaliaram a influência do tempo de fermentação no grau de polimerização para CB produzida por *G. intermedius* BC-41 em meio SH (Schenk and Hildebrandt) e cultivo agitado, obtendo valores de GP entre 2156 e 2342. Vale ressaltar que os valores de GP obtidos no presente trabalho foram superiores aos valores obtidos por Shi e colaboradores (2013), o que é esperado pois CB produzida em cultivo agitado tende a ter menor grau de polimerização, e também outros trabalhos que aplicaram essa técnica à CB (ALGAR

et al., 2014; ANDRITSOU *et al.*, 2018; DHAR *et al.*, 2019; JUNG *et al.*, 2010; SHI *et al.*, 2013; SURMA-ŚLUSARSKA; PRESLER; DANIELEWICZ, 2008).

5.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura teve como intuito examinar a morfologia da rede tridimensional das CBs produzidas nesse trabalho e suas micrografias são apresentadas nas Figura 17 e 18.

As micrografias obtidas para as amostras estudadas apresentaram uma estrutura nanofibrilada e entrelaçada, com diâmetros de fibras variando de 77 a 85 nm (Tabela 8), esses valores estão de acordo com a morfologia padrão da celulose bacteriana (CASTRO *et al.*, 2012; PECORARO *et al.*, 2008; SHEYKHNAZARI *et al.*, 2018).

Tabela 8 – Dimensões das fibras para de películas de celulose bacteriana produzidas por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (HSKx) e *K. hansenii* ATCC 23769 (HSKh) em diferentes tempos de fermentação (4d, 6d, 8d e 10d).

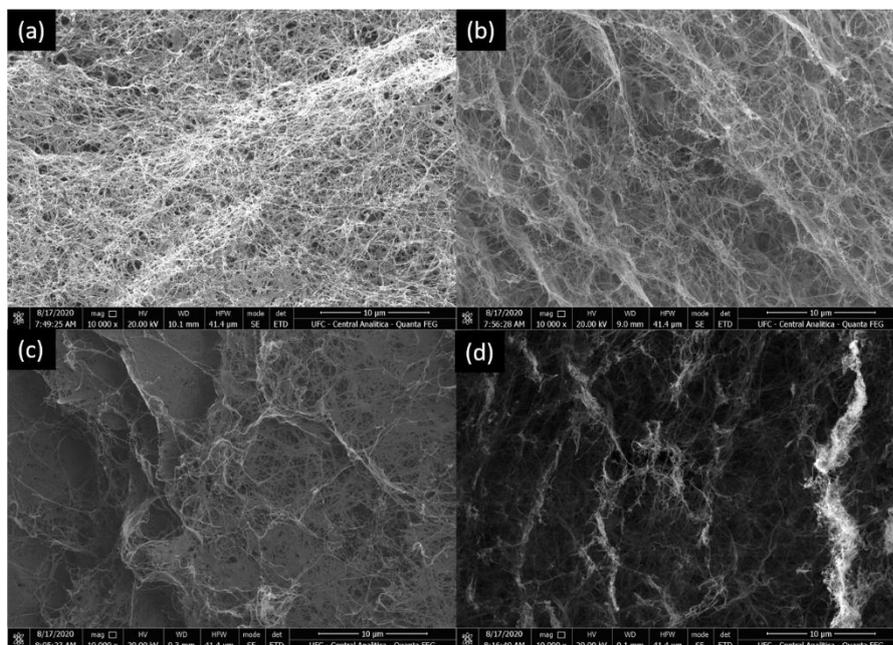
Amostra	Dimensões (nm)
HSKx 4d	78 ± 8
HSKx 6d	77 ± 7
HSKx 8d	78 ± 6
HSKx 10d	79 ± 7
HSKh 4d	79 ± 7
HSKh 6d	81 ± 9
HSKh 8d	83 ± 8
HSKh 10d	85 ± 8

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nas Figuras 17 e 18, pode-se observar o aumento da agregação das fibras com o aumento do tempo de fermentação para as amostras de HSKx e HSKh. Para as amostras de *K. xylinus* (HSKx) a rede nanofibrilada é visualmente mais fechada e o aumento da densidade é aparente com o aumento do tempo de fermentação, o que pode explicar, juntamente com os diâmetros de fibras estáveis, os valores

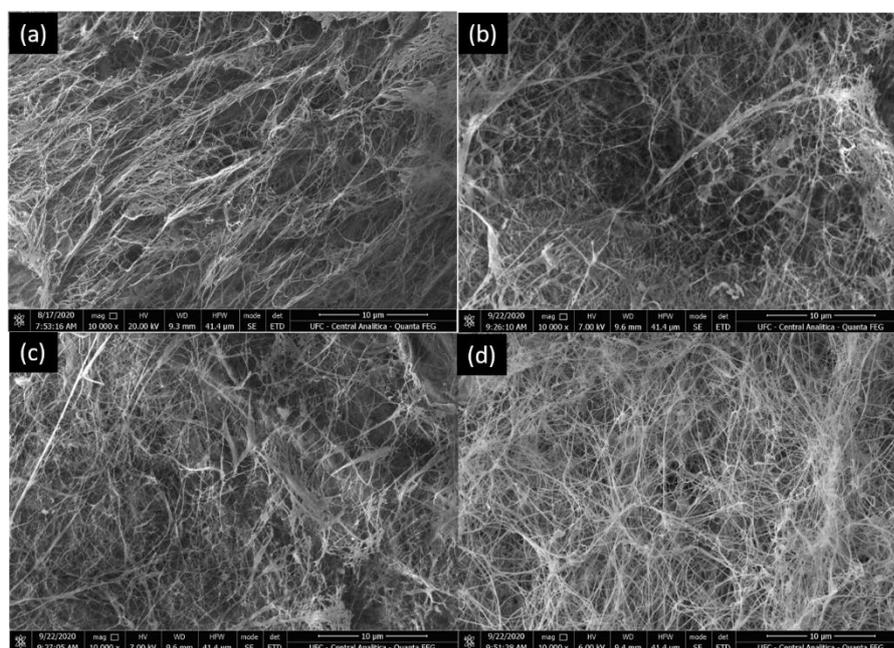
similares de capacidade de absorção de água (Tabela 6) para as amostras de HSKx. Já para as amostras de *K. hansenii* (HSKh) essa mudança é mais perceptível do 8º para o 10º dia de fermentação. Esse padrão corrobora com os dados obtidos nos ensaios mecânicos onde as propriedades mecânicas das amostras HSKx aumentam com o tempo de fermentação e os dados obtidos para as amostras de HSKh só apresentam aumento significativo do 8º para o 10º dia de fermentação (AMASON *et al.*, 2020). O tempo de fermentação não apresentou um efeito de tendência aparente na espessura das fibras das amostras de CB, para ambas as bactérias.

