



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**  
**REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA (RENORBIO)**

**DARLYSON TAVARES GUIMARÃES**

**PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA DE ALTA ABSORÇÃO UTILIZANDO  
RESÍDUO DE PROCESSAMENTO DE CAJU**

**FORTALEZA**

**2023**

DARLYSON TAVARES GUIMARÃES

PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA DE ALTA ABSORÇÃO UTILIZANDO  
RESÍDUO DE PROCESSAMENTO DE CAJU

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutorado em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

Coorientadora: Dra. Ana Iraidy Santa Brígida.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

G977p Guimarães, Darlyson Tavares.

Produção de celulose bacteriana de alta absorção utilizando resíduo de processamento de caju / Darlyson Tavares Guimarães. – 2023.

111 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

Coorientação: Profa. Dra. Ana Iraidy Santa Brígida.

1. Retido de microfiltração. 2. Processo estático. 3. Komagatacibacter. 4. Biopolímero superabsorvente.  
I. Título.

CDD 660.6

---

DARLYSON TAVARES GUIMARÃES

PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA DE ALTA ABSORÇÃO UTILIZANDO  
RESÍDUO DE PROCESSAMENTO DE CAJU

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutorado em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

Coorientadora: Dra. Ana Iraidy Santa Brígida.

Aprovada em: 26/05/2023

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC/DEQ)

---

Profa. Dra. Sueli Rodrigues  
Universidade Federal do Ceará (UFC/DEAL)

---

Prof. Dr. Tiago Lima de Albuquerque  
Universidade Federal do Ceará (UFC/DEAL)

---

Dra. Ticiane Cavalcante de Souza  
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-CE)

---

Profa. Dra. Tigressa Helena Soares Rodrigues  
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Dedico esta tese aos meus pais, Rubia e Djair.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e por toda força, saúde e coragem concedidas durante toda minha caminhada até aqui.

Aos meus pais, Djair e Rubia, que sempre são meus primeiros apoiadores em todas as escolhas que faço, por serem minha principal fortaleza e por não medirem esforços para contribuir nos meus objetivos de vida.

Ao meu irmão, Douglas, pelo apoio e parceria durante todos esses anos.

Ao Felipe por todo companheirismo e apoio nos momentos que eu tanto precisei.

A todos os meus amigos próximos e familiares que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À professora e orientadora Dra. Luciana Gonçalves por tamanha paciência, persistência e contribuições para minha formação, e por sempre transmitir tanta calma nos momentos que dificultaram essa jornada.

À pesquisadora Dra. Ana Iraidy Brígida pela dedicação e excelência na coorientação, e por estar disponível para ajudar sempre que precisei.

Aos professores e pesquisadores Dr. Ivanildo Júnior, Dra. Tigressa Helena, Dra. Morsyleide de Freitas, Dr. Tiago Albuquerque, Dra. Ticiane Cavalcante e Dra. Sueli Rodrigues pelo aceite do convite para participar das bancas e pelas contribuições para melhoria do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bioprocessos, Renata, Matheus, Sarah e Jessica, por somarem as alegrias e dividirem as angústias dos experimentos com fermentação, e pelas inúmeras ajudas sempre que precisei.

Aos amigos do GPBIO pelas ajudas, encontros, afetos e compartilhamento de momentos tão especiais.

Aos amigos do Laboratório de Análises de Alimentos, Ídila, Lavínia, Eclenia e Beatriz, pelas contribuições nos experimentos da primeira etapa do doutorado.

Ao Adriano Mattos e todos que fazem parte do Laboratório de Tecnologia da Biomassa, pelos momentos de descontração, pela união e por contribuírem na obtenção dos resultados experimentais desta tese.

À Embrapa Agroindústria Tropical que me acolheu e disponibilizou toda estrutura e apoio para realização do doutorado.

À Fiocruz Ceará pela assistência fornecida nos experimentos finais da pesquisa.

À Universidade Federal do Ceará e ao Departamento de Engenharia Química que me acolhem desde o mestrado.

A Rede Nordeste de Biotecnologia, por possibilitar a obtenção do título.

À FUNCAP pelo apoio financeiro durante todo o doutorado.

“Coragem. Gentileza. Amizade. Essas são as qualidades que nos definem como seres humanos e nos impulsionam, ocasionalmente, à grandeza.” (EXTRAORDINÁRIO, 2017).

## RESUMO

Celulose bacteriana (CB) é um biopolímero nanoestruturado que tem sido amplamente requisitado devido suas características intrínsecas de elevadas cristalinidade, hidrofiliçidade e resistência térmica e mecânica. Bactérias *Komagataeibacter* são os principais produtores potenciais de CB, mas que tem como fator limitante de produção em larga escala os altos custos envolvidos, principalmente os relacionados ao meio de cultivo, que representam até 65 % da despesa total da produção. Uma alternativa sustentável de viabilizar esse processo é o aproveitamento de subprodutos agroindustriais como fonte de carbono e nitrogênio. Neste estudo, o efluente residual da produção de cajuína (MRC) foi avaliado para produção de CB por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582, *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 e *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769, em comparação com o meio sintético HS (MHS). O bioprocessos foi conduzido em sistema estático em estufa BOD, entre 4 e 12 dias a 30 °C. As membranas de CB produzidas foram purificadas, neutralizadas e secas à 170 °C e submetidas a análises de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, termogravimetria, ensaios mecânicos, capacidade de absorção de água, microscopia eletrônica de varredura, grau de polimerização e difração de raios-X. O meio alternativo foi mais vantajoso para obtenção das membranas de CB do que o próprio meio sintético, possibilitando resultados de produção e produtividade equivalentes ou superiores. A maior produção de CB foi alcançada com *K. xylinus* ATCC 53582, com resultados equivalentes em MRC (3,1 g.L<sup>-1</sup>) e MHS (3 g.L<sup>-1</sup>). *K. hansenii* ATCC 23769 e *K. xylinus* ARS B42 apresentarem perfil de produção máxima semelhantes, com MRC (0,63 e 0,88 g.L<sup>-1</sup>) superior ao MHS (0,31 e 0,46 g.L<sup>-1</sup>). Em geral, as produtividades de CB decresceram após metade do tempo do cultivo, enquanto os rendimentos em relação ao consumo de substrato variou entre 2 e 45%. A utilização do meio alternativo contribuiu positivamente para as propriedades térmicas, físicas e estruturais da CB. MRC permite a produção de CB com alta capacidade de absorção de água quando comparado ao MHS. Apesar da menor produção obtida no MRC, a CB de *K. xylinus* ARS B42 apresentou alta resistência térmica (até 296,9°C) e excelente capacidade de retenção (14864 %), absorvendo até 285% mais água que a CB da cepa superprodutora, característica peculiar de biopolímero superabsorvente, com alta performance para aplicação em curativos, probióticos, cosméticos, embalagens, fármacos e outros processos da indústria.

**Palavras-chave:** retido da microfiltração; processo estático; *Komagataeibacter*; biopolímero superabsorvente.

## ABSTRACT

Bacterial cellulose (BC) is a nanostructured biopolymer that has been widely requested due to its intrinsic characteristics of high crystallinity, hydrophilicity and thermal and mechanical resistance. *Komagataeibacter* bacteria are the main potential producers of BC, but their limiting factor for large-scale production are the high costs involved, mainly those related to the culture medium, which represent up to 65% of the total production cost. A sustainable alternative to make this process viable is the use of agro-industrial by-products as a source of carbon and nitrogen. In this study, residual cashew juice effluent (MRC) was evaluated for BC production by *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582, *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 and *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769, compared to the synthetic medium HS (MHS). The bioprocess was carried out in static system in BOD oven, between 4 and 12 days at 30 °C. The BC membranes produced were purified, neutralized and dried at 170 °C and analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy, thermogravimetry, mechanical tests, water absorption capacity, scanning electron microscopy, degree of polymerization and X-ray diffraction. The alternative medium proved to be more advantageous for obtaining BC membranes than the synthetic medium itself, allowing equivalent or superior production and productivity results. The highest BC production was obtained with *K. xylinus* ATCC 53582, with equivalent results in MRC (3.1 g.L<sup>-1</sup>) and MHS (3 g.L<sup>-1</sup>). *K. hansenii* ATCC 23769 and *K. xylinus* ARS B42 showed a similar production profile, with MRC (0.63 and 0.88 g.L<sup>-1</sup>) higher than MHS (0.31 and 0.46 g.L<sup>-1</sup>). In general, BC productivity decreased after half of the cultivation time, while yields in relation to substrate consumption varied between 2 and 45%. The use of the alternative medium contributed positively to the thermal, physical and structural properties of BC. MRC allows the production of BC with high water absorption capacity when compared to MHS. Despite the lower production obtained in the MRC, the BC from *K. xylinus* ARS B42 showed high thermal resistance (up to 296.9 °C) and excellent retention capacity (14864 %), absorbing up to 285 % more water than the BC from the overproducer strain, peculiar characteristic of biopolymer superabsorbent, with high performance for application in dressings, probiotics, cosmetics, packaging, medicines and other industrial processes.

**Keywords:** microfiltration retentate; static process; *Komagataeibacter*; superabsorbent biopolymer.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Estrutura da celulose. a) Moléculas de glicose com ligações covalentes (linha contínua) e ligações de hidrogênio (linha tracejada); b) Microfibrilas de celulose com regiões cristalina e amorfa, formando agregados em fibras celulósicas; c) unidade de repetição fundamental da estrutura química de celulose, denominado celobiose ..... 25
- Figura 2 – Estruturas cristalinas da celulose tipo I, (a) triclinica e (b) monoclinica ..... 26
- Figura 3 – Esquema simplificado da principal via metabólica para biossíntese e formação de celulose bacteriana ..... 31
- Figura 4 – Fluxograma das etapas de produção de cajuína pela tecnologia das membranas de microfiltração, com geração de três efluentes principais: Permeado (cajuína), efluente retido na membrana (MR) e efluente diafiltrado (MD); e dois efluentes secundários: efluente retido centrifugado (MRC) e efluente diafiltrado centrifugado (MDC) ..... 41
- Figura 5 – Fluxograma geral das etapas experimentais para produção de CB em meio alternativo residual de cajuína. Etapa I: Caracterização físico-química dos meios, Etapa II: Bioprocessos para obtenção de CB e Etapa III: Caracterização de CB produzida ..... 42
- Figura 6 – Aspecto visual da membrana de CB produzida por *K xylinus* ATCC 53582 aos 10 dias de cultivo estático em meio residual de caju retido e centrifugado (MRC), antes (A) e após (B) etapa de purificação com NaOH 2% (m.v<sup>-1</sup>) e neutralização com água ..... 56
- Figura 7 – Produção (g.L<sup>-1</sup>) de membranas de celulose bacteriana em diferentes tempos de cultivo (4, 6, 8, 10 e 12 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC) por: A) *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (53), B) *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 (23) e C) *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (42) .... 57
- Figura 8 – Membranas úmidas de celulose bacteriana produzidas por A) *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (53), B) *Komagataeibacter*

	<i>hansenii</i> ATCC 23769 (23) e C) <i>Komagataeibacter xylinus</i> ARS B42 (42), em diferentes tempos de cultivo D (4, 6, 8, 10 e 12 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC) .....	60
Figura 9	– Percentual de açúcares consumidos (%) em função da produção de celulose bacteriana ( $\text{g.L}^{-1}$ ) por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (53), <i>Komagataeibacter hansenii</i> ATCC 23769 (23) e <i>Komagataeibacter xylinus</i> ARS B42 (42) em diferentes tempos de cultivo (4, 6, 8, 10 e 12 dias) e sistema estático em: A) meio residual de caju retido e centrifugado (MRC) e B) meio sintético HS (MHS) .....	65
Figura 10	– Produtividade ( $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) de membranas de celulose bacteriana em diferentes tempos de cultivo (4, 6, 8, 10 e 12 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC) por: A) <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (53), B) <i>Komagataeibacter hansenii</i> ATCC 23769 (23) e C) <i>Komagataeibacter xylinus</i> ARS B42 (42) ....	68
Figura 11	– Membranas úmidas de celulose bacteriana produzidas em diferentes tempos de cultivo (4, 6 e 8 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC) por: A) <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (53) e B) <i>Komagataeibacter xylinus</i> ARS B42 (42) .....	71
Figura 12	– Espectros de FTIR de membranas de celulose bacteriana produzidas em diferentes tempos de cultivo (4, 6 e 8 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC) por: A) <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (53) e B) <i>Komagataeibacter xylinus</i> ARS B42 (42) .....	73
Figura 13	– Termogramas e derivadas, respectivamente, de membranas de celulose bacteriana produzidas em diferentes tempos de cultivo D (4, 6 e 8 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC) por: (A e B) <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (53) e (C e D) <i>Komagataeibacter xylinus</i> ARS B42 (42), em atmosfera inerte ( $\text{N}_2$ ) .....	75

- Figura 14 – Membranas de celulose bacteriana produzidas em 8 dias de cultivo e sistema estático em meio residual de caju retido e centrifugado (MRC) por: *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (A e C) e *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (B e D), antes e depois do teste de capacidade de absorção de água ..... 80
- Figura 15 – Microscopia eletrônica de varredura de membranas de celulose bacteriana produzidas em diferentes tempos de cultivo (4, 6 e 8 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC) por: A) *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (53) e B) *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (42) ..... 82
- Figura 16 – Difratoogramas de membranas de celulose bacteriana produzidas em diferentes tempos de cultivo D (4, 6 e 8 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC) por: *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (A) e *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (B) ..... 86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Versatilidade de CB em diferentes campos de aplicação.....	28
Tabela 2 – Resíduos da agroindústria avaliados como meios de cultivo alternativos para produção de celulose bacteriana.....	37
Tabela 3 – Características físico-químicas de substratos residuais alternativos decorrentes do processo de produção de cajuína microfiltrada comercial e do meio sintético HS .....	52
Tabela 4 – Rendimento (%) e percentual de açúcares consumidos (%) no processo de obtenção de membranas de celulose bacteriana por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (53), <i>Komagataeibacter hansenii</i> ATCC 23769 (23) e <i>Komagataeibacter xylinus</i> ARS B42 (42) em diferentes tempos de cultivo (4, 6, 8, 10 e 12 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC).....	62
Tabela 5 – pH de meio após cultivo para produção de membranas de celulose bacteriana por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (53), <i>Komagataeibacter hansenii</i> ATCC 23769 (23) e <i>Komagataeibacter xylinus</i> ARS B42 (42) em diferentes tempos de cultivo (4, 6, 8, 10 e 12 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC).....	66
Tabela 6 – Umidade (%) de membranas de celulose bacteriana por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (53), <i>Komagataeibacter hansenii</i> ATCC 23769 (23) e <i>Komagataeibacter xylinus</i> ARS B42 (42) em diferentes tempos de cultivo (4, 6, 8, 10 e 12 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC).....	70
Tabela 7 – Temperatura inicial de degradação (°C), temperatura máxima de degradação (°C) e perda de massa por degradação (%) de membranas de celulose bacteriana produzidas por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (53) e <i>Komagataeibacter xylinus</i> ARS B42 (42) em diferentes tempos de cultivo D (4, 6 e 8 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC).....	76

Tabela 8 – Tensão máxima, tensão na ruptura, alongação na ruptura e módulo de Young de membranas de celulose bacteriana produzidas por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (53) e <i>Komagataeibacter xylinus</i> ARS B42 (42) em diferentes tempos de cultivo D (4, 6 e 8 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC).....	77
Tabela 9 – Capacidade de absorção de água (%), umidade após absorção (%) e espessura dos corpos de prova (mm) de membranas de celulose bacteriana produzidas por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (53) e <i>Komagataeibacter xylinus</i> ARS B42 (42) em diferentes tempos de cultivo D (4, 6 e 8 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC).....	79
Tabela 10 – Diâmetro das fibras (Dm) de membranas de celulose bacteriana produzidas por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (53) e <i>Komagataeibacter xylinus</i> ARS B42 (42) em diferentes tempos de cultivo D (4, 6 e 8 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC) .....	83
Tabela 11 – Grau de polimerização (GP), índice de cristalinidade (IC) e tamanho do cristalito (CrS) de membranas de celulose bacteriana produzidas por <i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53582 (53) e <i>Komagataeibacter xylinus</i> ARS B42 (42) em diferentes tempos de cultivo D (4, 6 e 8 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC).....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AOCS	American Oil Chemists' Society
CAA	Capacidade de absorção de água
CB	Celulose bacteriana
CTs	Complexos terminais
DRX	Difração de raios-X
EMIC	Ensaio mecânico
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
FDI	Fibra dietética insolúvel
FDS	Fibra dietética solúvel
FDT	Fibra dietética total
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
Glc-1-P	Glicose-1-fosfato
Glc-6-P	Glicose-6-fosfato
GNG	Gliconeogênese
GP	Grau de polimerização
IBÁ	Indústria Brasileira de Árvores
MD	Efluente diafiltrado
MDC	Efluente diafiltrado centrifugado
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MHS	Meio sintético HS (HESTRIN e SCHRAMM, 1954)
MR	Efluente retido na membrana
MRC	Efluente retido centrifugado
msCB	Massa seca de CB
muCB	Massa úmida de CB
PP	Pentosefosfatos
PSM	Processos de separação por membranas
Sf	Concentração final de substrato
Si	Concentração inicial de substrato
t	Tempo de cultivo
TCA	Ciclo de Krebs

TGA	Termogravimetria
UDPG	Uridina-difosfato-glicose
UGPase	UDPG-pirofosforilase
Vm	Volume do meio de cultura

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	23
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	23
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	24
<b>3.1</b>	<b>Celulose</b> .....	24
<b>3.2</b>	<b>Celulose bacteriana (CB)</b> .....	27
<b>3.3</b>	<b>Aplicações de CB</b> .....	28
<b>3.4</b>	<b>Biossíntese de CB</b> .....	30
<b>3.5</b>	<b>Microrganismos produtores de CB</b> .....	32
<b>3.6</b>	<b>Variáveis fermentativas da produção de CB</b> .....	34
<b>3.7</b>	<b>Meios de cultivo para produção de CB</b> .....	35
<b>3.8</b>	<b>Produção de cajuína e seus efluentes residuais</b> .....	38
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
<b>4.1</b>	<b>Efluentes residuais de cajuína</b> .....	41
<b>4.2</b>	<b>Caracterização dos efluentes residuais de cajuína e meio sintético</b> .....	43
<b>4.2.1</b>	<i>Procedimento cromatográfico</i> .....	43
<b>4.3</b>	<b>Microrganismos e meios de cultura</b> .....	44
<b>4.4</b>	<b>Produção de CB</b> .....	44
<b>4.5</b>	<b>Purificação de CB</b> .....	45
<b>4.6</b>	<b>Determinações analíticas do bioprocessamento</b> .....	45
<b>4.6.1</b>	<i>Produção, produtividade e umidade de CB</i> .....	45
<b>4.6.2</b>	<i>Rendimento em relação ao consumo de substrato</i> .....	46
<b>4.7</b>	<b>Caracterização de CB</b> .....	46
<b>4.7.1</b>	<i>Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	46
<b>4.7.2</b>	<i>Termogravimetria (TGA)</i> .....	47
<b>4.7.3</b>	<i>Ensaio mecânico (EMIC)</i> .....	47
<b>4.7.4</b>	<i>Capacidade de absorção de água (CAA)</i> .....	47
<b>4.7.5</b>	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i> .....	48
<b>4.7.6</b>	<i>Grau de polimerização (GP)</i> .....	48

4.7.7	<i>Difração de Raios-X (DRX)</i> .....	49
4.8	<i>Análises estatísticas</i> .....	49
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	50
5.1	<b>Caracterização dos efluentes residuais de cajuína e meio sintético</b> .....	50
5.2	<b>Obtenção de celulose bacteriana em meio de alternativo</b> .....	55
5.2.1	<i>Purificação de CB</i> .....	55
5.2.2	<i>Produção de CB</i> .....	56
5.2.3	<i>Rendimento de CB e consumo de substrato</i> .....	61
5.2.4	<i>Produtividade de CB</i> .....	67
5.2.5	<i>Umidade de CB</i> .....	69
5.3	<b>Caracterização de CB</b> .....	70
5.3.1	<i>Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	72
5.3.2	<i>Análises Termogravimétricas (TGA)</i> .....	74
5.3.3	<i>Ensaio mecânicos (EMIC)</i> .....	76
5.3.4	<i>Capacidade de absorção de água (CAA)</i> .....	78
5.3.5	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i> .....	81
5.3.6	<i>Grau de polimerização (GP) e Difração de raios-X (DRX)</i> .....	83
5.4	<b>Potencial de aplicação de CB</b> .....	88
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	93
7	<b>SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS</b> .....	94
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	95
	<b>APÊNDICE A – ARTIGO: SUPERABSORBENT BACTERIAL CELLULOSE FILM PRODUCED FROM INDUSTRIAL RESIDUE OF CASHEW APPLE JUICE PROCESSING</b> .....	113

## 1 INTRODUÇÃO

A celulose é o polissacarídeo mais abundante disponível na natureza (SOUZA et al., 2020) que vem sendo bastante empregada em substituição aos tradicionais polímeros sintéticos nas mais diversas aplicações, como forma de desenvolver alternativas sustentáveis e matérias-primas renováveis no contexto da economia verde (ZAHAN et al., 2020). A celulose é obtida, em maior parte, de origem vegetal (LAMPUGNANI et al., 2019), entretanto também pode ser produzida via fermentação por bactérias, um processo que tem grandes vantagens em relação ao de obtenção de celulose vegetal. A produção de celulose bacteriana (CB) ocorre em tempo reduzido, sem uso de grandes extensões de terra e sem a geração de efluentes tóxicos decorrentes da sua purificação, diferentemente do que acontece para obtenção de celulose das plantas, devido a presença de componentes complexos na parede celular vegetal (CAZÓN; VÁZQUEZ, 2021).

CB possui propriedades mecânicas únicas relacionadas às características intrínsecas da macromolécula de celulose, resultando em uma rede tridimensional formada por unidades monoméricas conectadas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas que garantem área superficial aumentada (GREGORY et al., 2021), alta resistência mecânica, elevado índice de cristalinidade, resistência à tração, porosidade e excelente capacidade de retenção de água. CB é sintetizada com elevada pureza por não possuir lignina e hemicelulose em sua composição (VASCONCELOS et al., 2017), sendo considerada uma fonte pura de celulose, o que torna o processo de obtenção mais atrativo e menos agressivo ao meio ambiente. CB é um biopolímero excepcionalmente versátil e de grande interesse comercial em razão da sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e não citotoxicidade (POPA et al., 2022), que a torna promissora para diferentes aplicações na indústria biomédica, biotecnológica, alimentícia, cosmética, têxtil e da moda, eletrônica, farmacêutica e odontológica (CIECHOLEWSKA-JUŠKO et al., 2021; ISLAM et al., 2021; KADIER et al., 2021; LIMA; ALVES; MARTINS, 2021).

CB é um material de fonte sustentável que vem ganhando destaque também nos campos dos biomateriais e nanomateriais, para obtenção e otimização de produtos de alto valor agregado (POPA et al., 2022; YU et al., 2019). Nos últimos anos muitas pesquisas têm sido realizadas com a utilização da CB para a criação de novas tecnologias, como no desenvolvimento de curativos, enxertos, dispositivos biomédicos, embalagens (CHEN et al., 2022; CHOI et al., 2022; QIAN et al., 2023). O conjunto de propriedades que compõem a CB, associado à possibilidade de modificações no processo produtivo, auxiliam na obtenção de um material multifuncional e altamente versátil para aplicação em diversos segmentos de mercado

e, consecutivamente, de pesquisa. Como resultado, o mercado global de CB tem crescido constantemente e deve passar de 250 milhões de dólares em 2019 para 680 milhões de dólares em 2025 (RAUT et al., 2023; SON et al., 2022).

No entanto, a aplicação de CB ainda é limitada devido aos altos custos envolvidos no processo, principalmente aqueles relacionados ao meio de cultivo, responsáveis por até 50-65% da despesa total da produção em escala industrial. O meio sintético HS (HESTRIN; SCHRAMM, 1954) composto por glicose, extrato de levedura, peptona, ácido cítrico e fosfato de sódio, é tradicionalmente utilizado como meio de cultivo para produção de CB, porém é considerado um meio de formulação cara, tornando evidente a necessidade de novas estratégias de formulação de meios de cultura alternativos que sejam baratos e acessíveis e acarretem na redução dos custos deste processo (JOZALA et al., 2015; SOUZA et al., 2020).

Com a sustentabilidade em alta, o reaproveitamento de resíduos agroindustriais e subprodutos agrícolas em geral tem sido avaliado como meios alternativos para potencial produção de CB. Estes incluem o líquido de sisal (LIMA et al., 2017), extrato de algaroba (NASCIMENTO, 2014), glicerol (VAZQUEZ et al., 2013), melaço (BAE; SHODA, 2004), sucos de laranja e abacaxi (KUROSUMI et al., 2009), extrato aquoso de cascas de uva e soro de queijo (CARREIRA et al., 2011), entre outros, que apresentam boa quantidade de açúcares (glicose, frutose, galactose e sacarose), sendo promissores na relação custo-benefício da produção industrial do biopolímero.

Na produção industrial de cajuína pela tecnologia de separação por membranas de microfiltração, além da obtenção do suco de caju clarificado como produto final, cerca de 10% do total de pseudofrutos processados são rejeitados do processo na forma de efluentes residuais. Mesmo apresentando em sua composição diferentes concentrações de macro e micronutrientes em geral, além de outros constituintes presentes no caju, esses resíduos são descartados sem nenhuma finalidade de aplicação. Nesse sentido, tais efluentes residuais de cajuína, podem apresentar potencial aplicação como meio de cultivo alternativo para favorecer a produção de CB, tornando o processo economicamente mais viável, com redução do impacto ambiental e gerando produtos com alto valor agregado.

Essa tese trata aspectos da obtenção e utilização de celulose bacteriana, desde as etapas iniciais do bioprocessamento até os estudos de caracterização do produto. Primeiramente são abordados fatores pertinentes às caracterizações físico-químicas e analíticas de diferentes efluentes residuais da produção de cajuína pela tecnologia de separação por membranas, assim como todo o processo de obtenção de CB por bactérias *Komagataeibacter*, com definição das melhores condições para produção do biopolímero. Também são apresentadas análises de

diferentes caracterizações da CB produzida em condições definidas, com ênfase nas características superiores do produto e que permitem sua potencial aplicação na indústria.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o uso de efluente residual de cajuína microfiltrada como meio de cultivo alternativo para produção de celulose bacteriana por bactérias *Komagataeibacter*, investigando suas propriedades físico-químicas.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Realizar caracterizações físico-químicas e analíticas dos efluentes residuais da produção de cajuína microfiltrada e determinar aquele com composição mais adequada para meio de cultivo alternativo de produção de CB;
- Determinar a produção, produtividade e rendimento de CB por *K. xylinus* ATCC 53582, *K. hansenii* ATCC 23769 e *K. xylinus* ARS B42, em diferentes tempos de cultivo, em meio sintético Hestrin-Schramm (HS) e meio alternativo residual de processamento de caju, buscando definir as melhores condições do processo de obtenção de CB utilizando o retido da microfiltração da produção de cajuína;
- Purificar a CB produzida para caracterização por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), termogravimetria (TGA), ensaios mecânicos de tração (EMIC), capacidade de absorção de água (CAA), microscopia eletrônica de varredura (MEV), grau de polimerização (GP) e difratometria de raios-X (DRX); e identificar potenciais aplicações
- Analisar os perfis de composição química, resistência térmica, resistência mecânica, hidrofobicidade, organização das fibras e cristalinidade da CB produzida em meios sintético e alternativo;

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Celulose

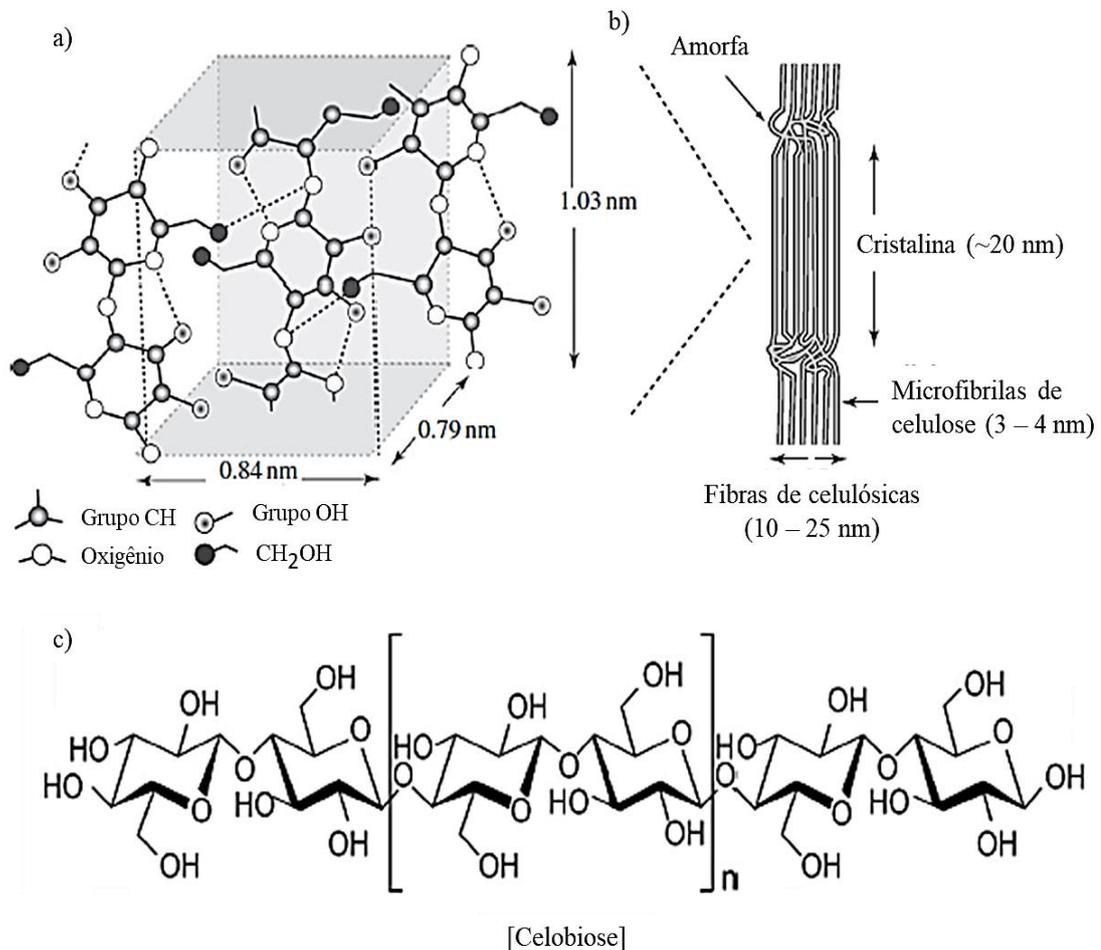
A celulose é o polímero orgânico mais abundante na natureza, sendo encontrada predominantemente em vegetais (DUARTE et al., 2019). Renovável e biodegradável, possui grande importância na economia global com uma produção de mais de  $10^{14}$  toneladas por ano (BORRO, 2021; PACHECO et al., 2017), onde cerca de 60% dessa é voltada às indústrias de celulose e papel, têxteis e químicas (SINGH; GUPTA, 2020). De acordo com os dados apresentados na edição mais recente do Boletim da Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ), a produção brasileira de celulose bateu recorde em 2021, alcançando 22,5 milhões de toneladas, que representa um avanço de 7,4% em relação a 2020 (MARTIN, 2022), o que manteve o Brasil como segundo maior produtor mundial de celulose, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (EPE, 2022).

Independentemente da fonte obtida, a celulose é um homopolissacarídeo linear composto por unidades D-glicopiranosose ligadas entre si por ligações  $\beta$ -1-4 glicosídicas, que ocorrem entre os oxigênios ligados covalentemente aos átomos de carbono 1 de uma molécula de glicose e os átomos de carbono 4 da molécula de glicose adjacente (EICHHORN et al., 2010; KHALIL; BHAT; YUSRA, 2012). Os grupos hidroxilas livres nas moléculas formam ligações de hidrogênio intramoleculares entre grupos hidroxila da mesma molécula e intermoleculares, entre grupos hidroxilas de cadeias adjacentes. Essas ligações são responsáveis pela rigidez do polímero e pela formação das estruturas tridimensionais (SHEN; GNANAKARAN, 2009).

As cadeias formadas pela ligação dos monômeros de glicose são denominadas fibrilas elementares, que se agregam através de ligações de hidrogênio, formando as microfibrilas. A reunião das microfibrilas origina as microfibrilas e estas se agrupam gerando as fibras celulósicas. No processo de formação das microfibrilas são originadas áreas onde as cadeias de celulose estão dispostas numa estrutura altamente ordenada, denominadas de regiões cristalinas, e áreas que são desordenadas, conhecidas por regiões amorfas (MOON et al., 2011). Vale salientar que a estrutura química da celulose apresenta uma unidade de repetição fundamental, que é um dímero de glicose, denominado celobiose. Além disso, o grande número de grupos hidroxilas em destaque, que estão presentes nos anéis de glicose, facilita a realização de processos de modificações químicas. Esses processos podem resultar na obtenção de vários derivados de celulose com diferentes propriedades (NASCIMENTO, 2022). A estrutura das

cadeias da celulose, como estão distribuídos seus domínios moleculares e a unidade de repetição fundamental da estrutura, são representados na Figura 1.

Figura 1. Estrutura da celulose. a) Moléculas de glicose com ligações covalentes (linha contínua) e ligações de hidrogênio (linha tracejada); b) Microfibrilas de celulose com regiões cristalina e amorfa, formando agregados em fibras celulósicas; c) unidade de repetição fundamental da estrutura química de celulose, denominado celobiose.

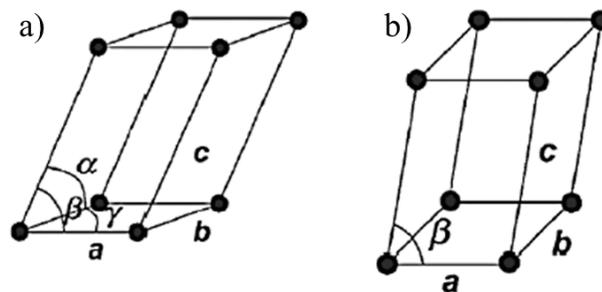


Fonte: Adaptado de GIBSON et al., (2012) e NASCIMENTO et al., (2022).

A celulose é um material polimorfo, ou seja, pode ser encontrada em diversas formas (I, II, III e IV), o que é conhecido como polimorfismo da celulose, sendo que as mais estudadas são a celulose tipo I (celulose nativa) e a celulose tipo II. A celulose tipo I, forma disponível na natureza, consiste na mistura de duas fases cristalinas (Figura 2): uma monoclinica (celulose I $\beta$ ) (Figura 2b), produzida principalmente por bactérias e algas, que apresenta três eixos cristalográficos de comprimentos diferentes, onde os ângulos  $\alpha$  e  $\gamma$  têm 90° e o ângulo  $\beta$ , um valor diferente de 90°; e outra triclinica (celulose I $\alpha$ ) (Figura 2a), presente

abundantemente na parede celular de plantas, que exibe cristais de simetria mais pobre, com três eixos cristalográficos, todos diferentes entre si, o mesmo acontecendo com os ângulos entre eles (CARNEIRO, 2015; KLEMM et al., 2005; LAVOINE et al., 2012). A celulose tipo II é mais estável que a celulose I e mais difícil de ser encontrada em sua forma nativa, pois é produzida apenas por alguns tipos de algas ou através do uso de processos químicos, por duas rotas: regeneração (solubilização seguida de recristalização) ou mercerização (tratamento alcalino em elevadas temperaturas), ambas partindo da celulose tipo I (LIMA, 2020; NASCIMENTO, 2014). 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 (BARROS, 2021; CHAWLA et al., 2009; KLEMM et al., 2005). As celulosas tipo III<sub>I</sub> e III<sub>II</sub> podem ser obtidas através do tratamento com amônia da celulose tipo I e tipo II, respectivamente. As celulosas tipo IV<sub>I</sub> e IV<sub>II</sub> são obtidas através do aquecimento com glicerol das celulosas tipo III<sub>I</sub> e III<sub>II</sub>, respectivamente (LAVOINE et al., 2012; SIQUEIRA; BRAS; DUFRESNE, 2010).

Figura 2. Estruturas cristalinas da celulose tipo I, (a) triclinica e (b) monoclinica.



Fonte: (SILVA; D'ALMEIDA, 2009).

Embora a maior parte da celulose disponível na terra seja produzida por plantas, alguns microrganismos, tais como fungos e bactérias, também são capazes de produzir uma forma extracelular de celulose, a qual denomina-se celulose microbiana (KLEMM et al., 2005; SANTOS et al., 2001) e quando é produzida exclusivamente por bactérias, recebe o nome de celulose bacteriana.

### 3.2 Celulose bacteriana (CB)

A celulose bacteriana (CB), também conhecida como biocelulose, foi relatada pela primeira vez em 1886, quando estudos de Brown em fermentação acética indicaram a formação de uma superfície gelatinosa no caldo fermentado do vinagre. A partir de análises microscópicas foi observado que a estrutura formada era quimicamente semelhante à celulose vegetal e apresentava bactérias distribuídas por toda sua área superficial, que posteriormente foram identificadas como *Acetobacter xylinum* (DUARTE et al., 2019). CB faz parte do grupo dos carboidratos, moléculas compostas basicamente de carbono, hidrogênio e oxigênio, também denominados glicídios ou hidratos de carbono, e apesar de possuir a mesma fórmula molecular da celulose vegetal ( $(C_6H_{10}O_5)_n$ ), apresenta propriedades físicas e químicas diferentes, que lhe garantem atributos superiores, principalmente em relação ao seu caráter nanométrico (VÁZQUEZ et al., 2013).

CB é produzida via bioprocessos, através de fermentação por bactérias, num processo com grandes vantagens em relação ao de obtenção de celulose vegetal. A produção de CB se mostra mais versátil, econômica e ecologicamente sustentável, devido à redução do impacto ambiental ao diminuir a geração de efluentes tóxicos gerados durante a separação da celulose do material lignocelulósico (TABARSA et al., 2017). Como a CB não se apresenta ligada a lignina, hemicelulose e outros constituintes dos materiais lignocelulósicos, é considerada quimicamente pura, diferentemente da celulose vegetal onde são necessários tratamentos químicos agressivos para sua obtenção. Além disso, a obtenção de CB ocorre em tempo reduzido e sem uso de grandes extensões de terra (CAZÓN; VÁZQUEZ, 2021; NECHYPORCHUK; BELGACEM; BRAS, 2016).

CB é um biopolímero nanoestruturado que possui propriedades mecânicas únicas relacionadas às características intrínsecas da macromolécula de celulose, resultando em uma rede tridimensional formada por unidades monoméricas conectadas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas dispostas em paralelo, conferindo à molécula de CB uma orientação plana, que são aproximadamente 100 vezes mais finas que as da celulose vegetal, e garantem área superficial aumentada, alta resistência mecânica, elevado índice de cristalinidade (em torno de 90%), elevado módulo de elasticidade, alto grau de polimerização, alta resistência à tração, alta porosidade, alta permeabilidade e excelente capacidade de retenção de água, sendo capaz de absorver quase 100 vezes sua própria massa em água (GREGORY et al., 2021; SOUZA et al., 2020; VASCONCELOS et al., 2017). CB é de fonte sustentável excepcionalmente versátil e de grande interesse comercial em razão da sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e não

citotoxicidade, que a torna promissora para diferentes aplicações na indústria (QIAO et al., 2019; POPA et al., 2022). Enquanto as fibras da celulose vegetal apresentam dimensões macrométricas, que estão associadas a diferentes produtos biogênicos encontrados na parede celular das plantas e são de difícil separação, as fibras da CB apresentam um caráter nanométrico, que permitem a moldagem da estrutura tridimensional durante sua síntese e conferem tais propriedades superiores e boa adaptabilidade biológica (CZAJA et al., 2007; GOTTSCHALK; OLIVEIRA; SILVA, 2021).

### 3.3 Aplicações de CB

Em função de suas propriedades, a CB é considerada um material com grande potencial de aplicação, sendo utilizada na área de alimentos, farmacêutica, têxtil, eletrônica, engenharia de tecidos, cosmética, odontologia, biomedicina e biotecnologia industrial, entre outros, para obtenção de produtos de valor agregado (RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015). Algumas dessas aplicações podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1. Versatilidade de CB em diferentes campos de aplicação.

ÁREA	APLICAÇÃO	REFERÊNCIA
Indústria alimentícia	Sucos, sobremesas, alimentos dietéticos, embalagens comestíveis, espessantes, modificadores da textura de sorvetes	(AZEREDO et al., 2019; BUDHIONO et al., 1999; CHAWLA et al., 2009)
Indústria cosmética	Hidratantes, adstringentes, cremes condicionadores, máscaras hidratantes, polidores de unhas, agentes de pigmentação da pele	(ALMEIDA et al., 2021; HUANG; ZHU; YANG, 2014; LUDWICKA et al., 2018; PECORARO et al., 2007; YAN et al., 2017)
Indústria biomédica	Bioimpressão 3D, regeneração de tecidos e ossos, cartilagem para engenharia de tecidos, curativos, pomadas, implantes de tubos para vasos sanguíneos artificiais, fraldas descartáveis para bebês, implantes vasculares	(AZEREDO et al., 2019; NAZ; ALI; ZIA, 2019; PANG et al., 2019; POPA et al., 2022; PÖTZINGER, 2017; SPEROTTO et al., 2021)

Indústria farmacêutica	Emulsões pickering, liberação controlada de fármacos, antioxidantes	(AVRĂMESCU et al., 2018; JIA et al., 2019)
Indústria biotecnológica	Compósitos poliméricos, imobilização enzimática, biocurativos	(GREGORY et al., 2021; SILVIANA; SUSANTI, 2019; YU et al., 2019)
Indústria odontológica	Materiais para implantodontia e endodontia	(POPA et al., 2022; YOSHINO et al., 2013)
Indústria eletrônica	Biossensores, eletrônicos vestíveis, dispositivos de armazenamento de energia, eletrodos, capacitores, membranas de proteção, membranas acústicas em fones de ouvido, headsets	(DU et al., 2018; RESHMY et al., 2021; UL-ISLAM et al., 2015)
Indústria têxtil	Materiais com alta capacidade absorvente, barracas e materiais de camping, tingimento com corantes naturais	(SILVA JUNIOR et al., 2021; JEDRZEJCZAK-KRZEPKOWSKA et al., 2016; YUAN et al., 2020)
Indústria do papel	Papel com características especiais, reciclagem de livros usados, notas duráveis	(JEDRZEJCZAK-KRZEPKOWSKA et al., 2016; SKOC, 2019)
Ambiental	Membranas de ultrafiltração, tratamento de esgoto, absorção de poluição por óleo, metais pesados e toxinas, biorremediação, embalagens plásticas descartáveis	(PHANTHONG et al., 2018; RESHMY et al., 2021; VOISIN et al., 2017)
Indústria da moda	Vestimentas, calçados, produção de tecidos	(ANDRADE et al., 2020; LIMA; ALVES; MARTINS, 2021)
Construção civil	Reforço de concreto	(SINGH; GUPTA, 2020)

Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

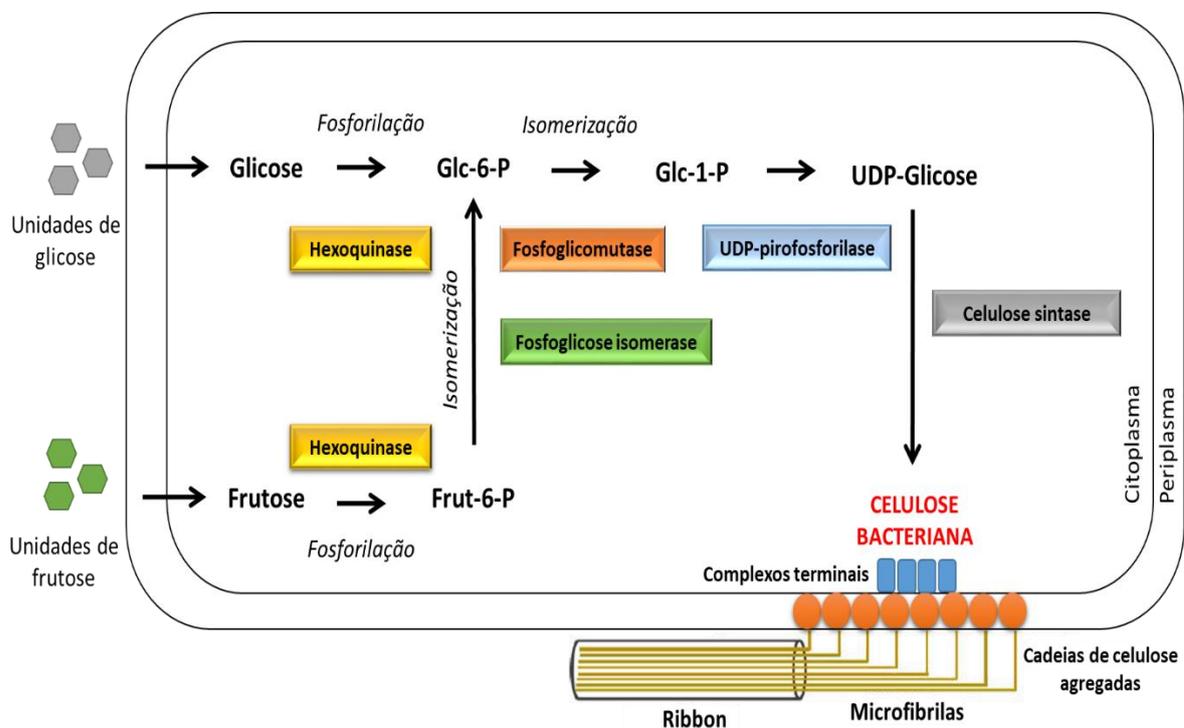
### 3.4 Biossíntese de CB

A biossíntese de CB está intimamente relacionada a muitas vias metabólicas, como a via das pentosesfosfato (PP), a via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), o ciclo de Krebs (TCA) e a gliconeogênese (GNG) (LEE et al., 2014; NAGASHIMA; TSUJI; KONDO, 2016), e a definição de algumas delas para a síntese vai depender dos tipos de nutrientes consumidos, especialmente a fonte de carbono, que deve ser suficiente para a multiplicação celular e produção de celulose (HUANG; ZHU; YANG, 2014). O ciclo PP envolve a oxidação de carboidratos e o ciclo TCA envolve a oxidação de acetatos derivados de carboidratos, assim como lipídeos e proteínas (JAECK et al., 2019). Devido à falta ou muito baixa atividade de fosfofructoquinase, grande parte das bactérias produtoras de celulose são incapazes de usar a via EMP para a síntese de piruvato a partir da glicose. Alternativamente, o piruvato é obtido a partir de acetato e é usado para sintetizar glicose pela via GNG (SARKAR; YABUSAKI; HASEBE, 2010; VELASCO-BEDRÁN; LÓPEZ-ISUNZA, 2007; ZHONG et al., 2013).

Na maioria das fermentações a CB é sintetizada através da metabolização de açúcares como glicose (BARROS, 2021). No caso da *Komagataeibacter xylinus*, principal bactéria produtora de CB relatada na literatura, a síntese do biopolímero é regulada de maneira bastante precisa e específica, envolvendo um grande número de complexos de proteínas catalíticas e regulatórias, cuja estrutura supramolecular ainda não está bem definida, e vai depender do tipo de carboidrato consumido, conforme observado na Figura 3. Quando a glicose é usada como substrato quatro etapas enzimáticas essenciais ocorrem na via de síntese: 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 2. Na etapa 3 há a formação da uridina-difosfato-glicose (UDP-Glic ou UDPG) através da ação da UDPG-pirofosforilase (UGPase), e, finalmente, na etapa 4 ocorre a reação de síntese da celulose, pela ação da celulose sintase. UDPGlc é o precursor direto da celulose, e o seu papel fundamental na síntese, ainda não muito bem definido, está relacionado a atuação como substrato para a celulose sintase, que pode ocorrer a partir de ligação com lipídeos da membrana plasmática ou interagindo diretamente com a enzima (DONINI et al., 2010). Apesar de ser comum em muitos microrganismos, UDPGlc está cerca de cem vezes mais presente naqueles que são produtores de celulose (DUARTE et al., 2019; LEE et al., 2014; UL-ISLAM et al., 2015). A produção de CB a partir da frutose envolve a enzima hexoquinase que fosforila a frutose para frutose-6-fosfato e, posteriormente, a isomerização da frutose-6-fosfato para glicose-6-fosfato pela enzima fosfoglicose isomerase. A partir desse ponto a via metabólica

para produção de CB segue o mesmo caminho da síntese do biopolímero utilizando de glicose. Já para produção de CB a partir de dissacarídeos, tal como a sacarose, a biossíntese do biopolímero inicia-se no periplasma da célula com a hidrólise dos dissacarídeos em monossacarídeos, como glicose e frutose. Quando dissacarídeos, como a sacarose e maltose, são usados como fontes de carbono, a biossíntese da CB começa com a hidrólise dos dissacarídeos em monossacarídeos, como a glicose e frutose (CHAGAS, 2018; LEE et al., 2014).

Figura 3. Esquema simplificado da principal via metabólica para biossíntese e formação de celulose bacteriana.



Fonte: Adaptado de GOTTSCHALK; OLIVEIRA; SILVA, (2021); JACEK et al., (2019) e LEE et al., (2014)

A adequação de um determinado substrato pode ser entendida em termos de duas vias anfibólicas operativas por bactérias produtoras de CB: o ciclo das pentosesfosfato, para a oxidação de carboidratos, e o ciclo de Krebs, para a oxidação de ácidos orgânicos e compostos relacionados. Independentemente do tipo de substrato, a biossíntese de celulose está intimamente associada com processos catabólicos de oxidação e consome cerca de 10% da energia derivada de reações catabólicas, sendo, portanto, um processo oneroso para a célula.

Assim, a energia empregada para a síntese de CB é proveniente do metabolismo aeróbio (DONINI et al., 2010). O processo de biossíntese da celulose não interfere com outros processos anabólicos, incluindo a síntese de proteínas (CHAGAS, 2018; DUARTE et al., 2019).

A razão pela qual as bactérias geram celulose não está bem estabelecida, pois é parte de seu metabolismo, mas tem sido sugerido que a membrana formada na interface ar/líquido permite as bactérias aeróbias moverem-se para a superfície possibilitando obter oxigênio com maior facilidade para seu crescimento. Além disso, o mecanismo de flotação previne a desidratação do substrato, serve como proteção contra a luz ultravioleta e atua como uma barreira contra o crescimento de outros microrganismos não produtores do biopolímero (CASTRO et al., 2011; RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015). O processo de síntese de CB (Figura 3) ocorre entre o citoplasma e o periplasma da célula, e acontece em várias etapas (CAMPANO et al., 2016). A celulose sintase, com um operon bem definido, é considerada a enzima mais importante. Operon é uma unidade genômica funcional do DNA que contém múltiplos genes (BOLDRIN, 2015; LEE et al., 2014). O operon da celulose sintase codifica complexos de proteínas alinhados ao longo do eixo longitudinal da célula, chamados de complexos terminais (CTs). Os CTs sintetizadores de celulose ocorrem na superfície da bactéria próximos aos poros da membrana. A CB começa a ser sintetizada quando a bactéria origina cadeias que se agregam gerando nanofibrilas com largura de, aproximadamente, 1,5 nm, se agrupam com outras 36 iguais a elas, formando uma microfibrila elementar com um diâmetro variando de 3 a 3,5 nm. Aproximadamente 46 fibrilas adjacentes se juntam por meio de ligações de hidrogênio formando um ribbon, que é o nome dado às fibras de CB (Figura 3). A membrana formada por CB é o resultado de uma matriz de tiras interligadas, que caracterizam a sua rede nanoestruturada de fibras de celulose. A celulose formada apresenta diversos grupos hidroxila dispostos na superfície, o que explica suas características de biodegradabilidade, hidrofiliçidade e alta capacidade de modificação química para as mais diversas aplicações industriais (ANDRADE; DOURADO; GAMA, 2010; CASTRO et al., 2011; GOTTSCHALK; OLIVEIRA; SILVA, 2021).

### **3.5 Microrganismos produtores de CB**

Numerosas cepas selvagens e recombinantes são relatadas como produtoras bem-sucedidas de celulose microbiana, utilizando diferentes fontes de carbono, incluindo vários resíduos como seus substratos. Espécies de bactérias dos gêneros *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*,

*Sarcina*, *Dickeya* e *Rhodobacter* são relatadas como produtoras de CB, que se distribuem em cepas Gram-positivas e Gram-negativas (LAHIRI et al., 2021; WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019). No entanto, o gênero *Komagataeibacter*, anteriormente conhecido como *Gluconacetobacter* ou *Acetobacter*, é o mais utilizado industrialmente para produção de CB devido à sua elevada capacidade de metabolizar uma ampla gama de fontes de carbono/nitrogênio, convertendo-as em celulose (ISLAM et al., 2017; ZHONG, 2020). Desse grupo, as cepas *Komagataeibacter xylinus* e *Komagataeibacter hansenii* são as mais eficazes para a produção comercial de CB (PODDAR; DIKSHIT, 2021).