Figura 17 – Micrografias da rede nanofibrilada das membranas de CB obtidas nos meios com o microrganismo *K. xylinus* ATCC 53582 com 4, 6, 8 e 10 dias de fermentação (aumento de 10000x).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18 – Micrografias da rede nanofibrilada das membranas de CB obtidas nos meios com o microrganismo *K. hansenii* ATCC 23769 com 4, 6, 8 e 10 dias de fermentação (aumento de 10000x)



Fonte: Elaborado pelo autor

5.10 Análise estatística multivariada (Quimiometria)

Quimiometria é a combinação da matemática, da estatística e de outros métodos baseados em lógica para interpretar dados de origem química, entretanto essa técnica pode ser aplicada a dados de diversas origens (biológicas, físicas, etc...) (HASWELL, 1992). A quimiometria é baseada em uma avaliação estatística multivariada que possibilita detectar a variabilidade amostral, bem como as correlações entre as amostras e variáveis experimentais.

Visando extrair a maior quantidade de informações possíveis dos dados obtidos, bem como as correlações entre amostras e variáveis, nesse trabalho, uma análise estatística multivariada foi desenvolvida para algumas das caracterizações realizadas nas amostras de estudo (capacidade de absorção de água, ensaios mecânicos, termoporometria e FTIR). A análise quimiométrica foi viável devido ao grande número de repetições (GRANATO *et al.*, 2018).

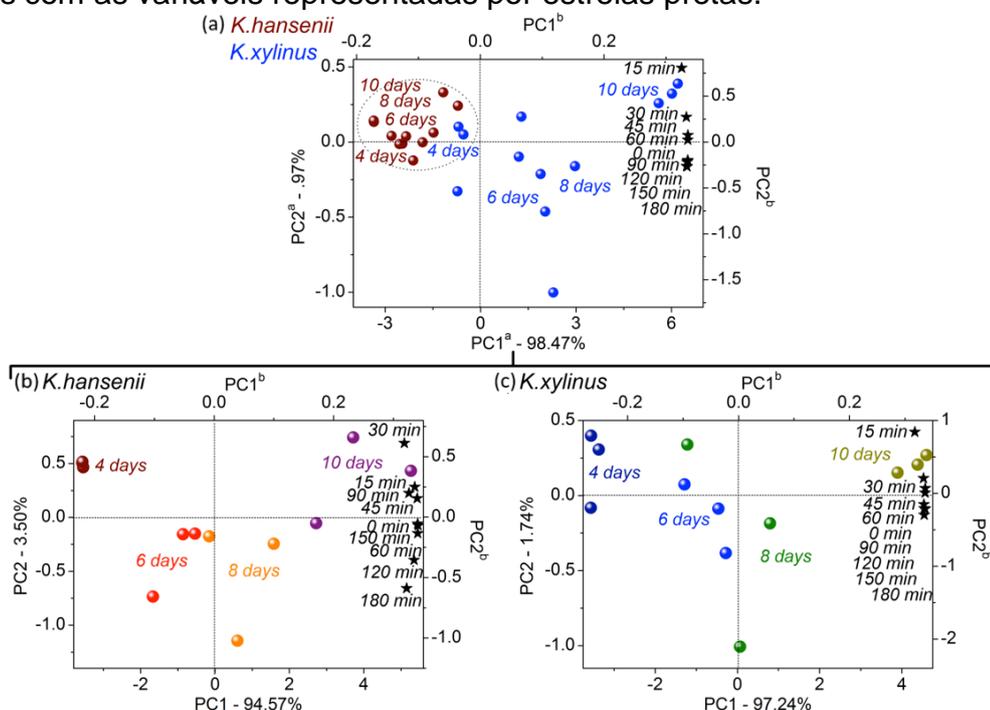
Com base nos dados, foi desenvolvida para cada amostra a análise multivariada não-supervisionada por PCA (análise de componentes principais), que é usada para encontrar padrões e tendências nos dados analisados e expressar

esses dados de forma que se dê ênfase às correlações entre amostras e variáveis experimentais. A PCA divide uma matriz muito grande de dados em matrizes menores, ou seja, reduz a dimensionalidade dos dados, baseando-se em suas semelhanças e diferenças e definindo um número limitado de componentes principais (PCs) que retenham a maior parte das informações dos dados. Quando três ou mais variáveis são estudadas, a PCA facilita a visualização da variabilidade amostra de uma forma mais eficiente, sem perda de informações relevantes (KAMAL-ELDIN; ANDERSSON, 1997).

5.10.1 Capacidade de Absorção de Água

A análise quimiométrica para capacidade de absorção de água foi aplicada em todas as amostras estudadas levando em consideração os seguintes tempos de absorção de água: 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 min. A Figura 19 mostra os gráficos de *scores* e *loadings* de PC1 x PC2 resultantes de análise de PCA para a capacidade de absorção de água das amostras produzidas com os dois microrganismos.

Figura 19 – Sistema de coordenadas de PCA para a avaliação da capacidade de absorção de água nos tempos de 0 a 180 min, para as CBs produzidas com *K. hansenii* e *K. xylinus* em 4, 6, 8 e 10 dias de fermentação: (a) CBs de ambas as bactérias, (b) apenas CB produzida com *K. hansenii* (HSK_h) e (c) apenas CB produzida com *K. xylinus*. ^aeixos referentes aos scores; ^beixos referentes aos loadings com as variáveis representadas por estrelas pretas.



Fonte: elaborado pelo autor

Observando a Figura 19a, as amostras produzidas com *K. xylinus* (em azul) apresentaram absorção de água mais expressiva independentemente dos tempos de fermentação (4 a 10 dias) e análise (0 a 180 min), corroborando com a discussão presente no item 5.6. Além disso, as amostras de 4 dias para *K. xylinus* aglomeraram com as amostras de *K. hansenii* em scores negativos de PC1, o que indica uma similaridade entre essas amostras, comportamento esse, que não foi possível observar sem a análise quimiométrica. CBs produzidas com *K. hansenii* (em vermelho) apresentaram características de absorção de água muito mais semelhantes (agrupamento conciso) entre os tempos de fermentação do que as amostras de *K. xylinus*.

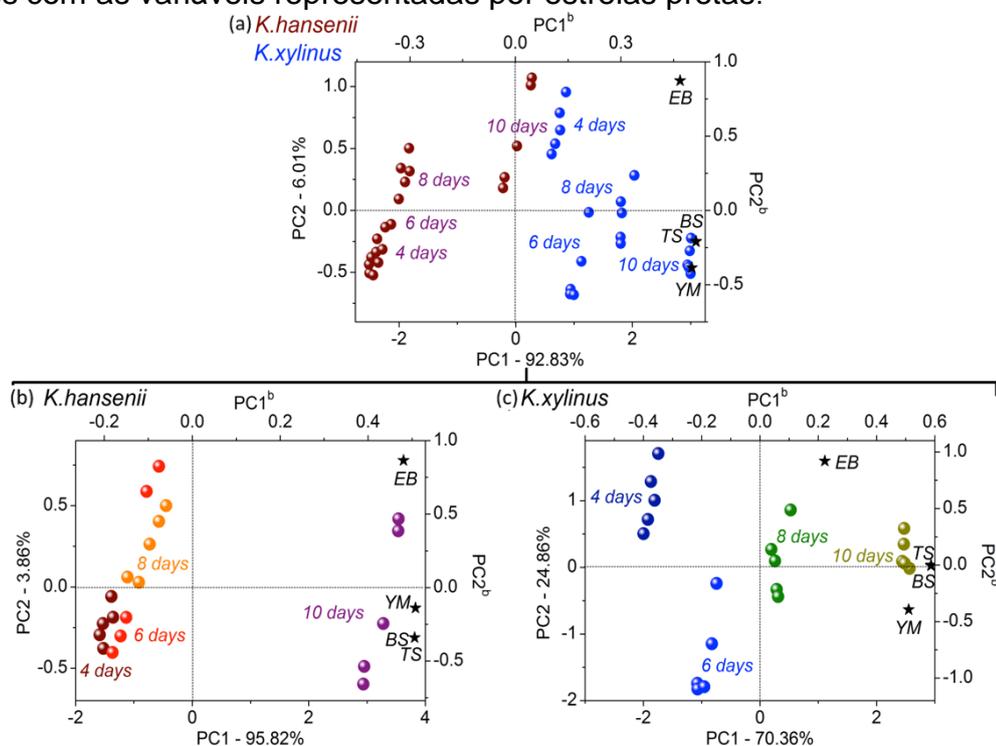
Depois da comparação feita entre as amostras produzidas com os dois microrganismos, avaliações de PCA mais detalhadas para cada microrganismo foram desenvolvidas (Figura 19b e 19c). Esse detalhamento mostra o aumento da absorção de água com o tempo de fermentação para os dois microrganismos (independente do tempo de absorção), aumento esse que foi estatisticamente

expressivo com a análise de variância (item 5.6). Ainda a análise de PCA permitiu a identificação de uma tendência de maior absorção de água nos tempos iniciais de análise (15 – 45 min) para as amostras de 10 dias dos dois microrganismos.

5.10.2 Ensaios Mecânicos

A análise quimiométrica para os ensaios mecânicos foi aplicada em todas as amostras estudadas levando em consideração os seguintes parâmetros: módulo de Young (YM), tensão máxima (TS), tensão na ruptura (BS) e alongação na ruptura (EB). A Figura 20 mostra os gráficos de *scores* e *loadings* de PC1 x PC2 resultantes de análise de PCA para os ensaios mecânicos das amostras produzidas com os dois microrganismos.

Figura 20 – Sistema de coordenadas de PCA para a avaliação dos ensaios mecânicos relacionados com módulo de Young (YM), tensão máxima (TS), tensão na ruptura (BS) e alongação na ruptura (EB) para as CBs produzidas com *K. hansenii* e *K. xylinus* em 4, 6, 8 e 10 dias de fermentação: (a) CBs de ambas as bactérias, (b) apenas CB produzida com *K. hansenii* (HSKh) e (c) apenas CB produzida com *K. xylinus*. ^aeixos referentes aos *scores*; ^beixos referentes aos *loadings* com as variáveis representadas por estrelas pretas.