As bactérias *Komagataeibacter* são bastonetes estritamente aeróbicos, gram-negativos, toleram pH abaixo de 5 e podem ser encontrados naturalmente em frutas e vegetais em processo de decomposição, suco de frutas e bebidas alcoólicas. São catalogadas no nível 1 de biossegurança sendo, portanto, não-patogênicos (COLLADO et al., 2009; KLEMM et al., 2001; MADALOZZO et al., 2008). A razão pela qual as bactérias geram celulose não está bem estabelecida, pois é parte de seu metabolismo, mas tem sido sugerido que a membrana formada na interface ar/líquido permite as bactérias aeróbias moverem-se para a superfície possibilitando obter oxigênio com maior facilidade para seu crescimento. Além disso, o mecanismo de flotação previne a desidratação do substrato, serve como proteção contra a luz ultravioleta e atua como uma barreira contra o crescimento de outros microrganismos não produtores do biopolímero (BARROS, 2021; CASTRO et al., 2011; RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015).

Dentre as bactérias *Komagataeibacter*, *K. xylinus* ATCC 53582 é conhecida como a super-produtora devido sua capacidade elevada de produção de celulose, ganhando destaque quando comparada a outras bactérias do mesmo gênero (AUGIMERI; STRAP, 2015; JACEK et al., 2019). *K. hansenii* ATCC 23769 não é a bactéria modelo mais comumente estudada para a produção, porém vem sendo bastante referida em publicações acadêmicas associadas a meios de cultura sintéticos e alternativos, assim como cultivo estático ou agitado, e apresenta boa produção de CB (SOUZA et al., 2019; ILLA; SHARMA; KHANDELWAL, 2019; WU et al., 2019; YE et al., 2019). *K. xylinus* ARS B42, apesar de ainda ser pouco mencionada na literatura, também já apresenta bons resultados para síntese de CB (RAMÍREZ et al., 2019; TRČEK et al., 2021; VAZQUEZ et al., 2013). Grande parte das pesquisas desenvolvidas relacionadas a CB se limitam ao estudo do potencial de produção do biopolímero e, apesar das características gerais de CB já serem bem relatadas e conhecidas, ainda faltam abordagens que diferenciem as propriedades e peculiaridades da membrana formada por cada cepa.

### 3.6 Variáveis fermentativas da produção de CB

Algumas variáveis operacionais são determinantes na produção do biopolímero de celulose, dentre eles é possível destacar a temperatura, pH, tempo de cultivo, composição do meio de cultura e oxigênio dissolvido no meio, que é alterado de acordo com a forma de cultivo durante o processo. Determinar um meio ideal e um conjunto adequado de condições de crescimento que permitam altos níveis de produção de celulose possibilita agregar características necessárias para ampliação desta tecnologia para uma situação industrial (NASCIMENTO, 2014).

A temperatura é um parâmetro fundamental, pois afeta o crescimento e a produção de CB. Na maioria dos estudos a produção máxima de celulose foi observada entre 28 e 30 °C, sendo considerada a temperatura ideal para síntese do biopolímero a de 30 °C (CHAGAS, 2018; JAHAN; KUMAR; SAXENA, 2017). As variações no pH durante o processo fermentativo podem resultar em aumento ou diminuição do consumo de açúcares, devido às alterações na atividade e síntese enzimática, conseqüentemente, afetando a divisão celular e a quantidade de nutrientes disponíveis. Os meios com diferentes condições de pH conduzem a respostas diferentes quanto à produção da celulose bacteriana (PANESAR et al., 2012). O pH ótimo para o crescimento de bactérias e produção de CB depende em particular da cepa usada, mas geralmente está na faixa de 4 – 7 (LEE et al., 2014), com a maior eficiência localizada em torno de 6,5, enquanto abaixo do valor de 3,0 a síntese de celulose já pode ser inibida (LIMA, 2014; NASCIMENTO, 2014; POYRAZO; BIYIK, 2011). O pH do meio de cultura pode diminuir em função do tempo devido ao acúmulo de metabólitos secundários, como ácidos glucônico, acético ou láctico que são produzidos durante o consumo de açúcares e fontes de nitrogênio (RAGHUNATHAN, 2013). Desse modo, é importante a escolha de um pH ideal do meio de cultura para obtenção de uma maior produção de CB. O tempo de cultivo também pode causar modificações na produção do biopolímero, porém é um parâmetro ainda pouco abordado nos trabalhos publicados. Alguns produzem CB com 3 dias, enquanto outros prolongam o bioprocessamento até o 15º dia (BANDYOPADHYAY; SAHA; SAHA, 2018; BARROS, 2021; CHEN et al., 2018). Os efeitos dessa variação geralmente são refletidos nos resultados de produtividade de CB.

A síntese de CB ocorre mediante a inoculação do microrganismo em um meio de cultura adequado ao seu crescimento, contendo fontes de fósforo, nitrogênio, carbono, oligoelementos, entre outras fontes de macro e micronutrientes. Em relação às condições de cultivo, há dois métodos amplamente empregados: cultivos estático e agitado. Quando a cultura

é mantida em modo estático, as fitas de celulose que estão sendo formadas e as bactérias associadas se emaranham e formam uma película flutuante na interface ar/líquido. Em um estágio inicial da cultura, a bactéria consome o oxigênio dissolvido no meio para aumentar a sua população e, durante essa fase, uma certa quantidade de celulose é produzida na fase líquida. Porém, somente as bactérias que estão nas proximidades da interface ar/líquido e com acesso ao oxigênio serão capazes de manter a sua atividade e produzir celulose. Aquelas bactérias imersas na fase líquida ficarão dormentes, podendo ser reativadas e usadas como inóculo em novas culturas (LAVOINE et al., 2012). Portanto, o processo de formação de CB, sob condições estáticas, é regulado pela quantidade de oxigênio em contato com a superfície do meio e do tempo de cultivo, tendo em vista que as bactérias não sintetizam CB quando há oferta insuficiente de oxigênio. Outro método usualmente empregado para produção da celulose diz respeito ao cultivo agitado, por meio do qual são obtidas formas irregulares de celulose em suspensão fibrosa, como esferas e pellets (BARROS, 2021; NASCIMENTO, 2014; WU; LIA, 2008). Embora o rendimento da produção de CB seja bem maior no cultivo estático do que no cultivo agitado, esse modo de cultivo requer elevada área superficial disponível, por isso alguns pesquisadores têm indicado a cultura agitada como a técnica mais adequada para produção em escala econômica (LEE et al., 2014). Contudo, ainda é preciso superar algumas limitações do processo de cultura sob agitação, como o surgimento de mutantes não produtores de celulose que acabam por dominar a cultura, resultando muitas vezes em um baixo rendimento do processo (DUARTE et al., 2019; ERBAS; KIZILTAS; GARDNER, 2015; KIM et al., 2007).

### **3.7 Meios de cultivo para produção de CB**

Na produção de CB, o meio de cultivo é responsável por até 65% do custo do bioprocessamento, o que corresponde até 30% do custo total do processo produtivo em escala industrial (JOZALA et al., 2015; RIVAS et al., 2004). Os meios podem ser de dois tipos: meios de composição definida (meios sintéticos), os quais apresentam componentes químicos com composição conhecida, ou meios complexos (meios alternativos), obtidos a partir de substratos naturais e com composição química variável. Os meios complexos apresentam custos menores frente aos meios de composição definida e, em alguns casos, podem fornecer maiores rendimentos. Contudo, muitos pesquisadores preferem trabalhar com meios de composição definida, devido sua maior reprodutibilidade e facilidade de purificação do produto final (AZILA et al., 2015; DUARTE et al., 2019).

O meio de cultivo deve apresentar fonte de carbono, nitrogênio e outros macro e micronutrientes necessários para o crescimento microbiano. Usualmente, a fonte de carbono mais utilizada é a glicose, porém, outras fontes como sacarose, frutose, manitol, glicerol e xilose, também são utilizadas (RAGHUNATHAN, 2013; SINGHSA; NARAIN; MANUSPIYA, 2018). A fonte de nitrogênio é importante para a produção de CB, pois além de aminoácidos, também pode ser fonte de vitaminas e sais minerais para as bactérias. Extrato de levedura e peptona, que são os componentes básicos do meio de referência HS são as fontes de nitrogênio preferencialmente utilizadas para síntese do biopolímero (CAMPANO et al., 2016).

O meio sintético HS (HESTRIN; SCHRAMM, 1954) tem sido o mais utilizado na produção de CB, sendo considerado como referência para a síntese desse biopolímero. Ele apresenta em sua composição glicose, extrato de levedura, peptona, ácido cítrico e fosfato de sódio, pois, para produção de CB o microrganismo requer, especialmente, fontes de carbono, nitrogênio e minerais. A formulação do meio HS apresenta elevado custo, dessa forma, estratégias como a formulação de meios de cultivo alternativos e de baixo custo estão sendo propostas visando reduzir os custos deste processo (CAMPANO et al., 2016; GOTTSCHALK; OLIVEIRA; SILVA, 2021).

Na busca por novas fontes de carbono como meio alternativo em substituição aos meios sintéticos, a utilização de substratos alternativos da agroindústria é uma opção viável, pois favorece a produção da CB com custo reduzido, possibilitando a obtenção do biopolímero com alto valor agregado e com redução do impacto ambiental (CHAGAS, 2018; HUANG; ZHU; YANG, 2014; JOZALA et al., 2015). Esses subprodutos geralmente são ricos em açúcares (glicose, frutose, galactose e sacarose) e podem ser promissores para a produção industrial de CB, mesmo sem suplementação ou aditivos no meio, tornando-o economicamente mais viável. Alguns dos trabalhos desenvolvidos utilizando substratos alternativos da agroindústria como meio de cultivo para produção de CB podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Substratos da agroindústria avaliados como meios de cultivo alternativos para produção de celulose bacteriana.

<b>SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
Líquido de sisal	(LIMA et al., 2017)
Extrato de groselha coríntia	(BEKATOROU et al., 2019)
Chás da casca de abacaxi e melancia	KUMBHAR et al., 2015
Resíduos de cascas de laranja	(KUO et al., 2019)
Óleo de soja refinado e tratado	(QIAO et al., 2019)
Água residual de jujuba cristalizada	(LI et al., 2015),
Soro de leite e frutas	(JOZALA et al., 2015)
Resíduos de cajueiros	(PACHECO et al., 2017)
Vinhaça	(BARSHAN et al., 2019)
Sucos de coco e abacaxi	(KONGRUANG, 2008)
Hidrolisados de limão, tangerina e laranja	(GUZEL et al., 2019)
Bagaço de café	(RANI; APPAIAH, 2012)
Melaço da indústria cervejeira	(KHATTAK et al., 2015)
Algaroba	(NASCIMENTO et al., 2016)
Vinhaça e <i>Aloe vera</i>	(BORRO, 2021)
Suco de caju e melaço de soja	(SOUZA et al., 2020)
Sucos de abacaxi, laranja, maçã, pera e uva	(KUROSUMI et al., 2009)
Melaço de beterraba	(SALARI et al., 2019)
Glicerol	(VAZQUEZ et al., 2013)
Resíduos de casca de banana	(SIJABAT et al., 2020)
Resíduo rico em farinha	(TSOUKO et al., 2015)
Melaço de soja	(CHAGAS, 2018)
Extrato de casca de uva e soro de queijo	(CARREIRA et al., 2011)
Resíduo de cascas de abacaxi, laranja e limão	(KHAN et al., 2021)
Suco de tomate, melaço de cana, e espiga de milho	(KUMAR et al., 2019)
Extrato de resíduos de tabaco	(YE et al., 2019)
Sucos de frutas podres (bananas e mangas)	(MOLINA-RAMIREZ et al, 2018)

Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

### 3.8 Produção de cajuína e seus efluentes residuais

O caju (*Anacardium occidentale* L.) é uma fruta tropical original do Brasil, onde é amplamente cultivada e comercialmente explorada. Atualmente encontra-se bem distribuído em vários países da Ásia, África e América Central, como cultura agrícola de grande importância econômica. No Brasil é mais cultivada em regiões de clima quente e seco, sendo o Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte os estados responsáveis por 90,58% da produção nacional de caju no ano de 2020, e seu aproveitamento, atualmente, se dá tanto em escala industrial como em escala doméstica (MONTE; ARAÚJO; FIGUEIRÊDO, 2022). O caju é composto por duas partes distintas, correspondendo em média a uma distribuição em peso de 10% de castanha (fruto) e 90% de pedúnculo (pseudofruto). O pedúnculo, que contém 3 a 5 vezes mais vitamina C que a laranja, além de cálcio, fósforo e outros nutrientes, é a parte que possui menor percentagem de aproveitamento, sendo o suco o produto de maior exploração desta matéria-prima (ABREU; SOUZA, 2004; CASTRO; ABREU; CARIOCA, 2007). Segundo dados da Associação das Indústrias Produtoras de Sucos de Frutas Tropicais do Norte e Nordeste do Brasil (ASTN), a perda do pedúnculo pode chegar a cifras de até um milhão de toneladas desperdiçadas, e está associada, dentre outros motivos, a uma alta perecibilidade do pedúnculo após a retirada da planta e a sua separação da castanha. Dessa forma, considerando-se o pedúnculo de caju como uma matéria-prima, sob o ponto de vista nutricional, rica em nutrientes, pode ser manuseada de maneira a se obter produtos com maior valor agregado, tais como geleias, caldas, chutneys, sucos e bebidas, sendo a cajuína um dos principais (ABREU; SOUZA, 2004; GASPARETTO, 2007; SIQUEIRA; BRITO, 2013).

Cajuína, ou suco de caju clarificado, é uma bebida não fermentada e não diluída, permeada e cristalina, obtida do pedúnculo do caju por meio de processo tecnológico adequado. Genuinamente brasileira e típica do Nordeste, a cajuína ganhou nos últimos anos espaço no mercado nacional. Para sua produção, o suco de caju passa por um processo físico de clarificação, com o uso de coadjuvantes de tecnologia autorizados e deve obedecer a padrões de qualidade fixados para obtenção de sucos de fruta. Pelo método convencional de produção, a cajuína é obtida por clarificação com gelatina, que promove a formação de flocos por interação com os taninos presentes no suco de caju e consequente floculação, que permite obter um soluto decantado (polpa) e um líquido transparente (suco clarificado) (SAID, 2009; SILVA NETO; ABREU; PAIVA, 2009).

Processos de separação por membranas (PSM) têm sido estudados como alternativa aos processos convencionais de clarificação de sucos de frutas, e está ganhando rapidamente

aceitação no mercado global, mostrando-se como uma solução mais econômica. Os estudos envolvendo separação por membranas vêm crescendo significativamente e sua utilização vem sendo praticada por diversas indústrias, motivada pelo alto nível de eficiência no processo de separação, do baixo consumo de energia, da redução do número de etapas, propiciando maior nível de qualidade no produto final (CIANCI et al., 2005; SAID, 2009). As membranas são meios filtrantes que apresentam uma barreira seletiva, a qual retém, parcial ou totalmente, partículas de tamanho e pesos moleculares diferentes segundo o diâmetro dos seus poros. Os PSM são classificados em: microfiltração, ultrafiltração, diálise, osmose inversa, pervaporação entre outros, onde cada um possui uma faixa de tamanho de partículas específicas de separação, em decorrência da morfologia da membrana (CHARCOSSET, 2020; DANTAS, 2021). A microfiltração tem sido mais utilizada na clarificação e esterilização de sucos, cervejas e vinhos, pois possibilita a retirada de todas as substâncias responsáveis pela alta turbidez sem alterar suas propriedades sensoriais. As principais vantagens dessa tecnologia em relação a outros processos de separação são: economia de energia, seletividade, possibilidade de separar compostos termolábeis (sensíveis ao calor) e simplicidade de operação e escalonamento. Para esses processos poderem separar constituintes de um fluido, precisa-se aplicar uma força motriz que, dependendo do tipo de processo, pode ser: uma diferença de pressão, uma diferença de concentração ou até mesmo uma diferença de potencial elétrico (CASTRO, 2007; CHARCOSSET et al., 2020).

Como uma tecnologia inovadora, os PSM podem ser utilizados na produção de cajuína. A bebida é submetida a um processo moderno de microfiltração, na qual o suco integral de caju passa por um tratamento em membranas, que as higieniza e melhora sua aparência, e o produto final ainda apresenta um forte apelo comercial por não conter aditivos químicos nem ingredientes de origem animal, como gelatina, por exemplo, tal como acontece pelo método convencional. Além de clarificar o suco, retirando todas as partículas em suspensão, as membranas possuem capacidade de retenção em nível microbiológico, possibilitando dessa forma um suco de alta qualidade do ponto de vista de higiene, sem nenhum tipo de contaminação. Assim, o suco é simplesmente extraído da fruta, filtrado para a clarificação e envasado. Ao ser embalada com uma carga microbiana muito baixa, possibilitando um tratamento térmico mais brando, a cajuína resulta em um produto mais saboroso e com menor perda de vitamina C pelo calor excessivo do tratamento térmico da cajuína tradicional (CAJUÍNA, 2018).

No processo de produção da cajuína por PSM (Figura 4), três tipos de efluentes líquidos são gerados durante a clarificação do suco de caju pela tecnologia de microfiltração:

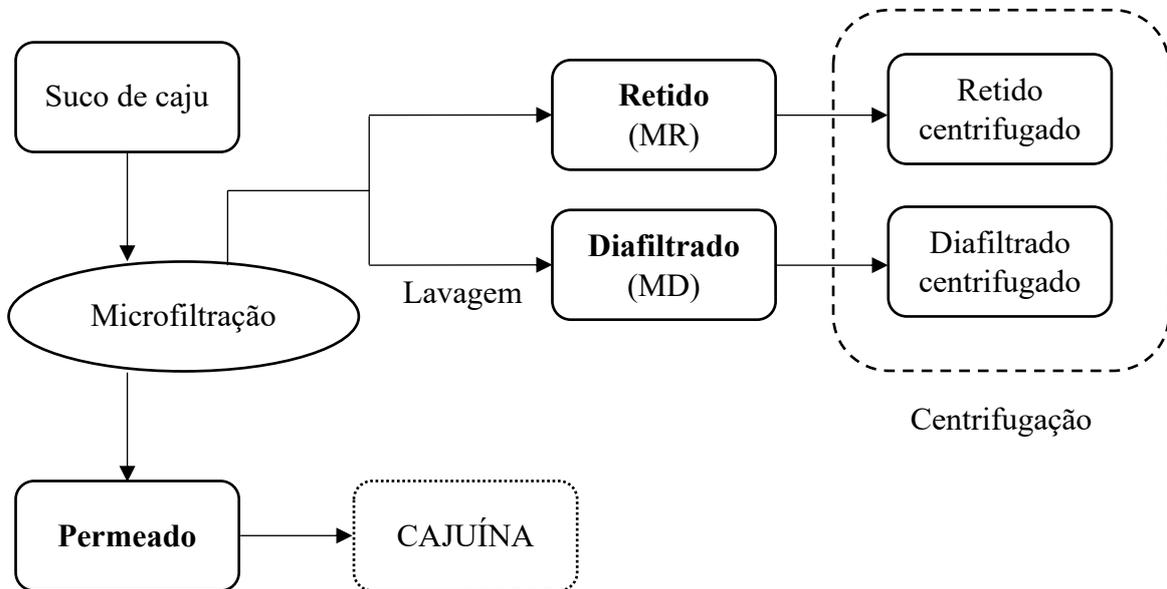
cajuína clarificada, que passa através dos poros da membrana; efluente retido, que não passa através da membrana; e efluente diafiltrado, resultante da lavagem da membrana ao final do processo. Outros dois tipos secundários podem ser derivados do processo nos casos mais específicos em que tais efluentes principais são submetidos a etapa de centrifugação: efluente retido centrifugado e efluente diafiltrado centrifugado. Todos estes apresentam diferentes concentrações de açúcares, proteínas e minerais, entre outros componentes encontrados no caju, porém apenas a cajuína clarificada é utilizada como produto final, enquanto os efluentes retido e diafiltrado são descartados do processo e, portanto, considerados efluentes residuais da produção de cajuína, sem nenhuma finalidade de aplicação.

De acordo com Fernando Abreu (2022), da Embrapa Agroindústria Tropical, considerando um sistema otimizado de produção de cajuína por PMS para processamento diário de 20.000 kg de pseudofruto de caju, é possível alcançar aproximadamente 70% de suco clarificado (em referência a massa inicial de pseudofruto de caju), 20% é fibra residual e, em média, 10% corresponde a efluente residual retido na membrana. Dependendo de variações sazonais da espécie e do processamento não adequado, sem a extração do líquido total presente nas fibras, o percentual de efluente residual pode ser um pouco menor, em torno de 5% (informação verbal)<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Fala do pesquisador Fernando Pinto de Abreu, da EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL, em explicação ao processamento de caju para obtenção de cajuína, em julho de 2022.

Figura 4. Fluxograma das etapas de produção de cajuína pela tecnologia das membranas de microfiltração, com geração de três efluentes líquidos principais: Permeado (cajuína), efluente retido na membrana (MR) e efluente diafiltrado (MD); e dois efluentes secundários: efluente retido centrifugado (MRC) e efluente diafiltrado centrifugado (MDC).



Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

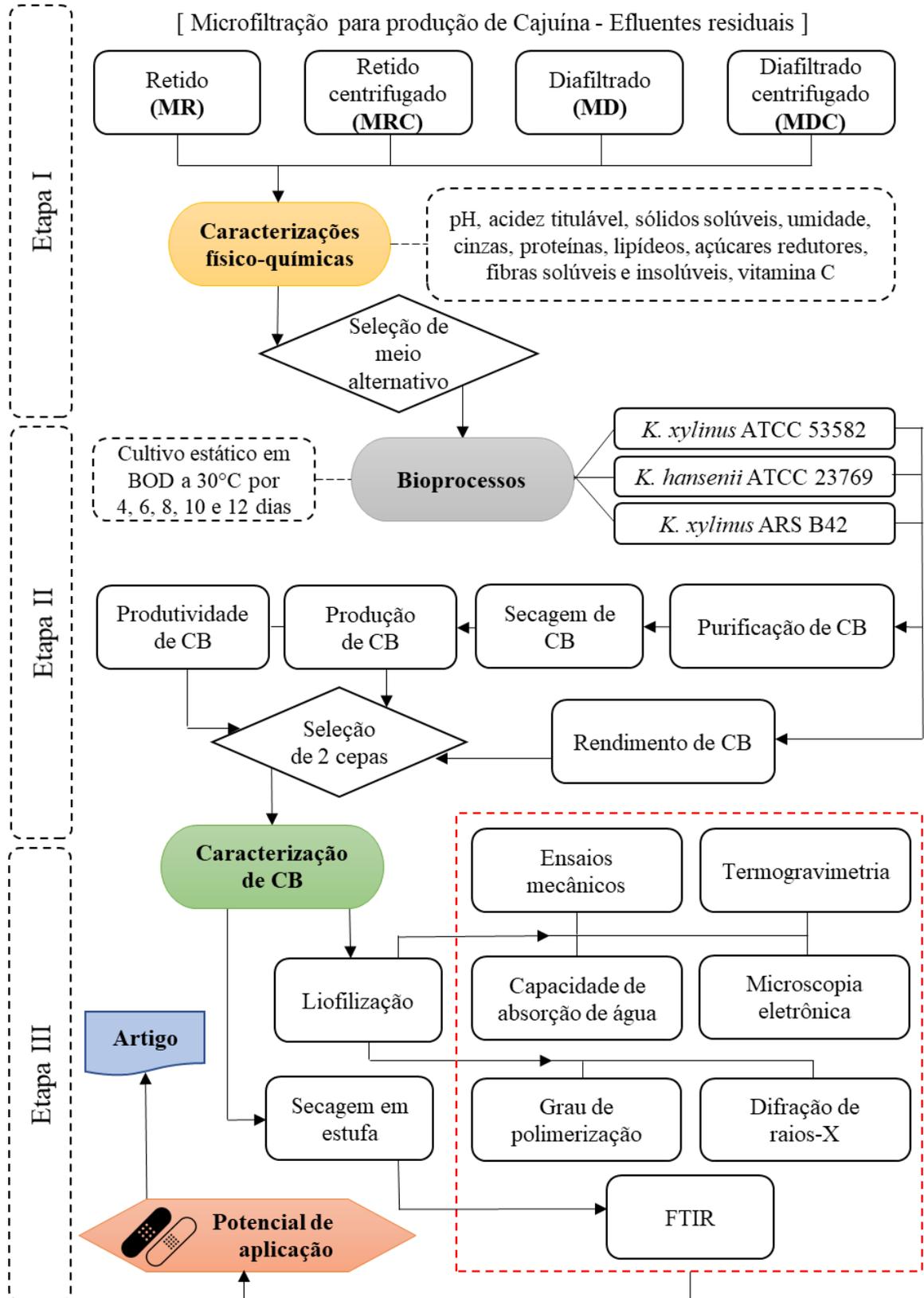
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em três etapas principais, representadas conforme Figura 5.

### 4.1 Efluentes residuais de cajuína

Os efluentes residuais da produção de cajuína foram gentilmente cedidos por agroindústria produtora de cajuína localizada no Estado do Ceará (Brasil), armazenados em recipientes plásticos e mantidos à  $-8^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização. Para a caracterização foram aproveitados o efluente retido na membrana (MR) e o efluente diafiltrado (MD) resultante da lavagem da membrana com água, assim como estes após centrifugação, efluente retido centrifugado (MRC) e efluente diafiltrado centrifugado (MDC).