Fonte: elaborado pelo autor

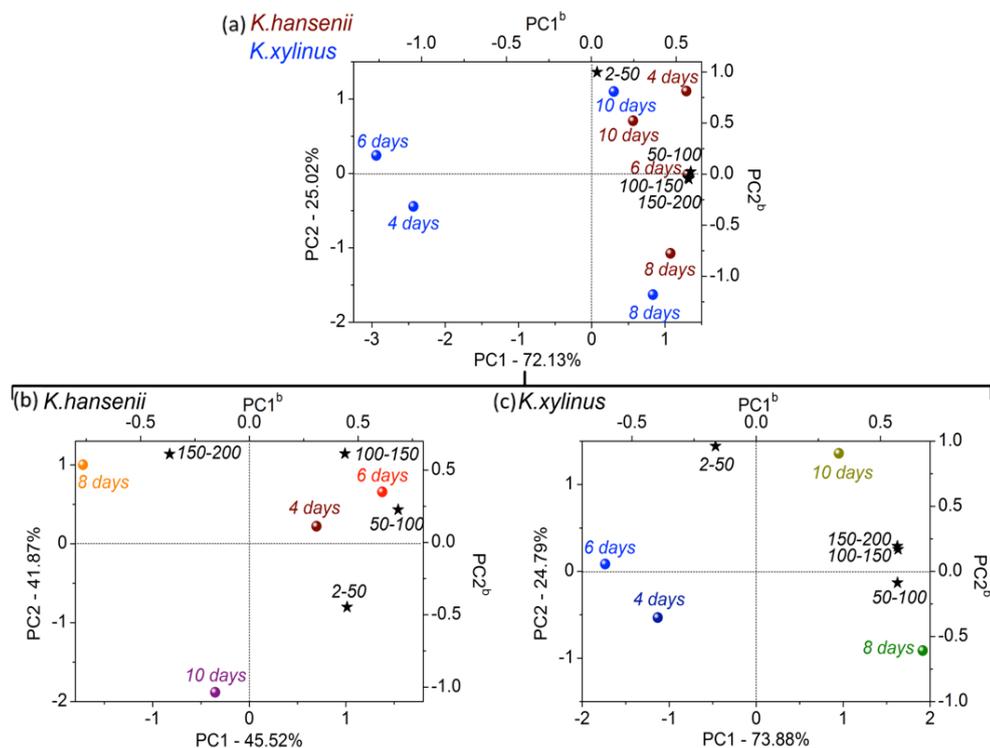
A Figura 20a, mostrando a análise de PCA para os dois microrganismos revela os valores elevados de módulo de Young (YM), tensão máxima (TS), tensão na ruptura (BS) e alongação na ruptura (EB) para as amostras de *K. xylinus* (em azul), quando comparadas as amostras de *K. hansenii* (em vermelho), corroborando com os resultados expostos no item 5.5. O eixo de PC1 evidencia o aumento conjunto de todos os parâmetros (YM, TS, BS e EB) com o aumento do tempo de fermentação (4 a 10 dias), independente da cepa de microrganismo.

Depois de da comparação feita entres as amostras produzidas com os dois microrganismos, avaliações de PCA mais detalhadas para cada microrganismo foram desenvolvidas (Figura 20b e 20c), visando avaliar informações particulares de cada bactéria com relação as propriedades mecânicas. Essa análise mais detalhada evidencia que apesar de ocorrer um aumento das propriedades com o tempo esse aumento só se mostra expressivo para a *K. hansenii* no 10º dia de fermentação, uma vez que os dias 4 a 8 se apresentam muito agrupados. Já para a *K. xylinus* os parâmetros mecânicos aumentam de forma mais relevante com o tempo de fermentação.

5.10.3 Termoporometria

A análise quimiométrica para os dados de termoporometria foi desenvolvida para todas as amostras estudadas levando em consideração os intervalos de diâmetro de 2 – 50 nm, 50 – 100 nm, 100 – 150 nm e 150 – 200 nm. A Figura 21 mostra os gráficos de *scores* e *loadings* de PC1 x PC2 resultantes de análise de PCA para os dados de termoporometria das amostras produzidas com os dois microrganismos.

Figura 21 – Sistema de coordenadas de PCA para a avaliação da porosidade nos intervalos 2 – 50 nm, 50 – 100 nm, 100 – 150 nm e 150 – 200 nm para as CBs produzidas com *K. hansenii* e *K. xylinus* em 4, 6, 8 e 10 dias de fermentação: (a) CBs de ambas as bactérias, (b) apenas CB produzida com *K. hansenii* (H SKh) e (c) apenas CB produzida com *K. xylinus*. ^aeixos referentes aos scores; ^beixos referentes aos *loadings* com as variáveis representadas por estrelas pretas.



Fonte: elaborado pelo autor

A análise quimiométrica dos dados de termoporometria nos permitiu extrair informações que com apenas o gráfico de barras presente no tópico 5.7 não seriam possíveis de extrair. Na Figura 21a é possível observar os valores de porosidade mais expressivos para as amostras de *K. hansenii* (em vermelho), independente do diâmetro de poro e do tempo de fermentação. Para as amostras de *K. xylinus* (em azul) os dias 4 e 6 apresentaram os valores menos expressivos de porosidade, independente do diâmetro de poro. Uma similaridade entre as amostras de 8 dias e 10 dias dos dois microrganismos pode ser observada devido ao agrupamento dessas amostras no gráfico.

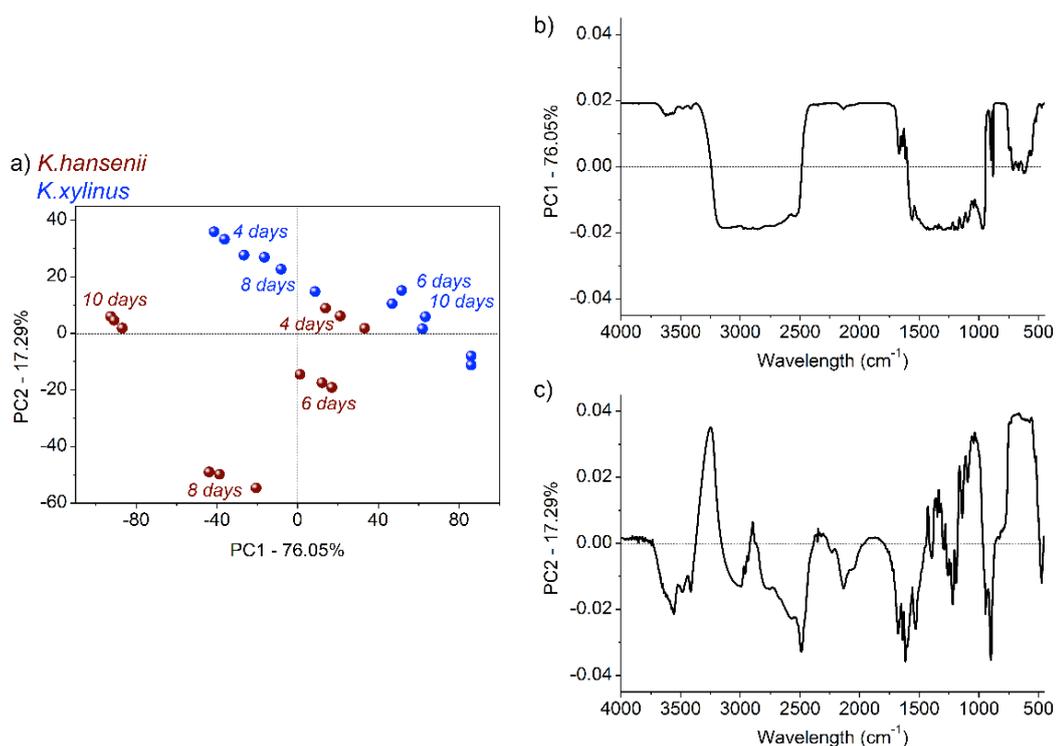
Uma PCA mais detalhada foi desenvolvida para cada microrganismo separadamente (Figuras 21b e 21c). Na Figura 21b pode se observar, para as amostras de *K. hansenii*, um aumento do tamanho de poros de 4 e 6 dias (2 – 150 nm) para 8 e 10 dias (150 – 200 nm). Para a *K. xylinus* esse aumento também foi

observado com uma pequena diferença, saindo de 2 – 50 nm em 4 e 6 dias para 50 – 200 nm em 8 e 10 dias de fermentação.

5.10.4 Espectroscopia de infravermelho

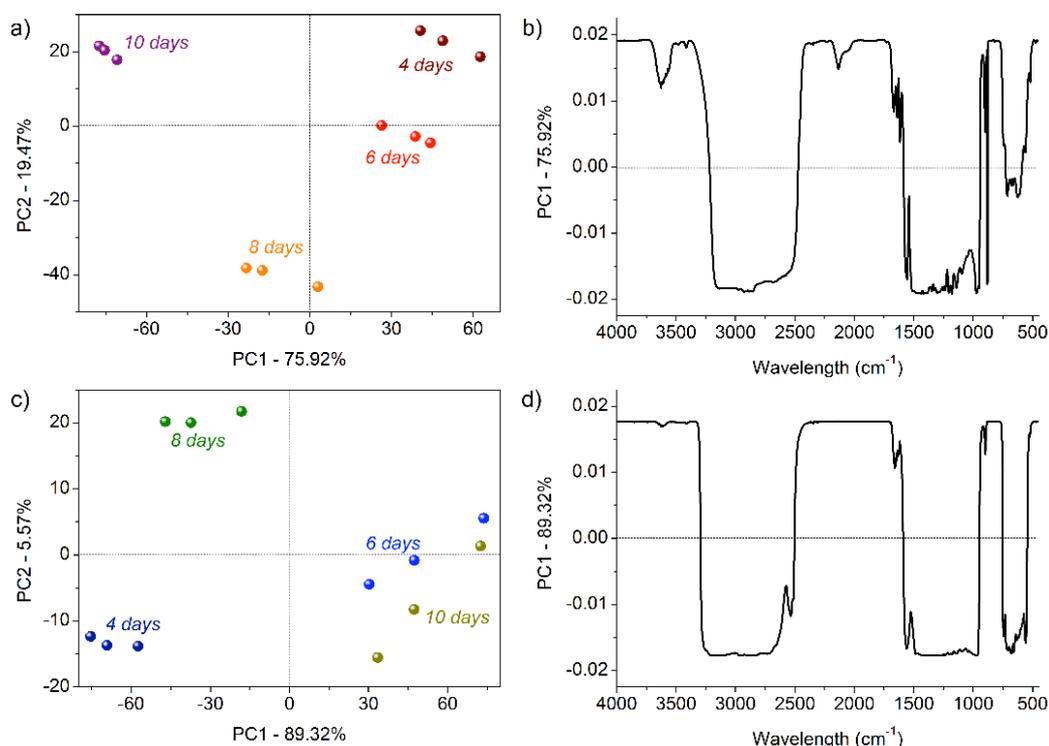
A Figura 22 ilustra o gráfico PC1 x PC2 de scores (a) e seus respectivos valores de *loadings* (b) para a avaliação dos espectros de infravermelho das amostras dos dois microrganismos. Também para a melhor avaliação dos dados as amostras de cada microrganismo foram avaliadas separadamente (Figura 23).

Figura 22 – Resultados da PCA dos dados de FTIR das amostras de CB produzidas com *K. hansenii* (em vermelho) e *K. xylinus* (em azul). O gráfico de scores (a) está apresentado em duas dimensões (PC1 x PC2) e os *loadings* estão apresentados na forma de linhas para os eixos PC1 (b) e PC2 (c).



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 23 – Gráfico de *scores* (PC1 x PC2) dos dados de FTIR das amostras de *K. hansenii* (a) com os *loadings* relevantes plotados em forma de linha (b). Gráfico de *scores* PC1 x PC2 para as amostras de *K. xylinus* (c) com os *loadings* relevantes plotados em forma de linha (d)



Fonte: elaborado pelo autor

Os resultados de PCA para as amostras das duas bactérias juntas (Figura 22a) evidenciam um menor efeito do tempo de fermentação (maior agrupamento) nas amostras de *K. xylinus* do que nas amostras de *K. hansenii*. As bandas de absorção entre 970 e 1600 cm^{-1} e 2500 e 3250 cm^{-1} (Figura 22b e 22c) apresentaram crescimento constante com o tempo de fermentação para as amostras de *K. hansenii* (em vermelho).

As bandas que se encontram nesses intervalos e que são aparentes nos espectros no tópico 5.3, estão relacionadas com bandas típicas de carboidratos (1060 cm^{-1} , 1300 cm^{-1} , 1430 cm^{-1}) e com bandas referentes aos estiramentos – CH e – CH₂ de alcanos (2890 cm^{-1}) e o estiramento dos grupos hidroxila (3200 – 3500 cm^{-1}). O aumento dessas bandas nas amostras de HSKh (*K. hansenii*) pode se dar ao fato do aumento significativo de produção durante os dias de fermentação para as amostras de HSKh, aumentando assim a quantidade de cadeias carbônicas e interações de hidrogênio presentes na amostra (GAO, H. *et al.*, 2020; GÜZEL; ÖZLEM, 2019).