Figura 5. Fluxograma geral das etapas experimentais para produção de CB em meio alternativo residual de cajuína. Etapa I: Caracterização físico-química dos meios, Etapa II: Bioprocessos para obtenção de CB e Etapa III: Caracterização de CB produzida.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

## 4.2 Caracterização dos efluentes residuais de cajuína e meio sintético

Para a caracterização físico-química, amostras dos efluentes residuais de cajuína e do meio sintético HS foram submetidas as determinações realizadas em quintuplicatas. Os teores de umidade (método 925.10) e cinzas (método 923.03) foram realizados de acordo com a metodologia indicada pela AOAC (2016). A acidez titulável foi quantificada de acordo com o método da AOAC (2016) e expressa em gramas de ácido málico por 100 g de amostra; o pH foi determinado a partir de leitura em pHmetro digital (Mettler Toledo, modelo F20, Ohio, EUA) calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 (AOAC, 2016); teor de sólidos solúveis foi medido segundo método em Refratômetro digital (Atago, modelo Pocket refractometer PAL-1, Tóquio, Japão) (AOAC, 2016); proteína por combustão, segundo o método de DUMAS em equipamento Analizador de Nitrogênio/Proteína NDA 701 Dumas (VELP, 2019), utilizando EDTA como padrão, com base no método da AOAC 992.23 (AOAC, 2016) e lipídios pelo método nº Am 5-04 da American Oil Chemists' Society (AOCS, 2005), usando o sistema de extração sob alta pressão e alta temperatura em equipamento XT-15 Ankom (ANKON Technology Corporation, 2009). Açúcares redutores totais (glicose e frutose) foram determinados pelo método DNS (MILLER, 1959). Os teores de fibra dietética alimentar (fração insolúvel – FDI e fração solúvel – FDS) foram determinados de acordo com o método 991.43 da AOAC (2010), utilizando analisador automático de fibra alimentar TDF da ANKON (ANKON Technology Corporation). A fibra alimentar total (FDT), pela soma das frações insolúvel e solúvel, como preconiza o mesmo método.

### 4.2.1 Procedimento cromatográfico

As concentrações de ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico e vitamina C total foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) conforme Sánchez-Mata et al (2000), usando DL-ditiotreitól como agente redutor. A solução extratora foi preparada com ácido metafosfórico 3% (m.v<sup>-1</sup>) e ácido acético 8% (v.v<sup>-1</sup>).

O equipamento utilizado foi um Shimadzu Proeminance modelo LC20A, com um detector de foto-diodos (PDA) e uma coluna de fase reversa do tipo C18 (C18 Hypersil ODS stainless) de 25 cm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 5 µm de tamanho de partículas, com detecção no comprimento de onda de 190 a 400 nm, empregando um volume de 10 µL com taxa de fluxo de 1mL.min<sup>-1</sup> e forno a 30 °C. A eluição foi realizada no modo isocrático, tendo água com ácido sulfúrico 0,01% (v.v<sup>-1</sup>) como fase móvel, impelida pela coluna

durante 10 minutos. A limpeza da coluna foi realizada com metanol (grau HPLC) durante 5 minutos e o equilíbrio da coluna por mais 5 minutos. O tempo de corrida de cada amostra foi de 17 minutos.

### 4.3 Microrganismos e meios de cultura

Cepas de *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582, *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 e *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 foram utilizadas para produção de CB. O meio sintético HS (MHS) padrão apresenta a seguinte composição (g.L<sup>-1</sup>): glicose – 20, peptona – 5, extrato de levedura – 5, fosfato dissódico (anidro) – 2,7 e ácido cítrico – 1,5 (HESTRIN e SCHRAMM, 1954), enquanto os meios alternativos de efluente residuais de caju, sem tratamento ou suplementação, foram previamente caracterizados e os resultados estarão mais adiante neste trabalho. Para os experimentos foram utilizados frascos Schott de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura, esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

### 4.4 Produção de CB

Na etapa de pré-inóculo as bactérias foram subcultivadas de tubos mantidos em estoque, em meio HS, para placas de petri contendo 25 mL do meio HS ágar e incubadas em estufa BOD (biochemical oxygen demand) por 48 h a 30 °C. Após incubação foi realizada a etapa de preparo do inóculo, onde a biomassa de células formada na placa foi transferida para frasco Schott de 250 mL contendo 100 mL de meio HS caldo, e incubada novamente nas mesmas condições. Para manter um padrão de biomassa celular, a densidade óptica, no comprimento de onda de 600 nm, foi mantida em 5 para todos os experimentos feitos a partir do mesmo inóculo. Na etapa de inoculação, frascos Schott de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura HS ou meio residual de cajuína, foram inoculados utilizando 10% v.v<sup>-1</sup> do inóculo previamente preparado e incubados em estufa BOD à 30 °C em diferentes intervalos de tempo (4, 6, 8, 10 e 12 dias) e cultivo estático.

## 4.5 Purificação de CB

As membranas produzidas foram lavadas em água corrente e submetidas à purificação sendo inicialmente submersas em água a 100 °C por 1 h e em solução alcalina NaOH 2% m.v<sup>-1</sup> a 80 °C por 1 h sucessivas vezes (KONGRUANG, 2008) até completa remoção de células e resíduos incorporados na membrana de CB. Em seguida as membranas foram mantidas em água à temperatura ambiente até atingirem pH 7. A purificação é concluída após completa remoção residual da solução utilizada no processo, que é garantida pela neutralização do pH e aspecto visual branco translucido da membrana.

## 4.6 Determinações analíticas do bioprocesso

### 4.6.1 Produção, produtividade e umidade de CB

Membranas de CB purificadas foram submetidas a secagem em balança de infravermelho (Marte – ID2000), a 170 °C, para obtenção da quantidade de massa seca de CB e posterior cálculo da umidade, produção e produtividade do processo, de acordo com as Equações 1, 2 e 3, respectivamente:

$$Umidade (\%) = 100 - \left( \frac{muCB - msCB}{muCB} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

$$Produção (g.L^{-1}) = \frac{msCB}{Vm} \quad (2)$$

$$Produtividade (g.L^{-1}.d^{-1}) = \frac{msCB}{Vm \cdot t} \quad (3)$$

Onde  $msCB$  é a massa seca de CB, em gramas, obtida por secagem em balança de infravermelho;  $muCB$  é a massa úmida de CB, em gramas, obtida em balança analítica,  $Vm$  é o volume do meio de cultura utilizado, em litros, e  $t$  é a quantidade de dias que durou o cultivo.

#### 4.6.2 Rendimento em relação ao consumo de substrato

Para determinação do percentual de açúcares consumidos no processo os meios fermentados foram filtrados em membrana de 0,22 µm para separação das células. O rendimento foi calculado pelo método DNS, conforme a Equação 4, (CARREIRA et al., 2011):

$$Rendimento (\%) = \frac{\left(\frac{msCB}{Vm}\right)}{Si - Sf} \cdot 100 \quad (4)$$

Onde *msCB* é a massa seca de celulose produzida (g); *Vm* é o volume de meio (L); *Si* é a concentração inicial de substrato (g.L<sup>-1</sup>) e *Sf* é a concentração final de substrato (g.L<sup>-1</sup>) após o cultivo.

#### 4.7 Caracterização de CB

Membranas de CB foram produzidas por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 e *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 no meio alternativo MRC e no meio sintético MHS, em diferentes tempos de cultivo, nas condições otimizadas em termos de produtividade do processo. Em seguida foram submetidas ao processo de secagem em estufa (50 °C, 24 h), para as análises de Ensaios mecânicos (EMIC) e por liofilização (Beta 1-8 LSCbasic, Christ) para as análises de Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), Difração de raios-X (DRX), Termogravimetria (TGA), Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Grau de polimerização (GP) e Capacidade de absorção de água (CAA).

##### 4.7.1 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<sup>-1</sup>, faixa de leitura de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> e 32 varreduras. Os espectros foram obtidos com CB na forma de pastilhas de KBr contendo 5% (m.m<sup>-1</sup>) de amostra.

#### 4.7.2 Termogravimetria (TGA)

As medidas termogravimétricas foram realizadas utilizando amostras liofilizadas de CB (~ 4 mg) em equipamento PerkinElmer® modelo STA 6000 operando numa faixa de temperatura de 50 a 600 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup>, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 40 mL.min<sup>-1</sup>.

#### 4.7.3 Ensaios mecânicos (EMIC)

Ensaio de tração foram realizados em máquina universal de ensaios (modelo EMIC DL3000) utilizando corpos de prova retangulares (60 mm x 10 mm) obtidos de CB seca em estufa (50 °C, 24 h). A espessura dos corpos de prova foi medida em micrômetro (Mitutoyo QuantunMike IP65) e estes foram mantidos em dessecador sob umidade controlada (~ 50%). Os ensaios foram realizados em quintuplicatas 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<sup>-1</sup> e carga aplicada de 500 N (ou 50 kgf), para determinação dos valores de resistência a tração, tensão na ruptura e módulo de Young.

#### 4.7.4 Capacidade de absorção de água (CAA)

As análises de absorção de água foram realizadas em triplicata utilizando amostras de CB liofilizadas e cortadas (2 cm x 2 cm). As amostras foram submersas em béqueres contendo 50 mL de água destilada e submetidas a sucessivas pesagens até apresentar valor de massa constante. A CAA foi determinada pela Equação 5:

$$CAA (\%) = \left[ \frac{(m_{CBf} - m_{CBi})}{m_{CBi}} \right] \cdot 100 \quad (5)$$

Onde  $m_{CBi}$  é massa inicial (g) do corpo de prova de CB antes do intumescimento em água e  $m_{CBf}$  é a massa final (g) do corpo de prova de CB após a análise (SHEZAD et al., 2010).

#### 4.7.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

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, encaminhadas ao microscópio eletrônico de varredura MEV Quanta 450-FEG (FEI) e visualizadas sob uma aceleração de voltagem de 15 kV, em diferentes aumentos. As medidas de diâmetros das fibras foram obtidas pelo software “ImajeJ”.

#### 4.7.6 Grau de polimerização (GP)

Em sala com temperatura controlada a 25 °C, 0,01 g de CB liofilizada foi adicionada à 25 mL de água destilada e 25 mL de solução de cobre-etilenodiamina 1,0 mol.L<sup>-1</sup>, seguida de agitação por 18 h para garantir completa dissolução da CB, conforme método TAPPI T 230-08. O tempo de escoamento foi medido com o auxílio de um viscosímetro Canon-Fenske e a viscosidade relativa ( $\eta_r$ ), viscosidade específica ( $\eta_{sp}$ ) e viscosidade intrínseca ( $\eta$ ), foram calculadas pelas Equações 6, 7 e 8 respectivamente (BOZTUĞ; BASAN, 2004). Enquanto o grau de polimerização (GP) foi determinado pela equação de Mark-Houwink-Sakurada para grau de polimerização superior a 950 (Equação 9) (BLANCO et al., 2018):

$$\eta_r = \frac{t}{t_0} \quad (6)$$

$$(7)$$

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 \quad (8)$$

$$\eta = \frac{\sqrt{2(\eta_{sp} - \ln \eta_r)}}{c} \quad (9)$$

$$\eta = 2,28 \cdot GP^{0,76}$$

Onde  $t$  é o tempo de escoamento da solução com celulose,  $t_0$  é o tempo de escoamento da solução de cobre-etilenodiamina (0,5 mol.L<sup>-1</sup>) sem celulose; e  $C$  é a concentração da solução de CB em g.mL<sup>-1</sup>.

#### 4.7.7 Difração de Raios-X (DRX)

Os gráficos de difração de DRX foram obtidos com difratômetro para amostras policristalinas modelo Xpert-Pro MPD – Panalytical, com tubo de Cu em 40 kV e 40 mA na escala  $2\theta$ . O intervalo angular utilizado foi de 10 a  $30^\circ$ , com uma velocidade de varredura de  $0,5^\circ/\text{min}$ . O índice de cristalinidade (IC), estimado pelo método proposto por Seagal et al., (1959), e o tamanho do cristalito (CrS), pela metodologia de Singhsa et al., (2018), foram calculados seguindo as Equações 10 e 11, respectivamente:

$$IC (\%) = \left[ \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right] \cdot 100 \quad (10)$$

$$CrS (nm) = \left( \frac{K \cdot \lambda}{FWHM \cdot \cos\theta} \right) \quad (11)$$

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- $K\alpha$ ,  $\lambda = 1,540562 \text{ \AA}$ ), como é o caso deste trabalho,  $I_{002}$  se localiza em  $2\theta \sim 22^\circ\text{-}23^\circ$  e  $I_{am}$  em  $2\theta \sim 14^\circ\text{-}17^\circ$  enquanto que para difratogramas obtidos com tubo de Co (radiação Co- $K\alpha$ ,  $\lambda = 1,788965 \text{ \AA}$ )  $I_{002}$  se localiza em  $2\theta \sim 25^\circ\text{-}26^\circ$  e  $I_{am}$  em  $2\theta \sim 21^\circ\text{-}22^\circ$ . K é o fator de forma (0,94),  $\lambda$  é o comprimento de onda do raio-x ( $1,540562 \text{ \AA}$ ), FWHM é a largura total em metade da altura do pico  $I_{002}$  e  $\theta$  é o ângulo de Bragg referente ao pico  $I_{002}$  (CHAGAS, 2018; DEMUNER, 2017; SEGAL et al., 1959).

#### 4.8 Análises estatísticas

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada aos dados das análises de caracterização dos efluentes e produção e caracterização de CB, para avaliação de diferença estatística significativa entre os tratamentos. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5% de probabilidade através do software Statistica versão 10.0.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização dos efluentes residuais de cajuína e meio sintético

Os resultados das caracterizações físico-químicas para os efluentes residuais da produção de cajuína e meio sintético HS estão apresentados na Tabela 3. Por se tratar de meios alternativos de efluentes residuais que nunca foram caracterizados, não foi possível encontrar na literatura outros trabalhos para fazer comparações mais precisas. O MHS, com componentes em quantidades quimicamente definidas, já é bem reportado na literatura como meio padrão para produzir CB, mesmo assim, não foram encontrados outros trabalhos que realizaram a caracterização físico-química mais detalhada desse meio, assim como foram feitos com os procedimentos e técnicas apresentados nesta tese.

O pH dos diferentes efluentes de caju não apresentou diferença estatística significativa entre as amostras analisadas, com valores entre 4,2 (MR) e 4,4 (MDC), que estão abaixo do pH do meio sintético, mas em concordância com a exigência normativa do regulamento técnico de padrões de identidade e qualidade para suco de caju ou cajuína, presente na legislação brasileira (BRASIL, 2018). Resultados semelhantes foram relatados por Braga et al., (2021), quando obtiveram pH 4,4 em análise sensorial de pedúnculos de caju e por Rodríguez et al., (2017) e Kaprasob et al., (2018), com pH 4,7 e 4,0, respectivamente, para suco de caju. A acidez titulável dos efluentes residuais variou entre 3,3 e 3,6 % nos substratos que ficaram retidos na membrana, enquanto nos meios diafiltrados foi um pouco inferior, em torno de 1,8 %. Estes resultados são superiores ao do MHS e aos encontrados por Freitas et al., (2020) na acidez do suco de clones de cajueiro (0,1 a 0,4%) e aos de Silva et al., (2020) com 1,4 % para suco de caju clarificado pelo método tradicional em gelatina. Castro et al., (2007) realizou a clarificação de suco de caju pela tecnologia de membranas e obteve entre 0,1 e 0,2 % de acidez, evidenciando que os substratos avaliados neste trabalho, principalmente MR e MRC, apresentam excelentes percentuais de acidez titulável. Em relação aos sólidos totais, MR e MRC também foram superiores (11,6 e 11,3 °Brix, respectivamente), apresentando valores acima do mínimo (10 °Brix) estabelecido pela legislação para suco clarificado de caju (BRASIL, 2018) e do que foi obtido por Castro et al., (2007) no processo de clarificação de suco de caju por ultrafiltração e microfiltração (9,8 °Brix). Outros trabalhos também relatam teor de sólidos solúveis totais presentes em suco de caju na faixa entre 10,0 e 13,0 °Brix (ADOU et al., 2012; CIANCI et al., 2005; SILVA et al., 2020). MD (4,2 °Brix) e MDC (3,9 °Brix) possuem menos sólidos solúveis devido a serem substratos residuais da lavagem da membrana,

quando, conseqüentemente, grande parte dos componentes do caju já foram diluídos ou concentrados nos efluentes das etapas anteriores de separação (permeado ou retido). Mesmo assim, se equiparam a quantidade presente em MHS (3,5 °Brix).

Não ocorreu diferença significativa entre as amostras nas análises de umidade, e os percentuais foram altos, entre 91,0 e 97,0 g.100g<sup>-1</sup>, o que já era esperado devido ao estado líquido dos substratos. Santana et al., (2020) também relata umidades altas, na faixa de 92,0 a 97,0 g.100g<sup>-1</sup> em amostras de suco de caju clarificado, assim como Silva et al., (2020), com 88,0 g.100g<sup>-1</sup>. O teor de cinzas representa micronutrientes e alguns minerais presentes nas amostras, sendo fator diferencial nos processos fermentativos, influenciando positivamente a atividade da bactéria (SIQUEIRA et al., 2008). MR e MRC apresentaram 0,2 e 0,1 g.100g<sup>-1</sup> de cinzas, próximo ao que foi descrito por Souza et al., (2020), 0,3 g.100g<sup>-1</sup>, e Santana et al., (2020), 0,4 g.100g<sup>-1</sup> para suco de caju. MD e MDC não apresentaram cinzas em suas composições, o que aconteceu em razão de apresentarem também menor teor de sólidos totais quando comparados aos MR e MRC. Apenas os substratos da retenção na membrana apresentaram proteínas em sua composição. MRC com 0,4 % e MR com 0,3 % de proteínas se equiparam a alguns estudos de caracterização de suco de caju presentes na literatura, que apontam variação do teor de proteínas entre 0,2 e 1,2 %, dependendo de alterações sazonais da espécie (SILVA et al., 2020; SANTANA et al., 2020). MD e MDC não apresentam proteínas e isso pode ser atribuído a uma grande quantidade de água utilizada durante a lavagem da membrana de separação ao final do ciclo, promovendo a diluição das proteínas do meio, e ao fato destas proteínas não se aderirem a membrana utilizada, ficando concentradas apenas nos efluentes retidos no processo de separação (MR e MRC). A presença de proteínas é essencial em processos microbianos por representarem fonte de nitrogênio para células bacterianas (SIQUEIRA et al., 2008). Vale salientar que a maior quantidade de cinzas e proteínas em MHS acontece por se tratar de um meio quimicamente definido, que já apresenta essas fontes de suplementação em sua composição.

Tabela 3. Características físico-químicas de substratos residuais alternativos decorrentes do processo de produção de cajuína microfiltrada comercial e do meio sintético HS.

Tipo de caracterização	SUBSTRATOS				
	MR	MRC	MD	MDC	MHS
pH	4,2 <sup>b</sup> ± 0,1	4,3 <sup>b</sup> ± 0,1	4,4 <sup>b</sup> ± 0,1	4,4 <sup>b</sup> ± 0,1	6,0 <sup>a</sup> ± 0,1
Acidez titulável (%)	3,6 <sup>a</sup> ± 0,1	3,3 <sup>a</sup> ± 0,1	1,8 <sup>b</sup> ± 0,1	1,8 <sup>b</sup> ± 0,1	0,2 <sup>c</sup> ± 0
Sólidos solúveis (°Brix)	11,6 <sup>a</sup> ± 0,1	11,3 <sup>a</sup> ± 0,1	4,2 <sup>b</sup> ± 0,1	3,9 <sup>b</sup> ± 0,1	3,5 <sup>b</sup> ± 0,1
Umidade (g.100g <sup>-1</sup> )	91,0 <sup>a</sup> ± 0,4	92,3 <sup>a</sup> ± 0,7	96,8 <sup>a</sup> ± 0,2	97,0 <sup>a</sup> ± 0,2	96,9 <sup>a</sup> ± 0,2
Cinzas (g.100g <sup>-1</sup> )	0,2 <sup>b</sup> ± 0	0,1 <sup>b</sup> ± 0	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0,3 <sup>a</sup> ± 0
Proteínas (%)	0,3 <sup>c</sup> ± 0	0,4 <sup>b</sup> ± 0	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	1,3 <sup>a</sup> ± 0,1
Lipídeos (g.100g <sup>-1</sup> )	0,3 <sup>a</sup> ± 0	0,1 <sup>b</sup> ± 0	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
Açúcares redutores totais (g.L <sup>-1</sup> )	104,0 <sup>a</sup> ± 0,2	76,0 <sup>b</sup> ± 0,2	32,1 <sup>c</sup> ± 0,1	29,6 <sup>c</sup> ± 0,2	20,0 <sup>d</sup> ± 0,2
Fibra solúvel (%)	1,6 <sup>a</sup> ± 0,1	1,6 <sup>a</sup> ± 0,1	1,3 <sup>a</sup> ± 0,1	1,3 <sup>a</sup> ± 0,1	0 <sup>b</sup>
Fibra insolúvel (%)	0,8 <sup>a</sup> ± 0,1	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
Fibra total (%)	2,4 <sup>a</sup> ± 0,1	1,6 <sup>b</sup> ± 0,1	1,3 <sup>b</sup> ± 0,1	1,3 <sup>b</sup> ± 0,1	0 <sup>c</sup>
Vitamina C (mg.100g <sup>-1</sup> )	157,3 <sup>a</sup> ± 5,0	152,6 <sup>a</sup> ± 4,0	41,4 <sup>b</sup> ± 1,0	41,8 <sup>b</sup> ± 3,0	-
Ácido dehidroascórbico (mg.100g <sup>-1</sup> )	8,1 <sup>a</sup> ± 1,0	4,8 <sup>a</sup> ± 1,0	5,2 <sup>a</sup> ± 1,0	6,2 <sup>a</sup> ± 1,0	-

\* MR: Meio efluente de cajuína retido na membrana; MRC: Meio efluente de cajuína retido na membrana e centrifugado; MD: Meio efluente de cajuína diafiltrado; MDC: Meio efluente de cajuína diafiltrado e centrifugado; MHS: meio sintético HS. Valores seguidos de letras diferentes, na mesma linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

Em relação ao teor de lipídeos, maiores quantidades de gordura bruta estão presentes no MR ( $0,3 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ); enquanto MRC, MD, MDC e MHS, com baixos percentuais de lipídeos (0 a  $0,1 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ), não diferiram estatisticamente. A perceptível diminuição da quantidade de gordura bruta do MR para o MRC evidencia o potencial arraste de lipídeos ocasionado pela centrifugação do meio, e isso acontece em consequência ao fato de muitos lipídeos estarem associados as fibras do suco de caju. Possivelmente, em razão do tamanho dos poros da membrana de separação, maior parte da gordura ficou retida no processo de microfiltração, o que justifica o discreto teor de lipídeos presentes em MD e MDC. Santana et al., (2020) e Silva et al., (2020) relatam composição de lipídeos entre  $0,08$  e  $0,4 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  em suco de caju, resultados que estão em acordo com os deste trabalho.

O teor de açúcares presentes no caju geralmente é avaliado em termos de açúcar total e, pelo regulamento técnico dos padrões de qualidade e identidade (BRASIL, 2018), deve apresentar o valor máximo de  $15,0 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ , seja para suco de caju natural, clarificado ou cajuína. Existem mais açúcares totais no MR ( $104,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) e MRC ( $76,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) em relação ao MD ( $32,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) e MDC ( $29,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), evidenciando que a maior parte dos açúcares do suco de caju foi retida pelos poros da membrana. A diferença estatística entre MR e MRC é atribuída aos açúcares que também estão associados as fibras do suco de caju e são decantados pela centrifugação, comportamento não observado entre MD e MDC devido a pequena parcela de açúcares que é removida da membrana na etapa final de lavagem. Elevado percentual de açúcares ( $86,8$  a  $88,8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), assim como em MR e MRC, são relatados por Castro et al., (2007) em estudos com suco de caju clarificado pela tecnologia das membranas. Outros autores apresentam menor teor de açúcares, na faixa entre  $0,4$  e  $47,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , para suco de caju natural ou clarificado (ADOU et al., 2012; RODRÍGUEZ et al., 2017; KAPRASOB et al., 2018; SILVA et al., 2020). Os açúcares representam a principal fonte de carbono desses meios e estão presentes em todos eles. O meio sintético MHS, tendo como fonte principal a glicose em quantidade quimicamente definida ( $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), apresenta menor quantidade de açúcares que os meios alternativos avaliados.

Os percentuais de fibras solúveis ( $1,3$  a  $1,6\%$ ) não mostraram diferença estatística entre os tratamentos com os meios residuais de caju, representando que grande quantidade de fibras foi retida pelos poros da membrana, assim como foi desprendida da membrana apenas na etapa de lavagem. No entanto, fibras do tipo insolúvel estavam presentes ( $0,8 \%$ ) apenas no MR, o que indica que todas as fibras em MRC, MD e MDC são classificadas como solúveis. Por consequência, em termos de fibras totais do substrato, MR foi estatisticamente superior ( $2,4 \%$ ) aos demais tratamentos, já que apresentou os dois tipos de fibras, resultado superior ao

relatado por Kannan et al., (2021) com percentual de 0,9 % de fibras totais no suco de caju e inferior aos de Duarte et al., (2017), com 3,5 % de fibras totais no extrato agroindustrial de caju, sendo a maioria delas (89,0 %) do tipo insolúvel. No entanto, fibras insolúveis são fermentadas lentamente e de maneira incompleta por alguns tipos de bactérias (BERNAUD; RODRIGUES, 2013; RAMASAMY et al., 2014), e no caso da produção de CB, elas interferem no emaranhado das fibras na estrutura da celulose, o que acaba não sendo tão vantajoso para o bioprocesso. Nos métodos de extração e separação de suco de caju, onde são empregadas técnicas mais brandas que não provocam dilaceração das fibras, como é o caso da tecnologia de membranas de separação, o meio apresentará maior quantidade de componentes aderidos nas fibras, tais como açúcares, lipídeos e sólidos totais (SILVA NETO; ABREU; PAIVA, 2009). Assim, as diminuições nos percentuais de açúcares, lipídeos e fibras observadas em MRC ocorreram em consequência destes componentes estarem associados as fibras do suco de caju, principalmente nas insolúveis, e serem decantados junto com elas durante a centrifugação, etapa que foi crucial para melhorar a qualidade do meio alternativo, conforme os resultados relatados.

Os percentuais de vitamina C (ácido ascórbico) em MR e MRC, 157,3 e 152,6 mg.100g<sup>-1</sup>, respectivamente, são elevados e estão de acordo com o padrão de qualidade para suco de caju clarificado, que exige o mínimo de 60,0 mg.100mg<sup>-1</sup>. Estes resultados se equiparam aos 155,0 mg.100g<sup>-1</sup> relatados por Castro et al., (2007) para suco de caju ultrafiltrado e aos 162,0 mg.100g<sup>-1</sup> de Cianci et al., (2005) para suco de caju clarificado. MR e MRC possuem mais vitamina C do que alguns trabalhos da literatura que caracterizaram suco de caju e encontraram valores entre 30,6 e 137,0 mg.100g<sup>-1</sup> (SILVA et al., 2020; SANTANA et al., 2020; RODRÍGUEZ et al., 2017). Altos percentuais de vitamina C são importantes em processos fermentativos por manterem a preservação da viabilidade celular de determinadas bactérias (SANTANA et al., 2020), facilitando o aumento de rendimento do processo. Já no caso de MD e MDC, a presença do ácido ascórbico foi bem mais discreta (entre 41,4 e 41,8 mg.100g<sup>-1</sup>), e isso pode ser atribuído a diluição dos componentes do meio durante a etapa de lavagem da membrana e a facilidade de degradação desses componentes que são especialmente suscetíveis a oxidação química e enzimática, podendo, inclusive, serem convertidos em ácido dehidroascórbico (ADETUYI; IBRAHIM, 2014). O ácido dehidroascórbico, forma oxidada do ácido ascórbico (GNOUMOU et al., 2022), está presente nas amostras em quantidades bem pequenas (entre 4,8 e 8,1 mg.100g<sup>-1</sup>), sem diferença estatística significativa entre os tratamentos, indicando que pequena parcela da vitamina C presente no meio sofreu degradação. No MHS esse papel é desempenhado pelo ácido cítrico presente em sua formulação (1,5 g.L<sup>-1</sup>), que vai contribuir como promotor da biossíntese de celulose (LI et al., 2012; UDHARDT;

HESSE; KLEMM, 2005).

Baseado nos resultados apontados na Tabela 3 e comparações da literatura com produtos comerciais de caju, os meios avaliados apresentam potencial como substrato para bactérias produtoras de celulose bacteriana e outros biopolímeros, em razão dos seus componentes constituintes, principalmente dos açúcares presentes. MR e MRC possuem características mais atrativas para processos fermentativos em razão de maior quantidade de sólidos solúveis totais, proteínas, açúcares redutores, fibras e vitamina C, porém devido a menor quantidade de lipídeos, ausência de fibras insolúveis e maior teor proteico, MRC foi escolhido como o meio alternativo para produção de CB neste trabalho, sem necessidade de algum tipo de pré-tratamento ou suplementação, já que constitui fontes de carbono, nitrogênio e minerais adequadas para processos fermentativos para obtenção de CB.

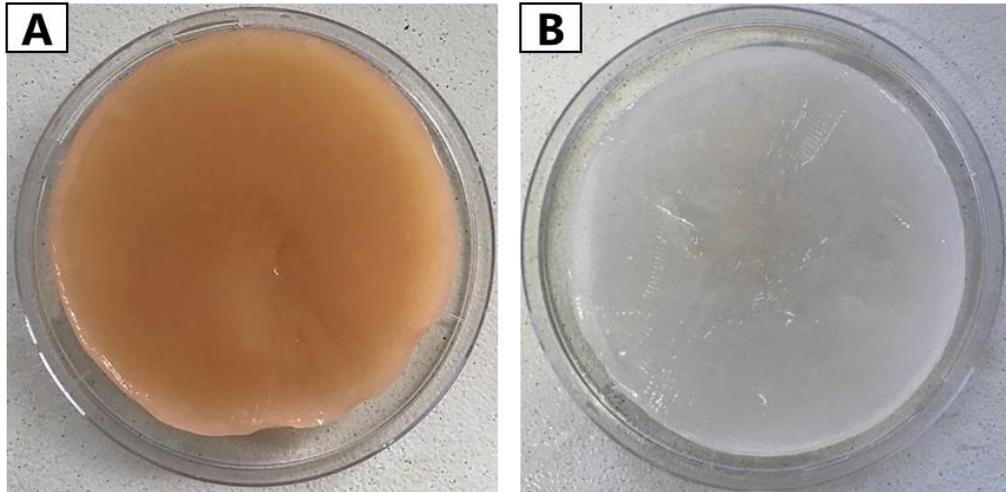
## **5.2 Obtenção de celulose bacteriana em meio alternativo**

### **5.2.1 Purificação de CB**

A utilização de NaOH na etapa de purificação das membranas de CB produzidas foi eficaz, sem a necessidade de outros agentes de branqueamento, tais como lauril sulfato de sódio ou peróxido de hidrogênio, que são comumente reportados na literatura para purificar CB (CHAGAS, 2018; KESHK; RAZEK; SAMEISHIMA, 2006; LIMA et al., 2017). A baixa concentração do reagente não provocou alteração do tipo de celulose obtida e garantiu a eliminação de possíveis materiais residuais associados as membranas, conforme será discutido nos resultados das análises de FTIR, TGA e DRX.

A coloração da CB após a fermentação e o número de lavagens com o agente purificador variou conforme o tempo e o meio de cultivo: quanto mais tempo para produção da membrana pela bactéria, mais “alaranjada” a sua cor e mais demorada a sua etapa de purificação. Em geral, para garantir completa purificação da CB, foram necessárias entre 2 e 4 lavagens sucessivas com NaOH para as membranas produzidas no meio sintético e entre 2 e 5 para as do meio alternativo. A CB é considerada purificada quando apresenta um aspecto visual branco translucido, que pode apresentar variação do grau de transparência dependendo da espessura e quantidade de massa presente na membrana, além de pH neutro, indicativo de que os resíduos químicos da purificação foram removidos. Na Figura 6 é apresentado o aspecto visual da CB de *K. xylinus* ATCC 53582 em MRC antes e após a purificação e neutralização da membrana. O aspecto visual foi semelhante para as demais cepas avaliadas.

Figura 6. Aspecto visual da membrana de CB produzida por *K. xylinus* ATCC 53582 aos 10 dias de cultivo estático em meio residual de caju retido e centrifugado (MRC), antes (A) e após (B) etapa de purificação com NaOH 2% (m.v<sup>-1</sup>) e neutralização com água.

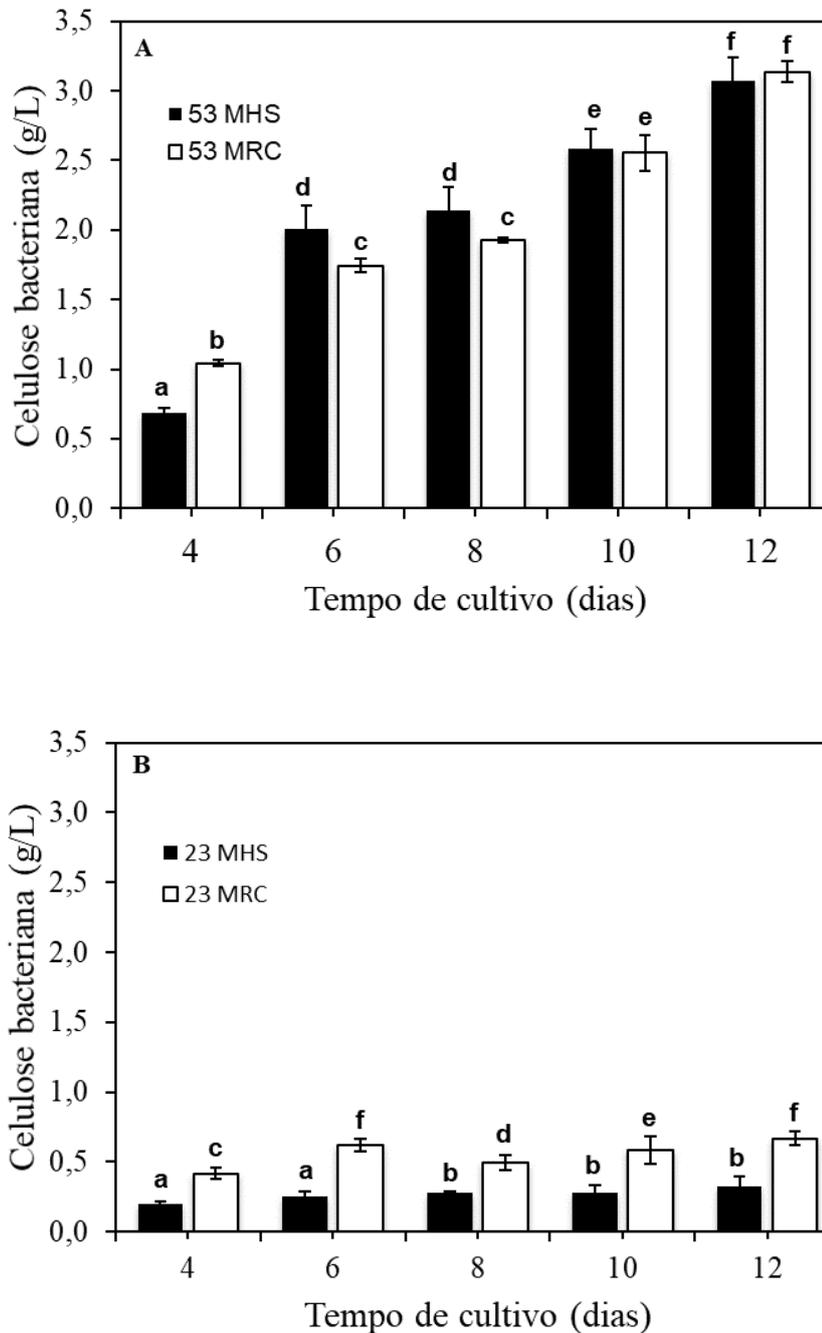


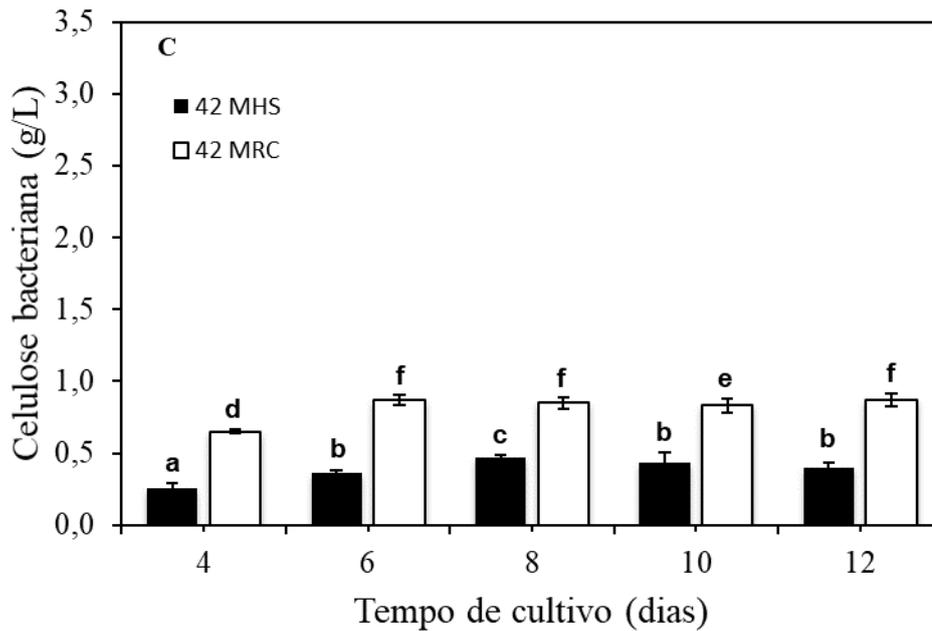
Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

### 5.2.2 Produção de CB

Os resultados de produção de CB (g.L<sup>-1</sup>) estão apresentados na Figura 7. A produção de CB por *K. xylinus* ATCC 53582 (Figura 7A), em geral, foi maior que pelas demais bactérias avaliadas, e aumentou conforme o tempo de cultivo nos dois tipos de meios investigados. Melhor potencial inicial foi apresentado em MRC com 1,0 g.L<sup>-1</sup> de CB no quarto dia de cultivo. MHS possibilitou maior quantidade de CB produzida entre os dias 6 e 8, com valores superiores aos do MRC no mesmo período de tempo avaliado, porém a produção máxima pela cepa foi alcançada nos últimos dias do cultivo, quando MHS e MRC apresentaram resultados equivalentes, sem diferença estatística significativa, de 3,0 e 3,1 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. *K. xylinus* ATCC 53582 é naturalmente conhecida como uma cepa de alta produção de CB (FLOREA et al., 2016) e, por pertencer ao gênero *Komagataeibacter*, apresenta certa capacidade de metabolizar taninos, o que explica sua capacidade de adaptação e crescimento em meios agroindustriais (USHA RANI; ANU APPAIAH, 2012).

Figura 7. Produção ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de membranas de celulose bacteriana em diferentes tempos de cultivo (4, 6, 8, 10 e 12 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC) por: A) *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (53), B) *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 (23) e C) *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (42). Letras iguais (a, b, c, d, e, f) não apresentam diferenças estatisticamente significativas  $\alpha= (0,05)$ .





Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

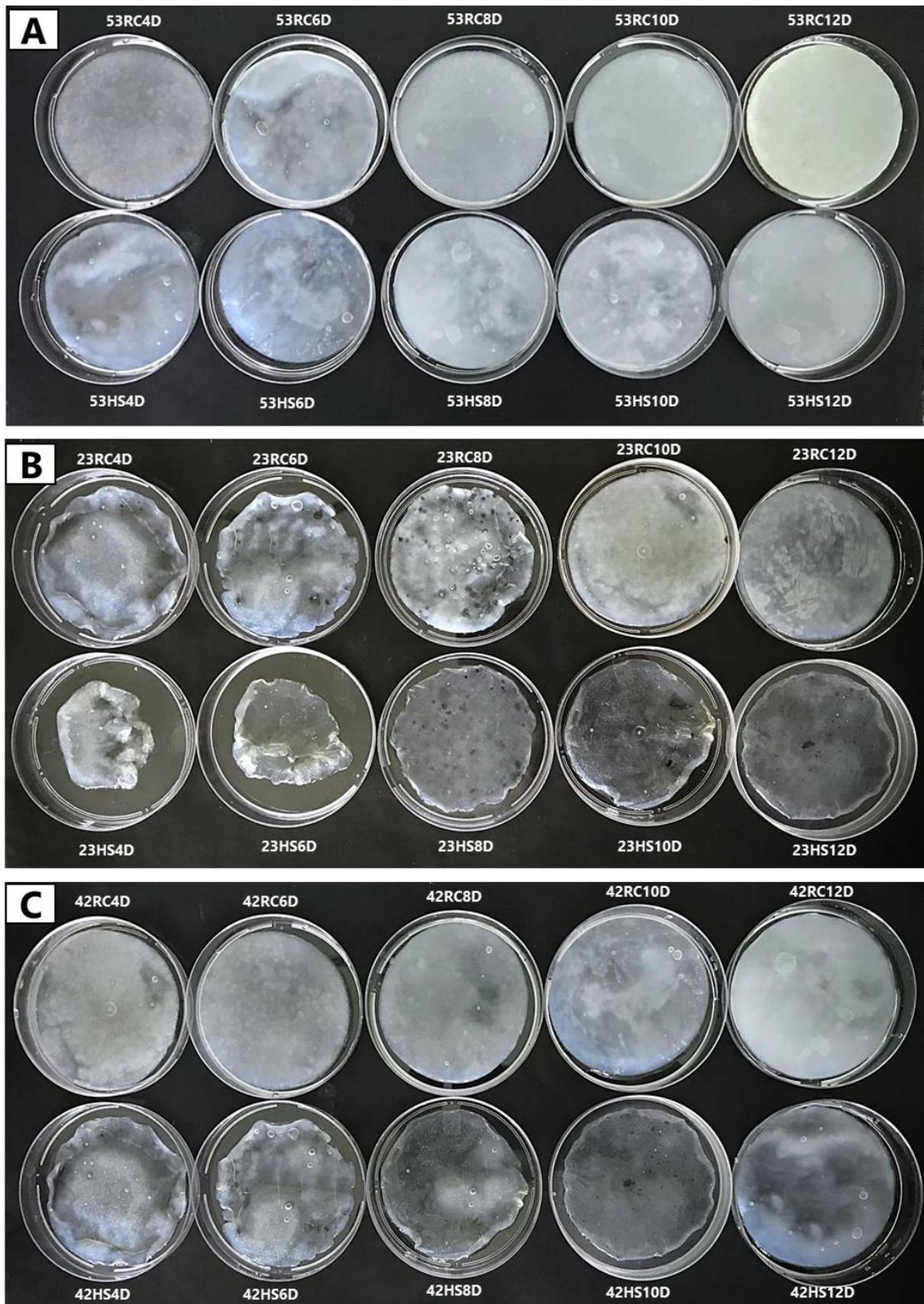
*K. hansenii* ATCC 23769 (Figura 7B) e *K. xylinus* ARS B42 (Figura 7C) apresentaram perfil de produção semelhantes e, apesar de terem sintetizado menos CB, os resultados em MRC foram superiores em todos os tempos de cultivo avaliados, com produção máxima de 0,63 e 0,88 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, já no dia 6 de cultivo. Os valores mais altos de produção em MHS foram obtidos no dia 12 (0,31 g.L<sup>-1</sup>) para *K. hansenii* ATCC 23769 e no dia 8 (0,46 g.L<sup>-1</sup>) para *K. xylinus* ARS B42, produção até 50% menor que em MRC. Isso aconteceu, possivelmente, pois de acordo com Jozala et al., (2015), Lima et al., (2017) e Andriani et al., (2020), a presença de compostos antioxidantes no meio fermentativo favorece a produção de CB porque inibem a formação de ácido glucônico. Alguns trabalhos relatam aumento da produção de CB por bactérias *Komagataeibacter* quando vitamina C foi adicionada ao meio de cultivo, justamente em consequência do maior acúmulo de ácido glucônico nos tratamentos sem a presença desse componente (CIELECKA et al., 2021; KESHK, 2014; KUO et al., 2019). Como a vitamina C é um dos principais compostos do caju (K. F. LEITE et al., 2021) e está presente em alta concentração em MRC (152,6 g.100g<sup>-1</sup>), pode ter contribuído para os resultados nesse meio serem superiores aos do MHS. Vale salientar que até o final do cultivo nenhuma das três cepas apresentou significativa queda da produção de CB em MHS e MRC, o que possivelmente aconteceu em decorrência de açúcares a serem consumidos ainda estarem presentes no meio.

Considerando que MHS é um meio sintético formulado com as características nutricionais ideais para as bactérias produtoras de CB, a utilização de MRC como substrato foi

mais vantajosa para o processo, já que o meio não foi submetido a nenhum tipo de pré-tratamento ou suplementação, e possibilitou resultados equivalentes ou superiores para síntese do biopolímero.

Na Figura 8 é possível observar as diferenças e semelhanças entre as amostras do meio sintético em relação as do meio alternativo. As membranas produzidas por *K. xylinus* ATCC 53582 (Figura 8A) são visualmente iguais nos tratamentos para o mesmo tempo de cultivo, as quais vão alterando suavemente a coloração “branca translúcida” (mais próximo de um transparente) para “branca” (não transparente), de modo crescente do 4º ao 12º dia do cultivo. Isso acontece devido ao aumento da biomassa do produto que foi formada ao longo do bioprocessamento, e está diretamente relacionado com a espessura da membrana, logo, quanto maior a quantidade de massa de CB sintetizada, mais volumosa e menos translúcida será a membrana. Esse resultado visual confirma os dados de produção apresentados anteriormente, já que o desempenho de bioconversão de substrato em produto pela cepa super-produtora foi equivalente em ambos os meios de cultivo. No caso da *K. hansenii* ATCC 23769 (Figura 8B), os tratamentos em MRC apresentaram formação da membrana completa, o que é evidenciado pela ocupação de quase toda superfície da placa de petri, e apesar do aspecto mais translúcido transparente nas CBs dos tempos de cultivo iniciais, naquelas formadas entre o 10º e 12º dia já é possível notar uma maior quantidade de massa do produto. Em MHS as membranas se formaram completamente apenas a partir do 6º dia, porém com perfil de pouca massa de CB, já que a transparência do branco está bem evidente. Vale destacar a grande diferença das membranas sintetizadas nos tratamentos com meio alternativo em relação ao sintético, que também é comprovada pelos resultados gráficos da produção, onde essa cepa apresentou até três vezes mais CB em MRC. O melhor desempenho de *K. xylinus* ARS B42 (Figura 8C) para produção de CB, conforme foi discutido anteriormente nos gráficos, também é evidenciado nas características visuais das membranas, onde todos os tratamentos em MRC apresentaram coloração branca e pouco transparente, indicando maior quantidade de CB formada em comparação aos resultados em MHS, quando as membranas ficaram brancas e com maior transparência.

Figura 8. Membranas úmidas de celulose bacteriana produzidas por A) *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (53), B) *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 (23) e C) *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (42), em diferentes tempos de cultivo D (4, 6, 8, 10 e 12 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC).



Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

Poucos são os trabalhos na literatura que utilizaram caju e seus derivados como componentes do meio de cultivo para obtenção de CB. Souza et al., (2020) também avaliou a produção de CB por *K. xylinus* ATCC 53582 em suco de caju, porém suplementado com melão de soja ou extrato de levedura, e obteve 4,50 e 4,54 g.L<sup>-1</sup> de CB, respectivamente, valores superiores aos do meio HS padrão utilizado como controle. Pacheco et al., (2017) produziu CB com *K. rhaeticus* em meio HS modificado com exsudato ou goma de caju e obteve entre 2,3 e 2,8 g.L<sup>-1</sup>. GAYATHRY et al., (2020) alcançou até 16,22 g.L<sup>-1</sup> de CB em escala piloto utilizando um sistema com fermentador de jarra modificado e meio de suco de caju suplementado com extrato de levedura, ácido cítrico, hidrogenofosfato dissódico e alginato de cálcio. Porém nenhum deles utilizou o suco de caju na sua forma pura e sem suplementação como o MRC deste trabalho.

Outros estudos avaliaram diferentes resíduos ou subprodutos da agroindústria como fonte potencial de carbono e demais nutrientes para a produção de CB, por apresentarem composição adequada para o crescimento microbiano. Lima et al., (2017) produziu 3,38 g.L<sup>-1</sup> de CB utilizando suco de sisal suplementado com de extrato de levedura como meio de cultivo para *K. hansenii* ATCC 23769; Kurosumi et al., (2009) obteve 0,65 g.L<sup>-1</sup> com *Acetobacter xylinum* NBRC 13693 tendo suco de resíduos de laranja como meio de cultivo; Ciecholewska-Jusko et al., (2021), utilizando *K. xylinus* ATCC 53524, apresentou 4 g.L<sup>-1</sup> de CB em suco residual de batata; Castro et al., (2011) produziu 2,8 g.L<sup>-1</sup> com *Gluconacetobacter swingsii* sp em fermentação com suco da casca de abacaxi; Dhar et al., (2019) testou hidrolisado da palha de milho suplementado com diferentes fonte de nitrogênio e alcançou até 2,96 g.L<sup>-1</sup> de CB com *K. xylinus* ATCC 11142;

### **5.2.3 Rendimento de CB e consumo de substrato**

Em termos de rendimento do processo e consumo de açúcares do meio de cultivo (Tabela 4 e Figura 9, respectivamente), *K. xylinus* ATCC 53582 se destacou em relação as demais, apresentando melhores resultados no MHS em todos os tratamentos, onde atingiu até 44,7% de rendimento no dia 6 do cultivo e com apenas 40% dos açúcares consumidos. Em MRC o rendimento máximo alcançando foi de 15% no último dia de cultivo, com consumo de 30,3% dos açúcares inicialmente presentes no meio. *K. hansenii* ATCC 23769 e *K. xylinus* ARS B42 não diferiram estatisticamente entre os tratamentos, apresentando rendimentos entre 1,9 e 4,2% durante todo o cultivo, nos dois meios de cultura. Porém, quanto à concentração de açúcares ao final do processo, estes foram diminuindo conforme aumento do tempo de cultivo.

Até 80,4 % dos açúcares do MHS foram consumidos por *K. xylinus* ARS B42, enquanto no MRC o consumo foi de apenas 44,9% no último dia do cultivo. Para *K. hansenii* ATCC 23769 o consumo máximo foi de 37,6 % em MHS e apenas 35% em MRC.

Tabela 4. Rendimento (%) e percentual de açúcares consumidos (%) no processo de obtenção de membranas de celulose bacteriana por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (53), *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 (23) e *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (42) em diferentes tempos de cultivo (4, 6, 8, 10 e 12 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC). Letras iguais (a, b, c, d, e, f, g), para a mesma cepa, não apresentam diferenças estatisticamente significativas  $\alpha = (0,05)$ .

TC (dias)	Rendimento (%) - 53		Rendimento (%) - 23		Rendimento (%) - 42	
	MHS	MRC	MHS	MRC	MHS	MRC
4	26,2 <sup>c</sup> ± 0,9	4,2 <sup>a</sup> ± 0,9	2,8 <sup>a</sup> ± 0,1	3,1 <sup>a</sup> ± 0,4	1,9 <sup>a</sup> ± 0,2	2,7 <sup>a</sup> ± 0,1
6	44,7 <sup>g</sup> ± 0,9	7,5 <sup>b</sup> ± 1,2	3,9 <sup>a</sup> ± 0,3	4,0 <sup>a</sup> ± 0,3	2,2 <sup>a</sup> ± 0,1	3,6 <sup>a</sup> ± 0,1
8	33,9 <sup>f</sup> ± 0,6	7,7 <sup>b</sup> ± 0,4	4,0 <sup>a</sup> ± 0,1	3,1 <sup>a</sup> ± 0,1	3,0 <sup>a</sup> ± 0,1	3,4 <sup>a</sup> ± 0,2
10	35,5 <sup>f</sup> ± 0,5	14,0 <sup>c</sup> ± 0,9	4,0 <sup>a</sup> ± 0,2	2,5 <sup>a</sup> ± 0,4	2,6 <sup>a</sup> ± 0,1	2,5 <sup>a</sup> ± 0,1
12	37,9 <sup>f</sup> ± 0,3	15,0 <sup>d</sup> ± 0,2	4,2 <sup>a</sup> ± 0,3	2,4 <sup>a</sup> ± 0,3	2,4 <sup>a</sup> ± 0,2	2,7 <sup>a</sup> ± 0,1

\* TC: Tempo de cultivo (dias).

Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

Para compreender melhor a variação de rendimento na produção de CB, um aspecto crucial é a quantidade de açúcares presentes em MHS (20 g.L<sup>-1</sup>) e MRC (76 g.L<sup>-1</sup>). Alguns estudos relatam que o rendimento de CB diminui quando a concentração inicial de glicose no meio de cultura para *Komagataeibacter* é aumentada. Isso acontece porque em concentrações mais altas de glicose ocorre aumento da concentração de ácido glucônico como subproduto formado, de modo que a produção de CB somado com a de ácido glucônico é igual a quantidade de glicose consumida. Em outras palavras, o excesso de glicose favorece a ativação de duas vias metabólicas principais: pentoses-fosfato para oxidação da glicose e ciclo de Krebs para oxidação do ácido orgânico. Como a síntese do biopolímero não interfere em outros processos do metabolismo, a energia obtida do consumo de glicose é dividida para formação de CB e outros subprodutos (LIU et al., 2020; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; SOUZA et al., 2020). Isso sugere que se a glicose não for usada para síntese de celulose, é metabolizada para via ácido glucônico e outras substâncias (MASAOKA; OHE; SAKOTA, 1993). No caso de *K. hansenii* ATCC 23769 e *K. xylinus* ARS B42, como quase metade dos açúcares de MRC foram

consumidos, e isso não foi refletido nos resultados de produção e rendimento de CB, possivelmente a formação de ácido glucônico usou grande parte da glicose disponível. Apesar deste trabalho não abordar dados experimentais relacionados a concentração de ácido glucônico durante o processo, esse aspecto será melhor discutido adiante.

Apesar da produção de CB por *K. xylinus* ATCC 53582 ter sido semelhante nos dois tipos de meios avaliados, a grande diferença de rendimento observada do MHS para o MRC é justificada pela significativa disparidade da quantidade de açúcares em cada meio, já que os tratamentos com o meio alternativo apresentaram quase três vezes mais açúcares redutores totais. Como cálculo do rendimento leva em consideração a biomassa de CB produzida e a diferença de substrato durante o cultivo, elevados rendimentos em MRC só seriam obtidos com maior consumo dos açúcares deste meio. Ou seja, a cepa apresentou mesma taxa de produção de CB entre os meios, porém a quantidade de açúcares disponíveis para conversão em MRC ainda se manteve elevada em comparação aos de MHS, acarretando, conseqüentemente, em baixo rendimento. Para *K. hansenii* ATCC 23769 e *K. xylinus* ARS B42, a diferença de rendimento entre os meios não ocorreu em razão, também, da produção no meio alternativo ter sido até duas vezes maior que no meio sintético, que acabou compensando o efeito da diferença de substrato no peso da equação do cálculo de rendimento. Para maiores rendimentos em MRC possíveis alternativas seriam o estudo do efeito da diluição dos açúcares do meio ou suplementação, porém não é o foco principal deste trabalho.

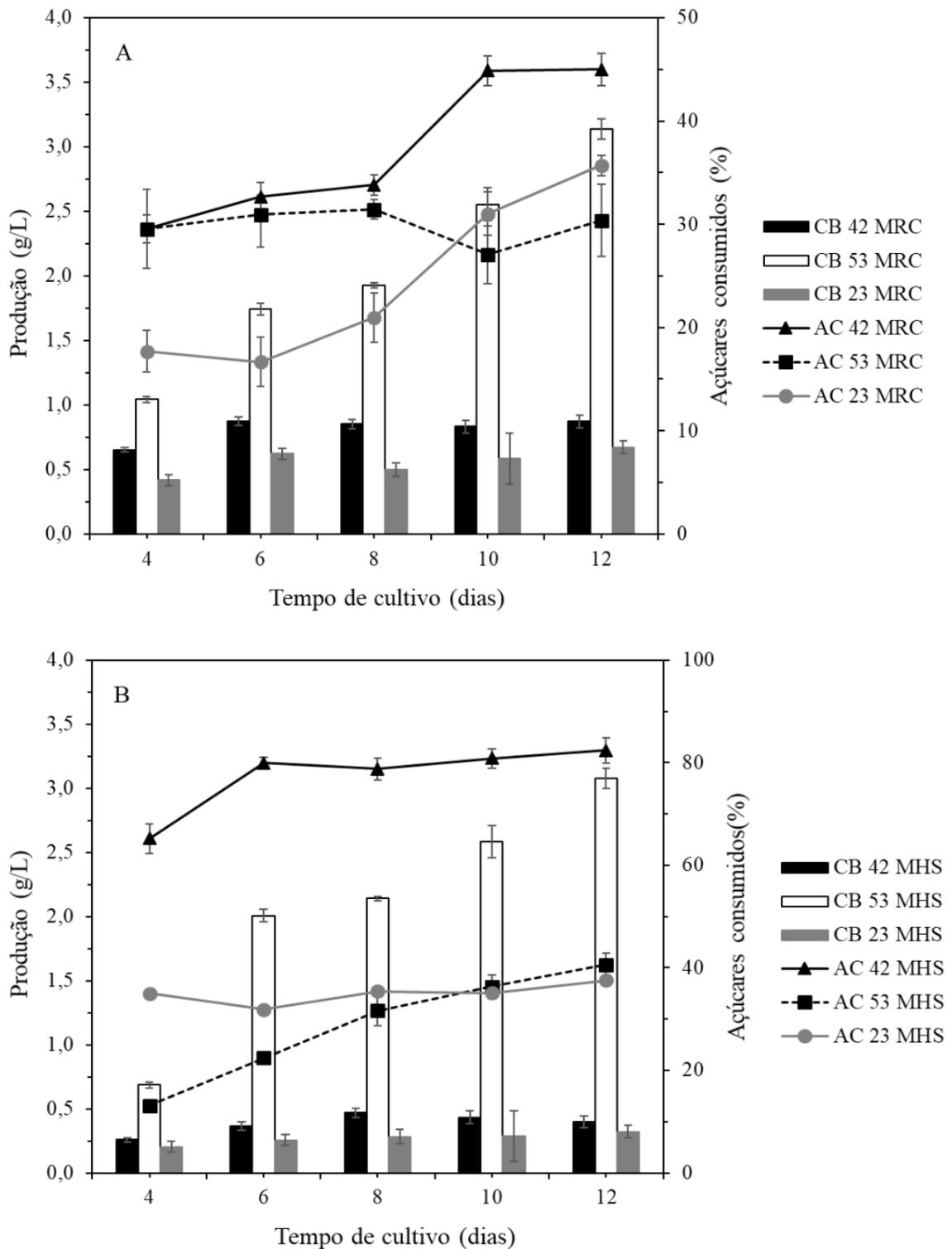
Observa-se na literatura que os rendimentos da produção de CB podem variar dependendo da fonte de açúcares utilizada e das diversas condições de otimização envolvidas no processo. De acordo com Mikkelsen et al., (2009) o rendimento reduz de 66 a 30% no intervalo de apenas 2 a 4 dias no cultivo de *K. xylinus* em meio HS. Kurosumi et al., (2009), no cultivo de cepas do gênero *Komagataeibacter* em diversos sucos de frutas suplementados com extrato de levedura e peptona, obteve rendimentos que variaram de 1,4 a 6,9%, e a concentração inicial de açúcares foi de no mínimo 62 g.L<sup>-1</sup>, próximo do percentual presente no MRC avaliado neste trabalho. Souza et al., (2020) analisou o rendimento de CB em cultivo com *K. xylinus* 53582 em meio de suco de caju e alcançou melhores resultados de até 39% com uma menor concentração de açúcares (31,69 g.L<sup>-1</sup>) quando comparado ao MRC, porém o meio tinha suplementação com melaço de soja ou extrato de levedura. Bae e Shoda (2004) observou um rendimento de 22% no cultivo de *K. xylinus* BPR 2001 a partir de melaço de cana ajustado para 23 g.L<sup>-1</sup> de açúcares.

Na Figura 9 são apresentados gráficos da relação entre a produção de CB e o consumo de açúcares do meio durante o processo. No MRC (Figura 9A) é possível observar em *K. xylinus* ATCC 53582 o aumento constante da produção conforme o decorrer do tempo de cultivo, porém sem variação significativa do consumo de açúcares. Enquanto que em *K. xylinus* ARS B42 e *K. hansenii* ATCC 23769 a produção praticamente não variou e o consumo dos açúcares aumentou constantemente, principalmente a partir do dia 8.

Quando glicose é utilizada como fonte de carbono para produção de celulose um dos subprodutos formados é o ácido glucônico, que diminui o pH do meio e, conseqüentemente, pode causar diminuição da produção de CB após determinado tempo de cultivo, que varia dependendo da cepa empregada no processo (CHAWLA et al., 2009; KONGRUANG, 2008). Em alguns casos a conversão de glicose em ácido glucônico pode chegar a 40% (KAMARUDIN et al., 2013; ZHONG et al., 2013). Estudos de Kawano et al., (2002) apontam que algumas bactérias, incluindo *K. hansenii* ATCC 23769, direcionam sua energia obtida do consumo de substrato para o crescimento celular, enquanto *K. xylinus* ATCC 53582 gasta sua energia na produção de CB. Assim, de acordo com os resultados deste trabalho e com os relatados por Kawano et al., (2002) e Augimeri e Strap, (2015), sugere-se que *K. xylinus* ATCC 53582 possa usar o ácido glucônico, subproduto formado no MRC durante o consumo de glicose, como fonte de carbono para direcionar maior parte do substrato para síntese de CB, mas não como fonte de energia para o crescimento celular, já que o pH de MRC diminuiu, indicando formação de ácidos orgânicos; a quantidade de açúcares permaneceu constante, indicando que não foram consumidos; e a produção de CB aumentou, indicando que o ácido glucônico, possivelmente, foi aproveitado para essa conversão.

Já no MHS (Figura 9B), produção e consumo de açúcares em *K. xylinus* 53582 foram diretamente proporcionais, aumentando conforme o tempo de cultivo. *K. xylinus* ARS B42 e *K. hansenii* ATCC 23769 apresentaram produção e concentração de açúcares com perfis mais constantes, sem variações significativas durante o cultivo. No caso de *K. xylinus* ARS B42 o elevado consumo de açúcar (82,4 %) não correspondeu necessariamente à maior taxa de conversão em CB, pois observa-se que o percentual de açúcar consumido durante o cultivo aumentou, enquanto a produção estava constante. Isso aconteceu porque valores mais elevados de pH priorizam outras rotas metabólicas que não são para produção de CB (MASAOKA; OHE; SAKOTA, 1993). Como a produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido glucônico, é bem comum no processo produtivo de CB (ZHONG et al., 2013), e o pH de MHS ao final do cultivo permaneceu acima de 4,0, representa um indicativo de baixa produção de ácidos orgânicos nesse meio e, conseqüentemente, baixa produção de CB.

Figura 9. Percentual de açúcares consumidos (%) em função da produção de celulose bacteriana ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (53), *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 (23) e *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (42) em diferentes tempos de cultivo (4, 6, 8, 10 e 12 dias) e sistema estático em: A) meio residual de caju retido e centrifugado (MRC) e B) meio sintético HS (MHS).



\* AC: açúcares consumidos (%).

Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

Analisando a variação de pH durante a produção de CB, todos os tratamentos apresentaram diminuição do pH conforme aumento do tempo de cultivo (Tabela 5). O pH inicial em MRC decresceu de 4,33 para em torno de 3,00 no último dia do cultivo, para as três cepas avaliadas, enquanto a diminuição no MHS foi do pH inicial 6,00 para pH final entre 3,90 e 4,03. Os valores em MRC foram mais baixos que em MHS em todos os tempos avaliados, indicando caráter mais ácido desse meio, já que durante o cultivo o pH de sucos de frutas diminui devido a secreção de ácidos orgânicos, tais como ácido cítrico, acético ou láctico (KAPRASOB et al., 2018; NAGPAL; KUMAR; KUMAR, 2012).

Tabela 5. pH de meio após cultivo para produção de membranas de celulose bacteriana por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (53), *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 (23) e *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (42) em diferentes tempos de cultivo (4, 6, 8, 10 e 12 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC). Letras iguais (a, b, c), para a mesma cepa, não apresentam diferenças estatisticamente significativas  $\alpha= (0,05)$ .

TC (dias)	pH - 53		pH - 23		pH - 42	
	MHS	MRC	MHS	MRC	MHS	MRC
0	6,0 <sup>c</sup> ± 0,1	4,3 <sup>b</sup> ± 0,1	6,0 <sup>c</sup> ± 0,1	4,3 <sup>b</sup> ± 0,1	6,0 <sup>c</sup> ± 0,1	4,3 <sup>a</sup> ± 0,1
4	5,5 <sup>c</sup> ± 0,1	3,5 <sup>a</sup> ± 0,1	5,7 <sup>c</sup> ± 0,1	3,4 <sup>a</sup> ± 0,1	5,8 <sup>c</sup> ± 0,1	3,1 <sup>a</sup> ± 0,1
6	5,2 <sup>c</sup> ± 0,1	3,3 <sup>a</sup> ± 0,1	5,5 <sup>c</sup> ± 0,1	3,0 <sup>a</sup> ± 0,1	5,4 <sup>b</sup> ± 0,1	3,0 <sup>a</sup> ± 0,1
8	4,8 <sup>b</sup> ± 0,1	3,3 <sup>a</sup> ± 0,1	4,8 <sup>b</sup> ± 0,1	3,0 <sup>a</sup> ± 0,1	5,0 <sup>b</sup> ± 0,1	3,0 <sup>a</sup> ± 0,1
10	4,0 <sup>b</sup> ± 0,1	3,0 <sup>a</sup> ± 0,1	4,0 <sup>b</sup> ± 0,1	2,9 <sup>a</sup> ± 0,1	4,4 <sup>b</sup> ± 0,1	3,0 <sup>a</sup> ± 0,1
12	3,9 <sup>b</sup> ± 0,1	2,9 <sup>a</sup> ± 0,1	4,0 <sup>b</sup> ± 0,1	2,8 <sup>a</sup> ± 0,1	4,1 <sup>b</sup> ± 0,1	2,9 <sup>a</sup> ± 0,1

\* TC: Tempo de cultivo (dias);

Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

O pH ótimo para produção de CB depende da bactéria, porém alguns autores atribuem uma faixa de pH levemente ácida a neutra (pH de 4,0 a 6,0) quando esse parâmetro é avaliado (HESTRIN; SCHRAM, 1954; KONGRUANG, 2008; CARREIRA, 2011). No caso do gênero *Komagataeibacter* (antigo *Gluconacetobacter*), algumas cepas apresentam tolerância a condições ácidas, sendo capazes de crescer e produzir em valores de pH inferiores a 4,0 (CASTRO et al., 2011). Isso acontece porque para o seu desenvolvimento, o metabolismo da bactéria converte glicose em ácido glucônico, acarretando em consequente diminuição do pH do meio (KONGRUANG, 2008; LIN et al., 2013). Assim, o caráter ácido de MHS e MRC conforme os dias de cultivo pode ter interferido no desenvolvimento dos microrganismos

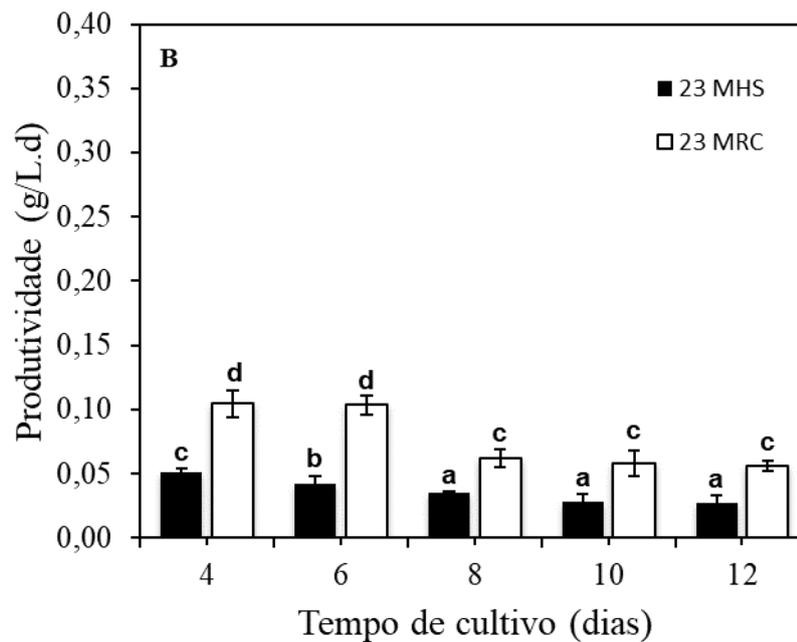
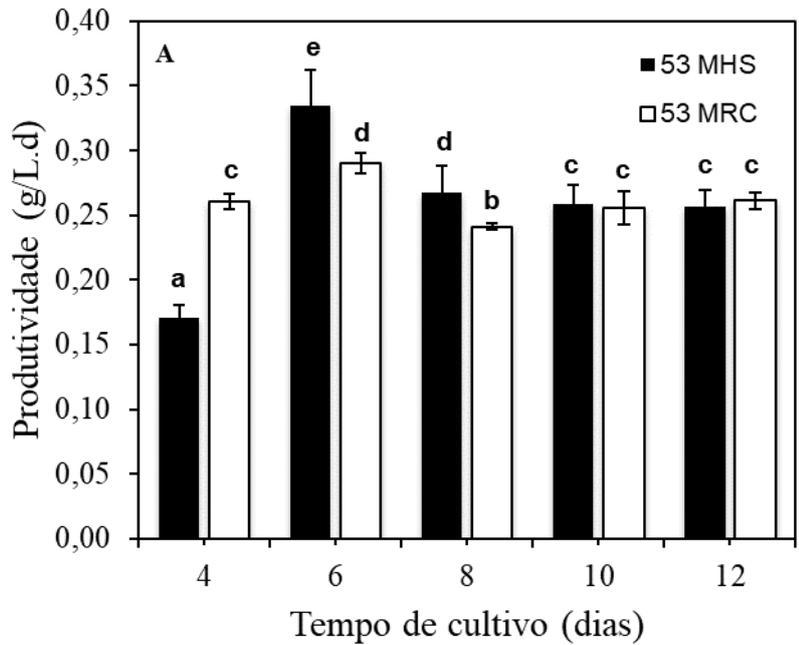
causando a diminuição observada nos resultados de produtividade de CB (conforme será abordado no próximo tópico) a partir do dia 8 de cultivo, principalmente por *K. hansenii* ATCC 23769 e *K. xylinus* ARS B42.

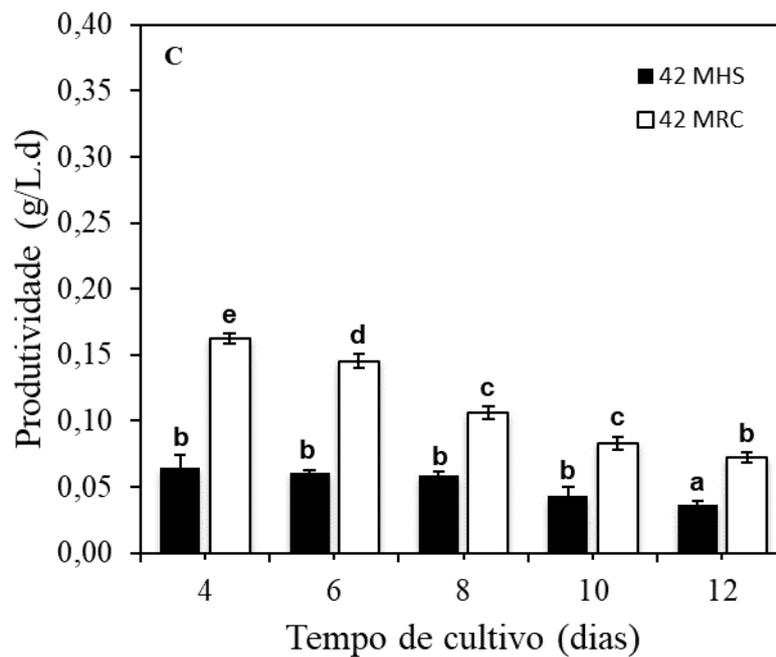
#### **5.2.4 Produtividade de CB**

As maiores produtividades ( $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) de CB (Figura 10) foram obtidas por *K. xylinus* ATCC 53582 (Figura 10A) no dia 6 de cultivo com  $0,33 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  no MHS e  $0,29 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  no MRC. Em ambos os meios o perfil de produtividade da cepa apresentou o mesmo comportamento, com aumento significativo entre os dias 4 e 6, seguido de discreta diminuição até o fim do cultivo. Em *K. hansenii* ATCC 23769 (Figura 10B) e *K. xylinus* ARS B42 (Figura 10C), a produtividade em todos os tratamentos foi maior no MRC, principalmente nos dias 4 e 6, com valores máximos de  $0,10$  e  $0,11 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para *K. hansenii* ATCC 23769 e de  $0,16$  e  $0,14 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para *K. xylinus* ARS B42, respectivamente, o que representa aumento de até 200% em relação ao MHS. Porém, a partir do dia 8 a produtividade de CB pelas duas cepas decresceu.

Os resultados de produtividade oferecem uma ideia da quantidade de CB seca produzida por dia de cultivo, o que, de um ponto de vista industrial, é tão importante quanto o resultado de produção, uma vez que pode ajudar a otimizar o processo e diminuir gastos referentes ao bioprocessamento (CHEN et al., 2018). Neste caso, os resultados apontam maiores produtividades nos dois primeiros tempos (4 e 6 dias) do processo, especialmente em MRC, indicando que maior produção de CB, pelas 3 cepas, ocorreu no início do cultivo. Nos diferentes trabalhos da literatura que avaliaram produção de CB em meios alternativos, as produtividades obtidas estão sempre na faixa entre  $0,01$  e  $0,8 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , variando de acordo com tipo de substrato, suplementação e microrganismo produtor (ABDELRAOF; HASANIN; EL-SAIED, 2019; ALGAR et al., 2015; BARSHAN et al., 2019; BEKATOROU et al., 2019; GAYATHRY; JOTHILAKSHMI, 2020; JOZALA et al., 2015; LIMA et al., 2017; SOUZA et al., 2020; YANTI et al., 2017).

Figura 10. Produtividade ( $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) de membranas de celulose bacteriana em diferentes tempos de cultivo (4, 6, 8, 10 e 12 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC) por: A) *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (53), B) *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 (23) e C) *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (42). Letras iguais (a, b, c, d, e) não apresentam diferenças estatisticamente significativas  $\alpha= (0,05)$ .





Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

### 5.2.5 Umidade de CB

As umidades de todas as CBs produzidas (Tabela 6) foram superiores a 98%, comprovando a alta umidade da celulose obtida por bioprocessos em comparação com a celulose vegetal (60% de umidade) (PECORARO et al., 2007; ZMEJKOSKI et al., 2018). CB sintetizada por *K. hansenii* ATCC 23769 em MRC apresentou maior teor de umidade que em MHS, em todos tempos de cultivo. Não ocorreu diferença estatística entre os tratamentos com MHS e MRC para *K. xylinus* ATCC 53582 e *K. xylinus* ARS B42. Estes resultados corroboram com os de outros autores que também avaliaram umidade de CB produzidas por *K. xylinus* ATCC 53582 e *K. hansenii* ATCC 23769 em diferentes meios de cultivo, sintético ou alternativos, e obtiveram altos percentuais, entre 97 e 99% (BARROS, 2021; CARNEIRO, 2015; LIMA, 2014). Porém não foi relatado na literatura avaliação dessa variável para as membranas de *K. xylinus* ARS B42.

Tabela 6. Umidade (%) de membranas de celulose bacteriana por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (53), *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 (23) e *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (42) em diferentes tempos de cultivo (4, 6, 8, 10 e 12 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC). Letras iguais (a, b), para a mesma cepa, não apresentam diferenças estatisticamente significativas  $\alpha= (0,05)$ .

TC (dias)	Umidade (%) - 53		Umidade (%) - 23		Umidade (%) - 42	
	MHS	MRC	MHS	MRC	MHS	MRC
4	98,2 <sup>a</sup> ± 0,1	99,1 <sup>a</sup> ± 0,1	99,1 <sup>b</sup> ± 0,1	99,4 <sup>a</sup> ± 0,1	99,3 <sup>a</sup> ± 0,1	99,3 <sup>a</sup> ± 0,1
6	98,8 <sup>a</sup> ± 0,1	99,0 <sup>a</sup> ± 0,1	99,0 <sup>b</sup> ± 0,1	99,4 <sup>a</sup> ± 0,1	99,3 <sup>a</sup> ± 0,1	99,2 <sup>a</sup> ± 0,1
8	98,9 <sup>a</sup> ± 0,1	99,0 <sup>a</sup> ± 0,1	98,8 <sup>b</sup> ± 0,1	99,5 <sup>a</sup> ± 0,1	99,1 <sup>a</sup> ± 0,1	99,3 <sup>a</sup> ± 0,1
10	98,8 <sup>a</sup> ± 0,1	99,0 <sup>a</sup> ± 0,1	98,6 <sup>b</sup> ± 0,1	99,5 <sup>a</sup> ± 0,1	99,2 <sup>a</sup> ± 0,1	99,3 <sup>a</sup> ± 0,1
12	98,7 <sup>a</sup> ± 0,1	99,0 <sup>a</sup> ± 0,1	98,9 <sup>b</sup> ± 0,1	99,4 <sup>a</sup> ± 0,1	98,9 <sup>a</sup> ± 0,2	99,3 <sup>a</sup> ± 0,1

\* TC: Tempo de cultivo (dias);

Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

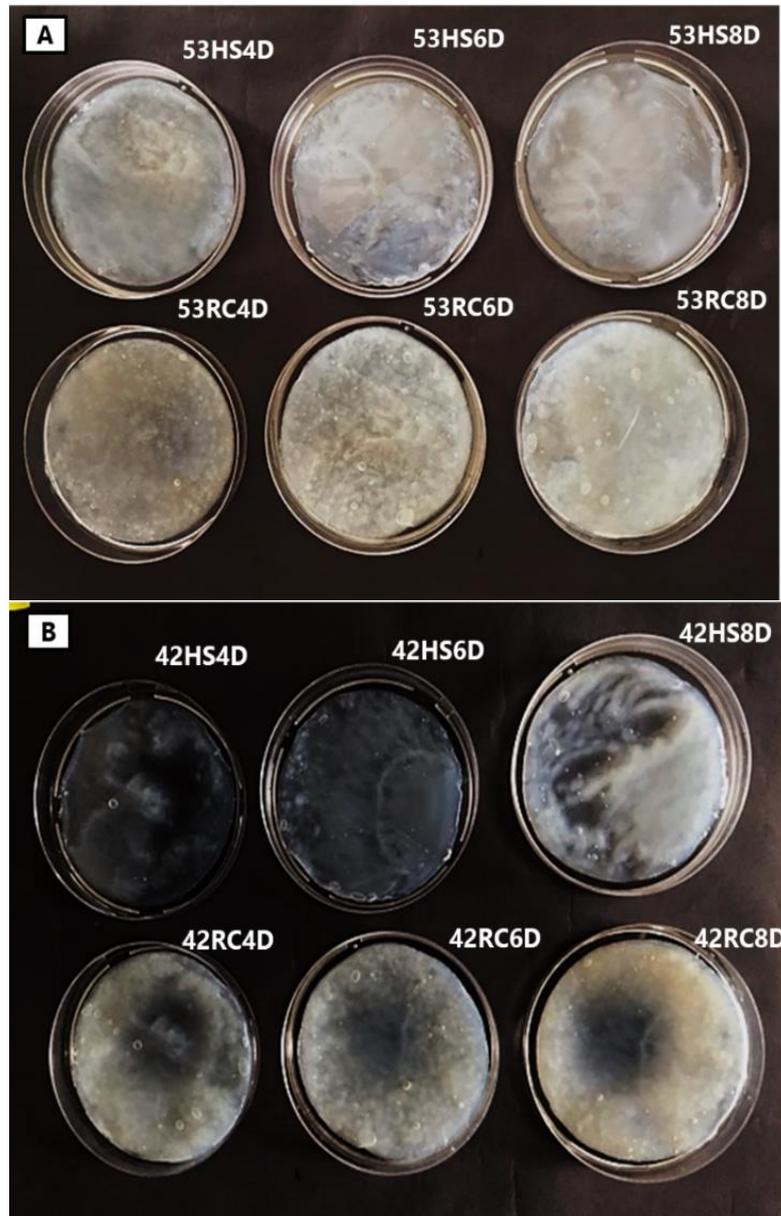
### 5.3 Caracterização de CB

Considerando os resultados até aqui apresentados, *K. xylinus* ATCC 53582 e *K. xylinus* ARS B42 foram selecionadas como as melhores cepas para estudos de caracterização de CB. *K. xylinus* ATCC 53582 por apresentar elevados níveis de produção e produtividade em MHS e, principalmente, em MRC, assim como maior rendimento e melhor conversão de açúcares. E *K. xylinus* ARS B42 por possuir melhor potencial de produção de CB quando comparado a *K. hansenii* ATCC 23769 e alcançar resultados até duas vezes superior em MRC em relação ao MHS, para os parâmetros avaliados, além de ser pouco relatada na literatura como microrganismo produtor em bioprocessos.