A PCA detalhada para o FTIR das amostras de cada bactéria (Figura 23a e 23c) enfatizam o comportamento inverso das amostras de CB de cada microrganismo em relação ao tempo de fermentação. Figura 23b e 23d destacam a banda de absorção entre 500 e 750 cm^{-1} que foi maior para a amostra HSKh 10d (*K. hansenii*, 10 dias) e HSKx 4d (*K. xylinus*, 4 dias)

6 CONCLUSÕES

O aumento do tempo de fermentação influenciou diretamente a porosidade, a resistência mecânica, a densidade da rede de fibras e o grau de polimerização das amostras de celulose bacteriana, independente da cepa utilizada. Com exceção da composição química e da estabilidade térmica, o tipo de cepa selecionada para a produção de celulose bacteriana influenciou nas propriedades das películas obtidas. Como a cepa e o tempo de fermentação foram efetivamente influentes nas propriedades da celulose bacteriana, estratégias de estudo e controle dos mesmos podem ser desenhadas para manipular as propriedades da celulose bacteriana visando diferentes tipos de aplicação.

REFERÊNCIAS

- ALGAR, I. *et al.* Pineapple agroindustrial residues for the production of high value bacterial cellulose with different morphologies. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 1, p. 1–8, 2014.
- ALTANER, C. *et al.* How cellulose stretches: Synergism between covalent and hydrogen bonding. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 3, p. 791–798, 2014.
- AMASON, A. C. *et al.* Effect of Atomized Delivery of Nutrients on the Growth Characteristics and Microstructure Morphology of Bacterial Cellulose. **Biomacromolecules**, v. 21, n. 2, p. 508–516, 2020.
- ANDRIANI, D.; APRIYANA, A. Y.; KARINA, M. **The optimization of bacterial cellulose production and its applications: a review**. v. 27, p. 6744-6766, 2020.
- ANDRITSOU, V. *et al.* Synthesis and Characterization of Bacterial Cellulose from Citrus-Based Sustainable Resources. **ACS Omega**, v. 3, p. 10365-10373, 2018.
- AUGIMERI, R. V.; STRAP, J. L. The phytohormone ethylene enhances cellulose production, regulates CRP/FNRKx transcription and causes differential gene expression within the bacterial cellulose synthesis operon of *Komagataeibacter (Gluconacetobacter) xylinus* ATCC 53582. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–19, 2015.
- AZEREDO, H. M. C. *et al.* Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 3, 2019.
- AZEREDO, H. M. C. Bacterial cellulose for food applications. **International Journal of Advances in Medical Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 1–2, 2018.
- BADSHAH, M. *et al.* Surface modification and evaluation of bacterial cellulose for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 526–533, 2018.
- BANDYOPADHYAY, S.; SAHA, N.; SAHA, P. Characterization of Bacterial Cellulose Produced using Media Containing Waste Apple Juice 1. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 649–657, 2018
- BARNHART, D. M. *et al.* CelR, an ortholog of the diguanylate cyclase PleD of caulobacter, regulates cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 23, p. 7188–7202, 2013.
- BLANCO, A. *et al.* **Nanocellulose for industrial use: Cellulose nanofibers (CNF), cellulose nanocrystals (CNC), and bacterial cellulose (BC)**. Capítulo 5, Elsevier Inc., 2018.
- BOZTUĞ, A.; BASAN, S. Characterization and synthesis of maleic anhydride-styrene-vinyl acetate terpolymer ester derivatives. **Journal of Materials Science**, v.

39, n. 22, p. 6843–6846, 2004.

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

ÇAKAR, F. *et al.* Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, n. 1, p. 7–13, 2014.

CAMPANO, C. *et al.* Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 57–91, 2016.

CAO, Y.; LU, S.; YANG, Y. Production of bacterial cellulose from byproduct of citrus juice processing (citrus pulp) by *Gluconacetobacter hansenii*. **Cellulose**, v. 25, n. 12, p. 6977–6988, 2018.

CASTRO, C. *et al.* Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter* genus. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1033–1037, 2012.

CHAGAS, B. S. **Produção de celulose bacteriana em meio à base de melaço de soja em cultivo estático**. 89 f. - Universidade Federal do Ceará, 2018.

CHAWLA, P. R. *et al.* Microbial cellulose: Fermentative production and applications (Review). **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107–124, 2009.

CHEN, G. *et al.* Scale-up of production of bacterial nanocellulose using submerged cultivation. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 93, n. 12, p. 3418–3427, 2018.

CHEN, S. *et al.* Mechanical properties of bacterial cellulose synthesised by diverse strains of the genus *Komagataeibacter*. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 87–95, 2018.

CHEN, S. Q. *et al.* Mechanical properties of bacterial cellulose synthesised by diverse strains of the genus *Komagataeibacter*. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 87–95, 2018.

CHOI, S. M.; SHIN, E. J. The Nanofication and Functionalization of Bacterial Cellulose and Its Applications. **Nanomaterials**, v. 10, n. 3, p. 406, 2020.

COLLADO, L. *et al.* *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1391–1396, 2009.

COSTA, A. F. S. *et al.* Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using corn steep liquor as nutrient sources. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–12, 2017.

COSTA, R. T. **Estudo físico-químico de copolíéteres por viscosimetria**. 102 f. - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2009.