Em geral, as melhores produtividades do processo foram alcançadas logo nos primeiros dias de cultivo, indicando que após metade do tempo de cultivo, nos casos das cepas e nas condições avaliadas, a conversão do produto tende a diminuir, não sendo atrativo do ponto de vista industrial para obtenção de CB.

Para os estudos de caracterização, analisando em termos de produção industrial, foram definidos os tratamentos de 4, 6 e 8 dias, em decorrência das maiores produtividades terem sido alcançadas nos tempos iniciais do cultivo. Assim, novas membranas de CB foram produzidas por *K. xylinus* ATCC 53582 e *K. xylinus* ARS em MRC e MHS, e algumas delas estão apresentadas na Figura 11.

Figura 11. Membranas úmidas de celulose bacteriana produzidas em diferentes tempos de cultivo (4, 6 e 8 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC) por: A) *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (53) e B) *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (42).



Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

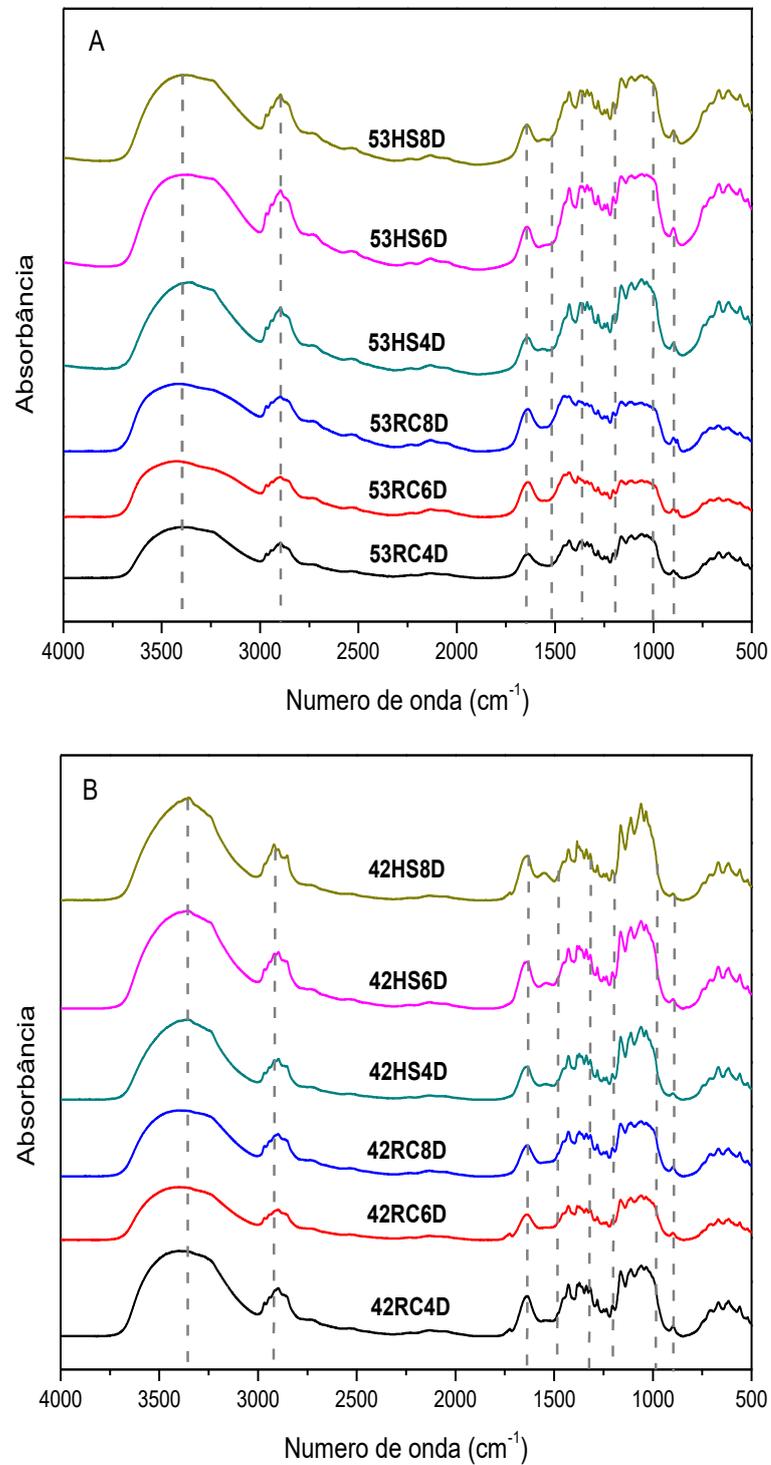
### 5.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Análises de FTIR (Figura 12) mostram bandas tipicamente presentes em CB, que se assemelham às bandas naturais da celulose vegetal, por possuírem a mesma composição química (ANDRIANI; APRIYANA; KARINA, 2020). Os resultados possibilitaram verificar que não ocorreram alterações nos grupos funcionais presentes nas membranas de CB devido à composição dos meios de cultura.

A região com o comprimento de onda em torno de  $3380\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento dos grupos O-H presentes na celulose tipo I. A banda em  $2895\text{ cm}^{-1}$  é referente ao estiramento C-H e estiramento assimétrico de  $\text{CH}_2$ . Os picos em  $1645\text{ cm}^{-1}$  são atribuídos às vibrações de deformação do O-H provenientes de moléculas de água adsorvidas, indicando que as amostras ainda apresentavam umidade no momento da análise, mesmo que baixa (GAO et al., 2019; GEA et al., 2011; GÜZEL; AKPINAR, 2019). Múltiplas bandas de absorção nas regiões entre de  $1427\text{ cm}^{-1}$  e  $1315\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas às deformações de  $\text{CH}_2$  e O-H, respectivamente. Bandas típicas de celulose também são observadas em  $1161$  e  $1105\text{ cm}^{-1}$  e são correspondentes ao estiramento antissimétrico de C-O-C e estiramento simétrico de C-O, respectivamente. As frequências observadas entre  $1060$  e  $1030\text{ cm}^{-1}$  são referentes às deformações C-O de C-OH típicas de carboidratos e em  $895\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas às vibrações de C-H (DU et al., 2018; GEA et al., 2011; PECORARO et al., 2007).

A ausência de bandas nas regiões  $1538$ ,  $1730$ - $1735$  e  $3150$ - $3220\text{ cm}^{-1}$ , referentes a nitrogênio, estruturas proteicas, ou possíveis contaminantes (GEA et al., 2011; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008), indicam a eficiência da etapa de purificação com NaOH 2% (m/v). Os espectros de FTIR das membranas produzidas no MRC foram semelhantes às do MHS, apesar de se tratar de um substrato alternativo, constatando que a composição dos meios não modifica a estrutura química do biopolímero, o que está de acordo com o relatado por Çakar et al., (2014) e TYAGI, SURESH., (2016). Outros meios alternativos utilizados para produção de CB, como melão de beterraba (KESHK; RAZEK; SAMESHIMA, 2006), extrato de lichia (YANG et al., 2016), bagaço de uva (VAZQUEZ et al., 2013), alfarroba (BILGI et al., 2016) e suco de caju (SOUZA et al., 2020), também não alteraram as propriedades estruturais do biopolímero de acordo com análises de FTIR.

Figura 12. Espectros de FTIR de membranas de celulose bacteriana produzidas em diferentes tempos de cultivo (4, 6 e 8 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC) por: A) *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (53) e B) *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (42).



Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

### 5.3.2 Análises Termogravimétricas (TGA)

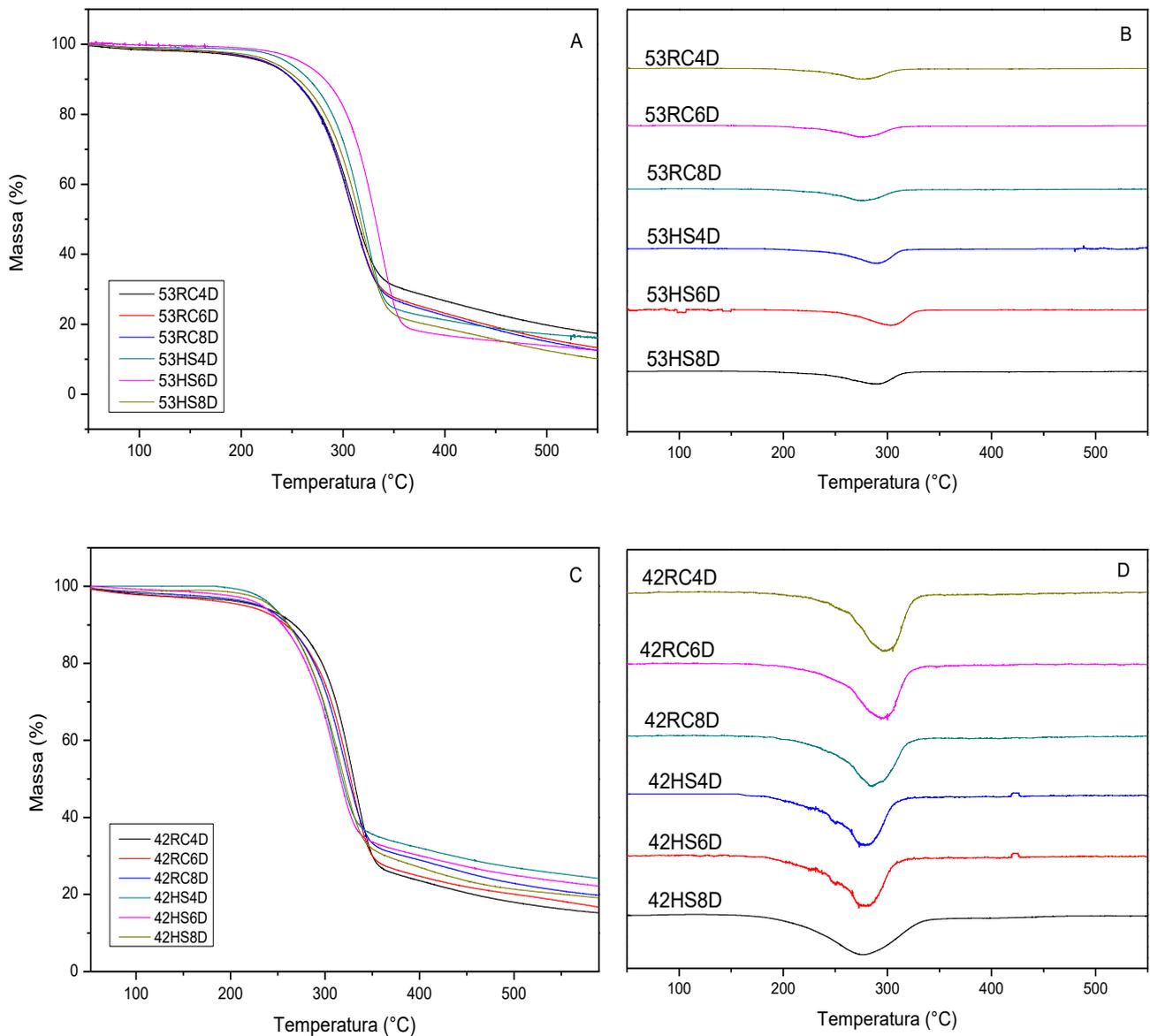
Os termogramas (TGA) e derivadas (DTG) das CBs produzidas são mostrados na Figura 13, onde é possível observar perfis de degradação semelhantes entre os tratamentos com MHS e MRC. Ocorreu apenas um único evento de perda de massa em todas as amostras analisadas, que é referente a degradação das cadeias glicosídicas de celulose, ocorrida em torno de 250 °C para as membranas de *K. xylinus* ATCC 53582 (Figura 13A) e *K. xylinus* ARS B42 (Figura 13C), em MRC e MHS, o que está de acordo com faixa de degradação de CB reportada na literatura, entre 200 e 300°C (GÜZEL; AKPINAR, 2019; SOUZA et al., 2020). Ausência de eventos de 150 a 250 °C, associados a degradação de proteínas, indicam que a purificação das membranas foi eficaz (MOLINA-RAMÍREZ et al., 2018). Na tabela 7 são apresentados os valores de temperatura inicial de degradação (*Tonset*), temperatura máxima de degradação (*Tmáx*) e perda de massa por degradação. Todas as amostras apontaram início da degradação em torno de 233 °C, e se encontram na faixa padrão de referência da literatura (200 a 300 °C) para CB (GÜZEL; AKPINAR, 2019).

Membranas de *K. xylinus* ARS B42 apresentaram as maiores temperaturas iniciais de degradação em MRC (259,1 a 266,3 °C), e de *K. xylinus* ATCC 53582 em MHS (251,4 a 253,4 °C). Todos os tratamentos apontaram aumento *Tonset*, indicando que o tempo de cultivo causa mudanças também na estrutura da CB, que acontece devido a ocorrência de interações químicas mais eficazes com os grupos hidroxílicos das CBs produzidas nos maiores tempos cultivo, proporcionando maior resistência térmica (SALVI et al., 2014; PACHECO et al., 2017).

As curvas de DTG (Figuras 13B e 13D) permitem observar decomposição máxima das CBs na faixa de temperatura entre 276 e 303 °C para todos os tratamentos, sendo maiores em MHS para *K. xylinus* ATCC 53582 e MRC para *K. xylinus* ARS B42, conforme observado nos resultados de *Tmáx* (Tabela 7), que estão de acordo com o proposto na literatura (GEA et al., 2011; SOUZA et al., 2020). Apesar de *K. xylinus* ARS B42 ter apresentado menor taxa de produção e rendimento de CB (Figuras 4C e Tabela 4), considerando os valores de *Tonset* e *Tmáx*, suas membranas sintetizadas em MRC são mais termicamente estáveis que as de MHS e que as *K. xylinus* ATCC 53582 no próprio meio sintético padrão. Tal característica térmica também pode ser comprovada pelos percentuais de perda de massa, que variou de 75 a 84 % nas CBs de *K. xylinus* ARS B42 e 84 a 92 % nas de *K. xylinus* ATCC 5358, valores superiores aos de outros estudos que avaliaram estabilidade térmica de CB sintetizada em meios alternativos (GÜZEL; AKPINAR, 2019; SOUZA et al., 2020). Vale ressaltar que não há

trabalho publicado na literatura que avalie a estabilidade térmica da celulose bacteriana de *K. xylinus* ARS B42.

Figura 13 – Termogramas e derivadas, respectivamente, de membranas de celulose bacteriana produzidas em diferentes tempos de cultivo D (4, 6 e 8 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC) por: (A e B) *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (53) e (C e D) *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (42), em atmosfera inerte (N<sub>2</sub>).



Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

Tabela 7. Temperatura inicial de degradação (°C), temperatura máxima de degradação (°C) e perda de massa por degradação (%) de membranas de celulose bacteriana produzidas por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (53) e *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (42) em diferentes tempos de cultivo D (4, 6 e 8 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC). Letras iguais (a, b, c, d, e, f, g) na mesma coluna não apresentam diferenças estatisticamente significativas  $\alpha= (0,05)$ .

<b>Amostra</b>	<b>Tonset (°C)</b>	<b>Tmáx (°C)</b>	<b>Perda de massa (%)</b>
53MHS4D	251,9 <sup>c</sup>	290,4 <sup>b</sup>	84,4 <sup>d</sup>
53MHS6D	252,0 <sup>c</sup>	302,9 <sup>a</sup>	88,9 <sup>c</sup>
53MHS8D	253,4 <sup>c</sup>	290,8 <sup>b</sup>	91,6 <sup>a</sup>
53MRC4D	243,5 <sup>e</sup>	276,3 <sup>c</sup>	84,1 <sup>d</sup>
53MRC6D	246,6 <sup>d</sup>	276,9 <sup>c</sup>	89,0 <sup>c</sup>
53MRC8D	246,2 <sup>d</sup>	278,0 <sup>c</sup>	89,7 <sup>b</sup>
42MHS4D	237,8 <sup>f</sup>	279,6 <sup>c</sup>	75,4 <sup>g</sup>
42MHS6D	233,5 <sup>f</sup>	279,8 <sup>c</sup>	77,4 <sup>g</sup>
42MHS8D	242,8 <sup>e</sup>	278,1 <sup>c</sup>	80,7 <sup>e</sup>
42MRC4D	259,1 <sup>b</sup>	296,9 <sup>b</sup>	84,4 <sup>d</sup>
42MRC6D	260,9 <sup>b</sup>	295,4 <sup>b</sup>	82,6 <sup>e</sup>
42MRC8D	266,3 <sup>a</sup>	291,1 <sup>b</sup>	79,7 <sup>f</sup>

\* Tonset: Temperatura inicial de degradação; Tmáx: temperatura máxima de degradação.  
Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

### 5.3.3 Ensaios mecânicos (EMIC)

Os resultados dos ensaios de tração para caracterização das propriedades mecânicas das CBs estão presentes na Tabela 8, onde é possível observar os valores de tensão máxima, tensão na ruptura, alongação na ruptura e módulo de Young, determinados através das curvas de tensão e deformação das amostras.

As membranas produzidas por *K. xylinus* ATCC 53582 apresentaram os maiores valores de tensão máxima (79,2 a 176,5 MPa), que aumentaram conforme o tempo de cultivo, e foram semelhantes entre os tratamentos, evidenciando que MRC proporcionou as mesmas propriedades mecânicas que MHS. O mesmo comportamento foi observado para tensão na

ruptura (80,1 a 177,8 MPa) e módulo de Young (6,40 a 10,51 GPa). Porém as membranas do MRC no dia 8 tiveram maior elasticidade, com alongação na ruptura de até 3,5 %. Apesar das CBs de *K. xylinus* ARS B42 apresentarem menor resistência mecânica, os tratamentos em MRC foram superiores aos do MHS, porém sem influência do tempo de cultivo, indicando que as propriedades mecânicas das membranas dessa cepa em MRC são constantes durante o processo. Os maiores valores das tensões máxima e de ruptura entre os tratamentos com *K. xylinus* ARS B42 foram de 74,5 e 75,7 MPa, respectivamente, com módulo de Young de 5,30 GPa e alongação na ruptura de 2,4 %. Os baixos valores de alongação na ruptura são relacionados à alta cristalinidade da CB, que contribui para uma maior resistência mecânica das membranas, porém com maior rigidez e menor elasticidade (ALMEIDA et al., 2013; S-Q. CHEN et al., 2018).

Tabela 8. Tensão máxima, tensão na ruptura, alongação na ruptura e módulo de Young de membranas de celulose bacteriana produzidas por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (53) e *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (42) em diferentes tempos de cultivo D (4, 6 e 8 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC). Letras iguais (a, b, c, d, e, f) na mesma coluna não apresentam diferenças estatisticamente significativas  $\alpha = (0,05)$ .

<b>Amostras</b>	<b>Tensão Máxima (MPa)</b>	<b>Tensão na ruptura (MPa)</b>	<b>Elongação na ruptura (%)</b>	<b>Módulo de Young (GPa)</b>
53MHS4D	133,2 ± 1,5 <sup>b</sup>	135,3 ± 1,6 <sup>b</sup>	3,0 ± 0,2 <sup>b</sup>	6,40 ± 0,1 <sup>c</sup>
53MHS6D	154,0 ± 1,5 <sup>ab</sup>	156,5 ± 2,6 <sup>ab</sup>	2,1 ± 0,2 <sup>c</sup>	9,42 ± 0,1 <sup>a</sup>
53MHS8D	176,5 ± 2,8 <sup>a</sup>	177,8 ± 2,6 <sup>a</sup>	3,0 ± 0,2 <sup>b</sup>	10,51 ± 0,1 <sup>a</sup>
53MRC4D	79,2 ± 2,8 <sup>c</sup>	80,1 ± 2,9 <sup>c</sup>	1,9 ± 0,3 <sup>d</sup>	6,83 ± 0,2 <sup>c</sup>
53MRC6D	136,1 ± 0,9 <sup>b</sup>	137,7 ± 1,0 <sup>b</sup>	3,1 ± 0,3 <sup>b</sup>	9,15 ± 0,7 <sup>b</sup>
53MRC8D	162,6 ± 5,3 <sup>a</sup>	163,8 ± 5,3 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	9,88 ± 0,5 <sup>a</sup>
42MHS4D	12,3 ± 1,4 <sup>e</sup>	12,5 ± 1,5 <sup>e</sup>	0,9 ± 0,2 <sup>e</sup>	1,46 ± 0,3 <sup>f</sup>
42MHS6D	39,8 ± 2,9 <sup>d</sup>	41,2 ± 1,7 <sup>d</sup>	2,2 ± 0,3 <sup>c</sup>	1,62 ± 0,1 <sup>f</sup>
42MHS8D	47,1 ± 0,7 <sup>d</sup>	47,8 ± 0,6 <sup>d</sup>	2,0 ± 0,4 <sup>c</sup>	2,89 ± 0,7 <sup>e</sup>
42MRC4D	74,5 ± 2,6 <sup>c</sup>	75,7 ± 2,5 <sup>c</sup>	1,8 ± 0,2 <sup>c</sup>	5,03 ± 0,1 <sup>d</sup>
42MRC6D	72,3 ± 3,4 <sup>c</sup>	73,4 ± 3,4 <sup>c</sup>	1,9 ± 0,3 <sup>c</sup>	5,30 ± 0,5 <sup>d</sup>
42MRC8D	66,3 ± 1,5 <sup>c</sup>	67,1 ± 1,3 <sup>c</sup>	2,4 ± 0,4 <sup>c</sup>	4,27 ± 0,2 <sup>d</sup>

Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

Os resultados de propriedades mecânicas são importantes indicadores da dimensão e nível de organização das nanofibras da estrutura da celulose, e estão relacionados ao seu alto grau de emaranhamento por ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares, sugerindo que as membranas com rede de fibras mais densas tenham tendência para apresentar propriedades mecânicas mais elevadas (ABEER; MOHD AMIN; MARTIN, 2014; OLIVEIRA BARUD et al., 2015). Assim, as características mecânicas superiores das membranas de *K. xylinus* ATCC 53582 em relação às de *K. xylinus* ARS B42 podem ser justificadas pela maior quantidade de CB produzida (Figuras 4A e 4C), já que quanto maior a quantidade de massa da membrana, mais densa e compacta será a sua rede de fibras tridimensional, ocasionando em melhoria dos seus atributos mecânicos (AMASON et al., 2020; HA et al., 2011; UL-ISLAM et al., 2011). Do mesmo modo, a não variação do perfil das características mecânicas em relação ao tempo, conforme foi observado nas membranas de *K. xylinus* ARS B42, pode ser atribuída à baixa variação na produção de CB obtida pela cepa entre os dias 4 e 8 do cultivo.

#### **5.3.4 Capacidade de absorção de água (CAA)**

A CAA (Tabela 9) das CBs produzidas em meio MRC variou significativamente conforme aumento do tempo de cultivo, enquanto nas do MHS esse parâmetro não foi influenciado ao longo do cultivo, comportamento que pode ser observado pelas medidas de espessura dos corpos de prova após hidratação (Tabela 9). Apesar da mesma capacidade produtiva, as CBs de *K. xylinus* ATCC 53582 em MRC nos dias 6 e 8 absorveram mais água que em MHS, com CAA máxima de 4657 e 5211 %, respectivamente. Para *K. xylinus* ARS B42 todos os tratamentos em MRC foram superiores aos do MHS, resultando nos maiores percentuais de CAA alcançados nesse trabalho, que variou de 6545 %, no dia 4, até 14864 % no dia 8 do cultivo.

Apesar das membranas de *K. xylinus* ARS B42 apresentarem menor espessura, conseguem absorver um teor de água até 285% maior que as de *K. xylinus* ATCC 53582, o que indica, possivelmente, que as CBs sintetizadas por esta cepa possuem maior área superficial de contato e estrutura com maior volume de poros. A interação entre as moléculas de água e a estrutura da CB depende principalmente do arranjo da rede de fibra: quanto mais apertado for a distribuição das fibras na CB, resultando em uma rede de celulose mais densa e, conseqüentemente, com menor porosidade, menor será a capacidade do material de absorver água, já que o ambiente não será tão propício para combinação de moléculas de água e fibras

de CB (HE et al., 2020). Assim, a distribuição das fibras na estrutura da CB de *K. xylinus* ARS B42, especialmente em MRC, conforme será discutido nas análises de MEV, justificam a sua CAA superior.