- CZAJA, W. *et al.* The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2007.
- CZAJA, Wojciech *et al.* Microbial cellulose - The natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145–151, 2006.
- DEMUNER, I. F. **Produção e caracterização de lignocelulose nanofibrilada (LCNF) e celulose nanofibrilada (CNF) e aplicação de LCNF na manufatura de papéis de embalagem nanoestruturados**. 98 f. 2017.
- DHAR, P. *et al.* Valorization of sugarcane straw to produce highly conductive bacterial cellulose / graphene nanocomposite films through in situ fermentation: Kinetic analysis and property evaluation. **Journal of Cleaner Production**, v. 238, p. 117859, 2019.
- DU, R. *et al.* Production and characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* isolated from Chinese persimmon vinegar. **Carbohydrate Polymers**, v. 194, p. 200–207, 2018
- E. P. ÇOBAN, H. B. Evaluation of different pH and temperatures for bacterial cellulose production in HS (Hestrin-Scharmm) medium and beet molasses medium. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 9, p. 1037–1045, 2011.
- FIEDLER, S.; FÜSSEL, M.; SATTLER, K. Production and application of bacterial cellulose. I. A survey on state of research and investigations concerning fermentation kinetics. **Microbiological Research**, v. 144, n. 7, p. 473–484, 1989.
- FRENCH, A. D.; SANTIAGO CINTRÓN, M. Cellulose polymorphy, crystallite size, and the Segal Crystallinity Index. **Cellulose**, v. 20, n. 1, p. 583–588, 2013.
- FULLER, M. E.; ANDAYA, C.; MCCLAY, K. Evaluation of ATR-FTIR for analysis of bacterial cellulose impurities. **Journal of Microbiological Methods**, v. 144, p. 145–151, 2018.
- GAO, H. *et al.* Comparison of bacterial nanocellulose produced by different strains under static and agitated culture conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 227, p. 1–8, 2020.
- GAO, M. *et al.* A natural in situ fabrication method of functional bacterial cellulose using a microorganism. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.
- GARCÍA, B. *et al.* Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 264–277, 2004.
- GEA, S. *et al.* Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9105–9110, 2011
- GRANATO, D. *et al.* Trends in Chemometrics: Food Authentication, Microbiology,

and Effects of Processing. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 3, p. 663–677, 2018.

GUPTA, P. *et al.* An Update on Overview of Cellulose, Its Structure and Applications. **IntechOpen**, v. 1, p. 1 - 21, 2019.

GÜZEL, M.; ÖZLEM, A. Production and Characterization of Bacterial Cellulose from Citrus Peels. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, p. 2165–2175, 2019.

HASWELL, S. J. **Introduction to Chemometrics**. New York: Marcel Dekker Inc, 1992.

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

HIRAI, A.; TSUJI, M.; HORII, F. TEM study of band-like cellulose assemblies produced by *Acetobacter xylinum* at 4 °C. **Cellulose**, v. 9, n. 2, p. 105–113, 2002.

HUANG, C. *et al.* Using wastewater after lipid fermentation as substrate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 198–202, 2016

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, a. Bacterial cellulose — a masterpiece of nature 's arts. **Journal of Materials Science**, v. 35, p. 261–270, 2000.

ILLA, M. P.; SHARMA, C. S.; KHANDELWAL, M. Tuning the physiochemical properties of bacterial cellulose: effect of drying conditions. **Journal of Materials Science**, v. 54, n. 18, p. 12024–12035, 2019.

JACEK, P. *et al.* Modification of bacterial nanocellulose properties through mutation of motility related genes in *Komagataeibacter hansenii* ATCC 53582. **New Biotechnology**, v. 52, n. May 2018, p. 60–68, 2019.

JONAS, R.; FARAH, L. F. Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1–3, p. 101–106, 1998.

JUNG, H. II *et al.* Influence of glycerol on production and structural-physical properties of cellulose from *Acetobacter* sp. V6 cultured in shake flasks. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 10, p. 3602–3608, 2010.

KAMAL-ELDIN, A.; ANDERSSON, R. A multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 4, p. 375–380, 1997.

KESHK, S. Vitamin C enhances bacterial cellulose production in *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 98–100, 2014.

KESHK, S.; SAMESHIMA, K. Influence of liginosulfonate on crystal structure and productivity of bacterial cellulose in a static culture. **Enzyme and Microbial**

Technology, v. 40, n. 1, p. 4–8, 2006.

KHANDELWAL, M.; WINDLE, A. H. Hierarchical organisation in the most abundant biopolymer-cellulose. *In:* , 2013. **Materials Research Society Symposium Proceedings**. v. 25, p. 16–21, 2013.

KLEMM, D. *et al.* Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.

KLEMM, Dieter *et al.* Bacterial synthesized cellulose - Artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 26, n. 9, p. 1561–1603, 2001.

KRYSTYNOWICZ, A. *et al.* Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 189–195, 2002.

KUMAR, R. *et al.* Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 17, p. 3948–3962, 2009.

LAMPUGNANI, E. R. *et al.* Cellulose Synthesis – Central Components and Their Evolutionary Relationships. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 5, p. 402–412, 2019.

LANDRY, M. R. Thermoporometry by differential scanning calorimetry: Experimental considerations and applications. **Thermochimica Acta**, v. 433, n. 1–2, p. 27–50, 2005.

LANGAN, P. *et al.* Common processes drive the thermochemical pretreatment of lignocellulosic biomass. **Green Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 63–68, 2014.

LAVOINE, N. *et al.* Microfibrillated cellulose - Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 2, p. 735–764, 2012.

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

LEE, Koon Yang *et al.* More than meets the eye in bacterial cellulose: Biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, n. 1, p. 10–32, 2014.

LIMA, H. L. S. *et al.* Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 using sisal juice - an agroindustry waste. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 3, p. 671–680, 2017.

MAEDA, H. *et al.* Bacterial cellulose/silica hybrid fabricated by mimicking biocomposites. **Journal of Materials Science**, v. 41, n. 17, p. 5646–5656, 2006.

MOLINA-RAMÍREZ, C. *et al.* Physical Characterization of Bacterial Cellulose Produced by *Komagataeibacter medellinensis* Using Food Supply Chain Waste and Agricultural By-Products as Alternative Low-Cost Feedstocks. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 2, p. 830–837, 2018.

MOURA, J. M. *et al.* **Análise da eficiência energética em segmentos industriais selecionados: segmento celulose e papel.** , 2018.

NASCIMENTO, D. M. **Nanocomposites hydrogels based on nanocellulose for applications in agriculture.** 160 f. Universidade Federal do Ceará, 2019.

NASCIMENTO, E. . *et al.* Mesquite (*Prosopis juliflora* (Sw.)) Extract is an Alternative Nutrient Source for Bacterial Cellulose Production. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 10, n. 8, p. 63–70, 2016.

NASCIMENTO, E. S. *et al.* TEMPO oxidation and high-speed blending as a combined approach to disassemble bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 26, n. 4, p. 2291–2302, 2019.

NATA DE COCO a. Available at: shorturl.at/hxT13. Acesso em: 11 nov. 2019.

NATA DE COCO b. Available at: shorturl.at/drOS1. Acesso em: 11 nov. 2019.

ORSOLINI, P. **Porous nanofibrillated cellulose functional materials.** 169 f. 2017. - Università degli Studi di Roma La Sapienza, 2017.

PACHECO, G. *et al.* Development and characterization of bacterial cellulose produced by cashew tree residues as alternative carbon source. **Industrial Crops and Products**, v. 107, p. 13–19, 2017.

PECORARO, E. *et al.* Bacterial Cellulose from *Gluconacetobacter xylinus*: Preparation, Properties and Applications. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources - Elsevier**, v. Cap 17, n. 1, p. 369–383, 2008.

PHISALAPHONG, M.; JATUPAIBOON, N. Biosynthesis and characterization of bacteria cellulose-chitosan film. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 482–488, 2008.

RAGHUNATHAN, D. Production of microbial cellulose from the new bacterial strain isolated from temple wash waters. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, n. 12, p. 275–290, 2013.

RANI, M. U.; APPAIAH, A. Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production from *Gluconacetobacter hansenii* UAC09. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 781–787, 2011.

ROBLEDO, M. *et al.* Role of *Rhizobium* endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 1–12, 2012.

ROJO, E. *et al.* Comprehensive elucidation of the effect of residual lignin on the

physical, barrier, mechanical and surface properties of nanocellulose films. **Green Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 1853–1866, 2015.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 35–58, 1991.

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.

SAIBUATONG, O.; PHISALAPHONG, M. Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 455–460, 2010.

SEAGAL, L. *et al.* An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. v. 15, p. 786–794, 1959.

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

SHEYKHNAZARI, S. *et al.* Multilayer bacterial cellulose/resole nanocomposites: Relationship between structural and electro-thermo-mechanical properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2115–2122, 2018.

SHI, Q. S. *et al.* Effect of different conditions on the average degree of polymerization of bacterial cellulose produced by *gluconacetobacter intermedius* BC-41. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 47, n. 7–8, p. 503–508, 2013.

SHINODA, R. *et al.* Relationship between length and degree of polymerization of TEMPO-oxidized cellulose nanofibrils. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 3, p. 842–849, 2012.

SIMON, J. *et al.* Thermoplastic and biodegradable polymers of cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1–3, p. 107–115, 1998.

SINGHSA, P.; NARAIN, R.; MANUSPIYA, H. Physical structure variations of bacterial cellulose produced by different *Komagataeibacter xylinus* strains and carbon sources in static and agitated conditions. **Cellulose**, v. 25, n. 3, p. 1571–1581, 2018.

SINGHSA, Pratyawadee; NARAIN, R.; MANUSPIYA, H. Physical structure variations of bacterial cellulose produced by different *Komagataeibacter xylinus* strains and carbon sources in static and agitated conditions. **Cellulose**, v. 25, n. 3, p. 1571–1581, 2018.

SIQUEIRA, G.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Cellulosic bionanocomposites: A review of preparation, properties and applications. **Polymers**, v. 2, n. 4, p. 728–765, 2010.

SON, H. J. *et al.* 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, p. 1–5, 2001.

STEPANOV, N.; EFREMENKO, E. “Deceived” Concentrated Immobilized Cells as Biocatalyst for Intensive Bacterial Cellulose Production from Various Sources. **Catalysts**, v. 8, n. 1, 2018.

SURMA-ŚLUSARSKA, B.; PRESLER, S.; DANIELEWICZ, D. Characteristics of bacterial cellulose obtained from *Acetobacter Xylinum* culture for application in papermaking. **Fibres and Textiles in Eastern Europe**, v. 16, n. 4, p. 108–111, 2008.

TABUCHI, M. Nanobiotech versus synthetic nanotech ? **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 25, n. 4, p. 389–390, 2007.

TSOUKO, E. *et al.* Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 14832–14849, 2015.

UL-ISLAM, M. *et al.* Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 1166–1173, 2017.

ULLAH, H. *et al.* Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 330–352, 2016.

VASCONCELOS, N. F. *et al.* Bacterial cellulose nanocrystals produced under different hydrolysis conditions: Properties and morphological features. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 425–431, 2017.

VAZQUEZ, A. *et al.* Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by *Gluconacetobacter xylinus*. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 2, p. 545–554, 2013.

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

WANG, S. *et al.* Insights into bacterial cellulose biosynthesis from different carbon sources and the associated biochemical transformation pathways in *Komagataeibacter* sp. W1. **Polymers**, v. 10, p. 9-15, 2018.

WILLIAMS, W. S.; CANNON, R. E. Alternative Environmental Roles for Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 10, 1989.

WU, M. *et al.* Valorizing kitchen waste through bacterial cellulose production towards a more sustainable biorefinery. **Science of the Total Environment**, v. 695, p. 133-140, 2019.

YANG, Y. *et al.* Isolation and characteristics analysis of a novel high bacterial cellulose producing strain *Gluconacetobacter intermedius* Cls26. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 2012–2017, 2013.

YE, J. *et al.* Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* ATCC 23767 using tobacco waste extract as culture medium. **Bioresource Technology**, v. 274, p. 518–524, 2019.

ZHAO, H. *et al.* Production of bacterial cellulose using polysaccharide fermentation wastewater as inexpensive nutrient sources. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 32, n. 2, p. 350–356, 2018.

ZMEJKOSKI, D. *et al.* Bacterial cellulose-lignin composite hydrogel as a promising agent in chronic wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 118, p. 494–503, 2018.