Tabela 9. Capacidade de absorção de água (%), umidade após absorção (%) e espessura dos corpos de prova (mm) de membranas de celulose bacteriana produzidas por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (53) e *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (42) em diferentes tempos de cultivo D (4, 6 e 8 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC). Letras iguais (a, b, c, d, e, f, g) na mesma coluna não apresentam diferenças estatisticamente significativas  $\alpha= (0,05)$ .

Amostra	CAA (%)	Umidade após absorção (%)	Espessura dos corpos de prova (mm)
53MHS4D	3218,0 ± 150,0 <sup>e</sup>	96,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,43 ± 0,1 <sup>c</sup>
53MHS6D	3226,0 ± 144,0 <sup>e</sup>	96,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,47 ± 0,1 <sup>c</sup>
53MHS8D	3299,0 ± 123,0 <sup>e</sup>	97,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,53 ± 0,3 <sup>c</sup>
53MRC4D	3744,0 ± 174,0 <sup>e</sup>	96,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,2 <sup>e</sup>
53MRC6D	4657,0 ± 93,0 <sup>d</sup>	97,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,21 ± 0,2 <sup>b</sup>
53MRC8D	5211,0 ± 102,0 <sup>d</sup>	98,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,98 ± 0,3 <sup>a</sup>
42MHS4D	3270,0 ± 32,0 <sup>e</sup>	98,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,1 <sup>g</sup>
42MHS6D	2716,0 ± 4,0 <sup>e</sup>	98,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,1 <sup>g</sup>
42MHS8D	2620,0 ± 175,0 <sup>e</sup>	97,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,2 <sup>g</sup>
42MRC4D	6545,0 ± 8,0 <sup>c</sup>	98,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,1 <sup>f</sup>
42MRC6D	7922,0 ± 28,0 <sup>b</sup>	98,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,1 <sup>e</sup>
42MRC8D	14864,0 ± 294,0 <sup>a</sup>	99,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,04 ± 0,1 <sup>d</sup>

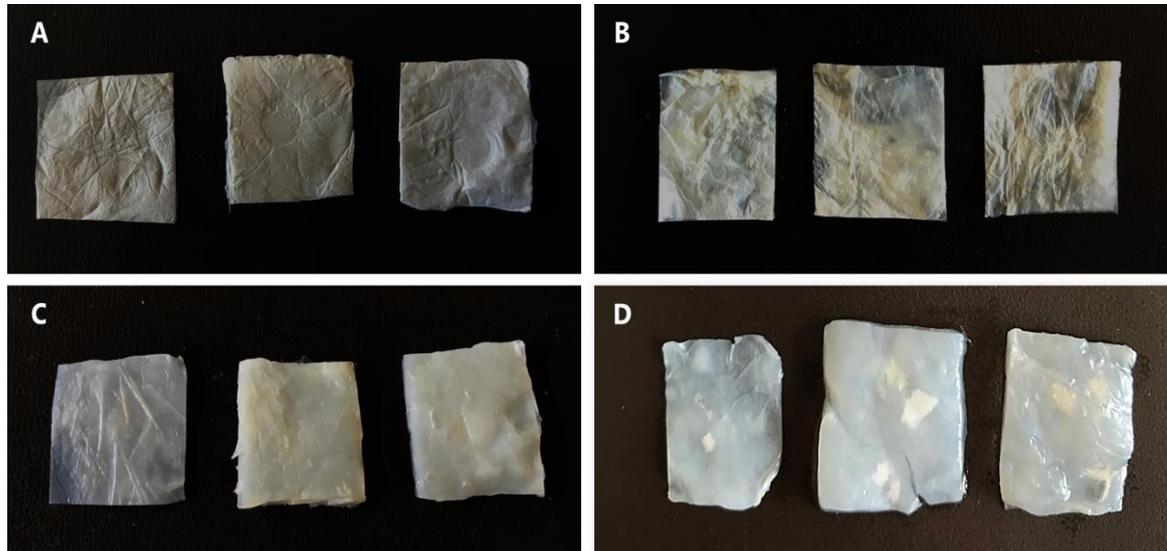
Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

Vale salientar também que o teor umidade das CBS de *K. xylinus* ARS B42 após o teste de absorção de água manteve o mesmo padrão observado antes do teste, acima de 98 %, enquanto CBs de *K. xylinus* ATCC 53582 apresentaram diminuição na umidade de 98 % para até 96,9 %, indicando que tais membranas não conseguem voltar ao seu estado de umidade inicial, antes da liofilização, provável consequência do colapso de poros ocorrido nesse material durante a secagem. Ainda assim, a umidade das CBS após a reabsorção de água é superior aos 60% presentes na celulose vegetal (PECORARO et al., 2007; ZMEJKOSKI et al., 2018). Os

resultados obtidos neste trabalho são superiores aos de Phisalaphong e Jatupaiboon., (2008) com CAA entre 500 e 600% em CBs com quitosana presente na estrutura; aos de Lin et al., (2013) em meio sintético padrão suplementado com etanol quando recuperaram até 89 % da umidade inicial após teste de absorção de água; aos de Ul-Islam et al., (2011) relataram absorção de água pelas CBs de até 87 vezes o seu peso inicial, enquanto os resultados *K. xylinus* ARS B42 desse estudo foram de até 153 vezes; e aos de He et al., (2020), com CAA de CBs de meio HS padrão de até 327 %.

A Figura 14 mostra o aspecto visual das membranas antes e após a absorção de água, onde é possível perceber o intumescimento do material. O aumento de volume decorrente do acúmulo de água é ainda mais perceptível nas amostras de *K. xylinus* ARS B42 (Figura 14B e 14D), quando é possível notar diminuição da transparência e regiões mais brancas próximas ao centro da membrana, possivelmente de áreas que a água ainda não conseguiu acessar.

Figura 14. Membranas de celulose bacteriana produzidas em 8 dias de cultivo e sistema estático em meio residual de caju retido e centrifugado (MRC) por: *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (A e C) e *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (B e D), antes e depois do teste de capacidade de absorção de água. Teste em triplicata.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

Os resultados superiores de CAA em MRC deste trabalho evidenciam o excelente potencial das cepas para produzir CB com alto poder de absorção de água a partir de um meio alternativo, sem uso de suplementação, mesmo quando comparado ao meio sintético padrão. Em nenhum dos estudos buscados pelos autores os percentuais de CAA em CB foram

superiores aos mais de 14000 % obtidos nas membranas de *K. xylinus* ARS B42 em MRC, evidenciando a característica peculiar e superior da CB sintetizada pela cepa nesse meio de cultivo, de absorver muita água.

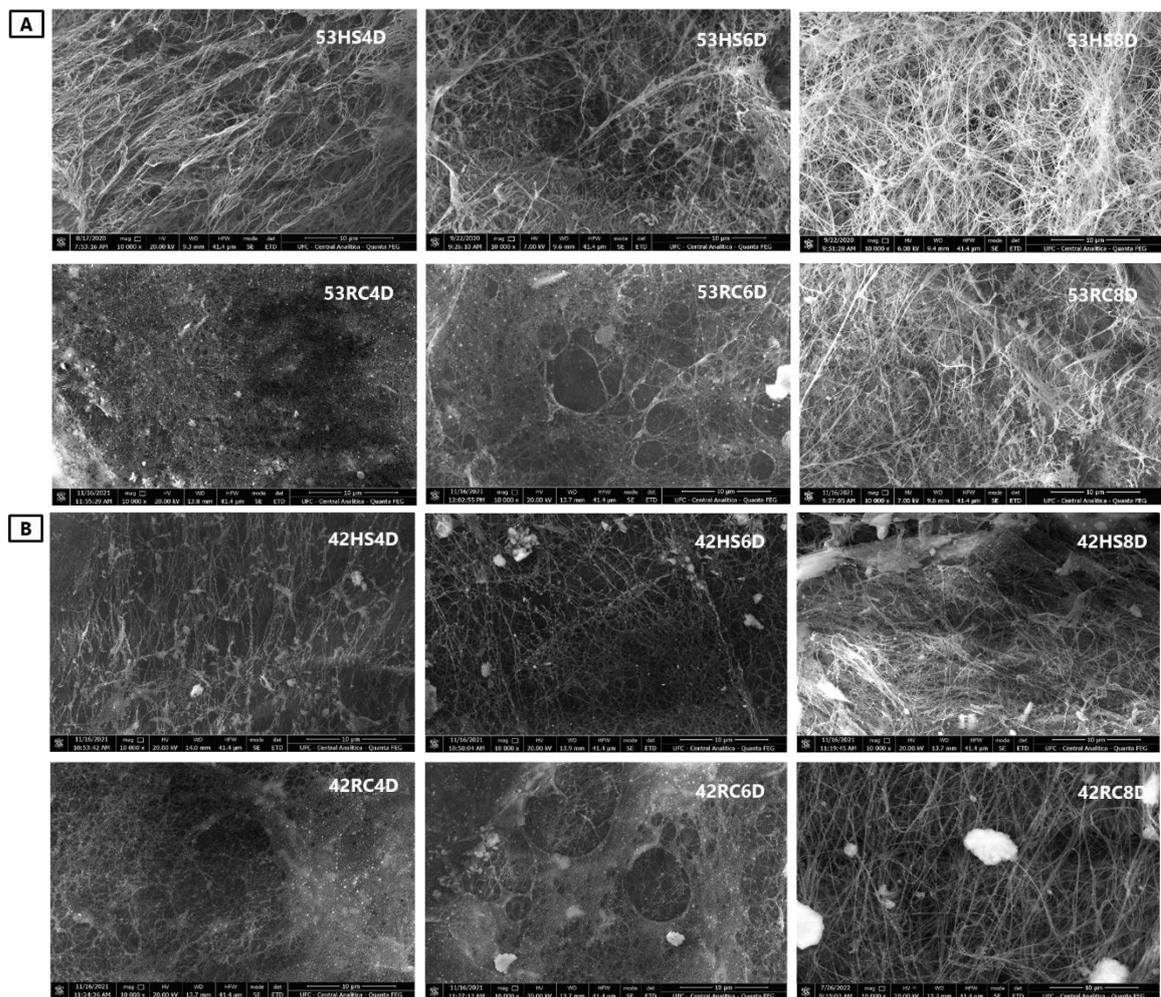
### 5.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os resultados da microscopia eletrônica de varredura são expostos na Figura 15, onde é possível visualizar a morfologia da rede tridimensional das membranas de CB de *K. xylinus* ATCC 53582 e *K. xylinus* ARS B42. As micrografias obtidas apresentaram uma estrutura entrelaçada e com muitas nanofibrilas de diâmetros entre 64 e 98 nm (Tabela 10), que estão de acordo com a morfologia padrão da celulose bacteriana (FANG; CATCHMARK, 2015; PECORARO et al., 2007; SHEYKHNAZARI et al., 2018). Nas CBs de *K. xylinus* ATCC 53582 (Figura 15A) produzidas em MHS é possível observar um considerável padrão de agregação das fibras, que já é perceptível a partir do tempo inicial de cultivo, e se mantém até o final, enquanto nas de MRC essa agregação aumenta conforme o tempo, chegando a apresentar fibras com até 92 nm de diâmetro. Nas CBs de *K. xylinus* ARS B42 (Figura 15B) o aumento da agregação entre as fibras de acordo com o tempo ocorreu em ambos os meios, porém MRC apresentou fibras mais espaçadas, dando uma melhor noção de formação da rede tridimensional, que é ainda mais perceptível na imagem do dia 8. As membranas sintetizadas em MHS também se mostraram bastante associadas no dia 8, porém com menores espaços entre elas, além de diâmetro inferior (92 nm) aos observados em MRC no mesmo tempo de cultivo (98 nm).

O rearranjo da estrutura das CBs de ambas as cepas está de acordo com as análises de EMIC (Tabela 8), já que a resistência mecânica das membranas de *K. xylinus* ATCC 53582 em MHS quase não apresentou diferença estatística conforme o tempo de cultivo, e nas de MRC aumentou consideravelmente; enquanto membranas de *K. xylinus* ARS B42 em MRC tiveram maior resistência mecânica que em MHS. Também é possível perceber que nas amostras sintetizadas pelas cepas em MRC, a rede nanofibrilada é visualmente mais aberta, com mais espaços vazios distribuídos entre as fibras da estrutura da CB, caracterizando uma membrana menos densa, o que possivelmente explica, em associação com as medidas de dimensões das fibras (Tabela 10), os maiores percentuais de CAA obtidos (Tabela 9) quando comparados as do MHS, que apresenta fibras de diâmetros menores e organizadas de forma mais fechada, característica de membranas mais densas. Especialmente no caso *K. xylinus* ARS B42, o

rearranjo mais aberto das fibras pode ser responsável pelas características térmicas e hidrofílicas superiores das membranas (BEKATOROU et al., 2019), já que, em concordância com os resultados de DTG e CAA, todas as CBs sintetizadas em MRC apresentaram, além de maior dimensão das fibras, também maior resistência térmica e maior capacidade de absorver água, em comparação aos demais tratamentos no mesmo tempo de cultivo avaliado.

Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura de membranas de celulose bacteriana produzidas em diferentes tempos de cultivo (4, 6 e 8 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC) por: A) *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (53) e B) *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (42).



Fonte: Elaborado pelo Autor (2023)

Tabela 10. Diâmetro das fibras (Dm) de membranas de celulose bacteriana produzidas por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (53) e *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (42) em diferentes tempos de cultivo D (4, 6 e 8 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC). Letras iguais (a, b, c, d, e, f, g, h) não apresentam diferenças estatisticamente significativas  $\alpha= (0,05)$ .

<b>Amostra</b>	<b>Dm (nm)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Dm (nm)</b>
53HS4D	64,0 <sup>b</sup> ± 3,0	42HS4D	68,0 <sup>c</sup> ± 3,0
53HS6D	83,0 <sup>e</sup> ± 2,0	42HS6D	81,0 <sup>e</sup> ± 2,0
53HS8D	83,0 <sup>e</sup> ± 5,0	42HS8D	92,0 <sup>f</sup> ± 1,0
53RC4D	58,0 <sup>a</sup> ± 2,0	42RC4D	65,0 <sup>b</sup> ± 4,0
53RC6D	79,0 <sup>d</sup> ± 5,0	42RC6D	94,0 <sup>g</sup> ± 1,0
53RC8D	92,0 <sup>f</sup> ± 3,0	42RC8D	98,0 <sup>h</sup> ± 1,0

Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

### 5.3.6 Grau de polimerização (GP) e Difração de raios-X (DRX)

Os valores de GP (Tabela 11) das CBs de *K. xylinus* ATCC 53582 aumentaram consideravelmente conforme o tempo de cultivo, até alcançarem o máximo de 4538 em MHS e 4849 em MRC, sem diferença estatística entre esses tratamentos, indicando que a qualidade da CB produzida pela cepa no meio alternativo é equivalente a do meio sintético. *K. xylinus* ARS B42 sintetizou CBs com GP superior em MRC em comparação ao MHS, atingindo até 3473 no dia 8, sem diferença estatística para os demais tempos de cultivo, representando que o meio alternativo permite obtenção de CB com qualidade estrutural desde o início do bioprocessamento. Esses resultados apontam que a CB produzida por *K. xylinus* ATCC 53582 e *K. xylinus* ARS B42 em MRC tem tendência a apresentar maior quantidade de monômeros de glicopiranosose nas fibras de sua estrutura, já que apresentaram maior GP nesse meio. GP está relacionado ao número de unidades de glicanopiranosose presentes em um mol de CB (SHINODA et al., 2012), e essas glicopiranososes, quando associadas, formam cadeias macromoleculares lineares, bem comuns na estrutura de celulose, que garantem as características peculiares da CB (MIAO et al., 2011). Todas as amostras apresentaram valores dentro ou próximo da faixa padrão de GP sugerida para CB, de 1600 a 6000, que é superior quando comparado a celulose vegetal (300 – 1700) (BLANCO et al., 2018; HASSAN et al., 2015; SHI et al., 2013; SKIBA et al., 2019).

Tabela 11. Grau de polimerização (GP), índice de cristalinidade (IC) e tamanho do cristalito (CrS) de membranas de celulose bacteriana produzidas por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (53) e *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (42) em diferentes tempos de cultivo D (4, 6 e 8 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC). Letras iguais (a, b, c, d, e, f, g, h), na mesma coluna, não apresentam diferenças estatisticamente significativas  $\alpha = (0,05)$ .

Amostra	GP	IC (%)	CrS (nm)
53HS4D	1211,0 ± 35,0 <sup>f</sup>	96,4 ± 0,3 <sup>ab</sup>	7,8 ± 0,1 <sup>c</sup>
53HS6D	4111,0 ± 18,0 <sup>b</sup>	97,1 ± 0,4 <sup>ab</sup>	6,7 ± 0,1 <sup>d</sup>
53HS8D	4538,0 ± 25,0 <sup>a</sup>	95,8 ± 0,7 <sup>b</sup>	7,8 ± 0,1 <sup>c</sup>
53RC4D	3420,0 ± 24,0 <sup>c</sup>	97,9 ± 0,6 <sup>a</sup>	6,7 ± 0,1 <sup>d</sup>
53RC6D	4175,0 ± 21,0 <sup>b</sup>	97,4 ± 0,3 <sup>ab</sup>	6,7 ± 0,1 <sup>d</sup>
53RC8D	4849,0 ± 67,0 <sup>a</sup>	97,4 ± 0,6 <sup>ab</sup>	6,5 ± 0,1 <sup>e</sup>
42HS4D	2416,0 ± 6,0 <sup>d</sup>	97,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	8,4 ± 0,1 <sup>b</sup>
42HS6D	1829,0 ± 3,0 <sup>e</sup>	96,7 ± 0,5 <sup>a</sup>	8,7 ± 0,1 <sup>a</sup>
42HS8D	1396,0 ± 11,0 <sup>f</sup>	95,9 ± 0,7 <sup>b</sup>	7,7 ± 0,1 <sup>c</sup>
42RC4D	3314,0 ± 55,0 <sup>c</sup>	97,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,1 <sup>e</sup>
42RC6D	3383,0 ± 8,0 <sup>c</sup>	98,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,1 <sup>e</sup>
42RC8D	3473,0 ± 49,0 <sup>c</sup>	96,4 ± 0,3 <sup>ab</sup>	6,5 ± 0,1 <sup>e</sup>

Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

Maior GP conforme o tempo de cultivo se dá pelo aumento do número de fibrilas excretadas pela bactéria, ocasionando uma tendência à formação de fibras maiores e, conseqüentemente, com maior polimerização de unidades glicanopiranosose. A diminuição do GP observada nas CBs de *K. xylinus* ARS B42 em MHS possivelmente aconteceu devido ao elevado consumo de açúcares do meio. Como as bactérias do ácido acético são aeróbias estritas, a biossíntese de novas camadas de CB é realizada na superfície das camadas já formadas (CAMPANO et al., 2016; DOURADO et al., 2016); com o passar do tempo, aumenta o número de células, acumulam-se produtos metabólicos no meio e nas camadas da membrana e esgotam-se os nutrientes, promovendo a diminuição do GP das novas camadas de CB sintetizadas (SHI et al., 2013; SKIBA et al., 2019). Considerando que durante o cultivo *K. xylinus* ARS B42

consumiu de 65 a 80% dos açúcares do MHS entre os dias 4 e 8, a menor disponibilidade de substrato provavelmente contribuiu para aumento da tendência à diminuição do grau de polimerização das CBs com o aumento do tempo de cultivo. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que também avaliaram GP em CB (PENTTILÄ; SUGIYAMA; IMAI, 2016; SHI et al., 2013; SKIBA et al., 2019; ŻYWICKA et al., 2019).

GP também está correlacionado com a resistência mecânica e o arranjo das fibras de CB. Quanto maior os níveis de GP, maiores serão a resistência mecânica e reticulação do arranjo de fibrilas (TAHARA et al., 1997; ŻYWICKA et al., 2019). Tal relação é justificada pelos resultados de EMIC (Tabela 8), onde *K. xylinus* ATCC 53582 apresentou características mecânicas superiores em MRC e MHS, e de MEV (Figura 15), onde *K. xylinus* ARS B42 apresentou uma rede de fibrilas mais entrelaçada e interligada nos tratamentos com MRC.

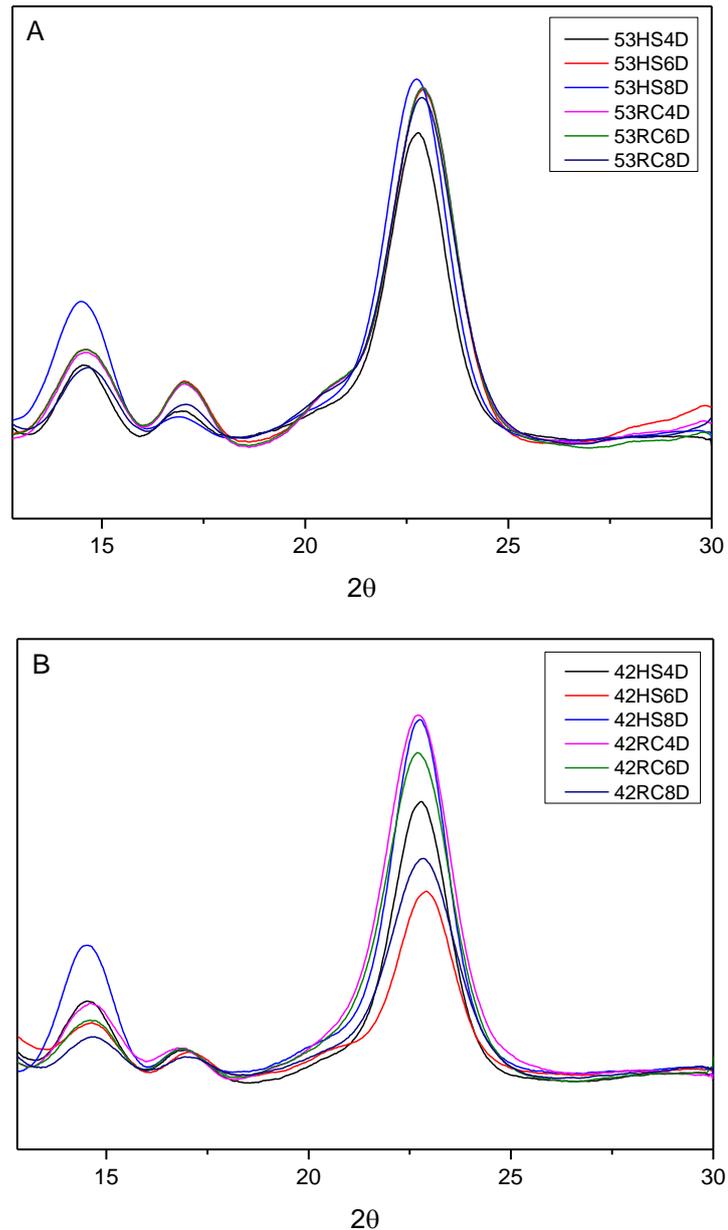
Em relação aos resultados de DRX, Os difratogramas de todas as membranas de CB (Figura 16) produzidas pelas cepas em MRC e MHS apresentaram padrões típicos de celulose do tipo I, dominante em celulose sintetizada por bactérias, com três picos principais de difração  $2\theta$  em torno de  $14^\circ$ ,  $16^\circ$  e  $22^\circ$ , normalmente atribuídos aos planos cristalográficos (101) e (10-1), de menor intensidade e referentes a regiões de vale amorfo; e (002), de maior intensidade e correspondente ao plano cristalino. Todos eles são característicos da celulose produzida por bactérias (GHOZALI; MELIANA; CHALID, 2021; MAEDA et al., 2006; SHEZAD et al., 2010; VAZQUEZ et al., 2013).

Picos de difração  $2\theta$  em torno dos ângulos  $12^\circ$  e  $20^\circ$ , ausentes nos resultados deste trabalho, são característicos de celulose II, que pode ser obtida por mercerização a partir da celulose I quando exposta a tratamento alcalino, onde o reagente adentra na estrutura da celulose, desfazendo as ligações intermoleculares (ALEMAM et al., 2021; BORRO, 2021). A ausência desses picos é mais um indicativo de que a etapa de purificação de CB, realizada com NaOH, foi efetiva, não deixou resquícios do reagente na estrutura e, principalmente, não modificou o tipo de celulose.

Algumas pequenas variações das intensidades dos picos, principalmente no ângulo  $2\theta \cong 22^\circ$ , podem estar relacionadas com mudanças na cristalinidade ou conformação da celulose (GHOZALI; MELIANA; CHALID, 2021). Percebe-se que nas amostras de *K. xylinus* ARS B42 (Figura 16B) alguns picos em torno de  $22^\circ$  se fazem menos acentuados quando comparados aos de *K. xylinus* ATCC 53582 (Figura 16A), e isso possivelmente é associado ao grau de emaranhamento da rede de fibras da celulose, já que as maiores intensidades de picos, podem ser resultados de uma densa estrutura das membranas de CB (SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010). Esses resultados podem ser relacionados aos de MEV e CAA,

quando, conforme já foi relatado, as membranas de *K. xylinus* ARS B42 apresentam um aspecto de organização de fibras mais aberto e menos denso.

Figura 16. Difratomogramas de membranas de celulose bacteriana produzidas em diferentes tempos de cultivo D (4, 6 e 8 dias) e sistema estático em meio sintético HS (MHS) e meio residual de caju retido e centrifugado (MRC) por: *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 (A) e *Komagataeibacter xylinus* ARS B42 (B).



Fonte: Elaborado pelo Autor (2023).

Os maiores índices de cristalinidade (IC) (Tabela 11) foram obtidos nas amostras de *K. xylinus* ARS B42, que diminuíram discretamente conforme o tempo de cultivo. Em MRC

as CBs apresentaram resultados superiores, com variação máxima de 98,1 a 96,4 % durante o cultivo. Em MHS IC variou de 97,8 a 95,9 % entre os dias 4 e 8. Para CBs de *K. xylinus* ATCC 53582 o maior IC foi obtido no dia 4 em MRC (97,9 %), que se manteve constante também nos dias 6 e 8; já nos tratamentos com MHS o IC sofreu alteração até o dia 8 (97,1 – 95,8 %). Essa pequena diminuição do IC observada nos tratamentos ao longo do cultivo representa uma redução no nível de organização das fibras da CB formada. Apesar disso, todas as amostras de *K. xylinus* ATCC 53582 e *K. xylinus* ARS B42 apresentaram elevada cristalinidade quando comparadas à celulose de origem vegetal, que varia de 56 a 65%, e ao IC padrão reportado na literatura para CB, que pode atingir valores acima de 90% (PECORARO et al., 2007; TSOUKO et al., 2015).

Em relação ao tamanho do cristalito (CrS) (tabela 11), os valores foram semelhantes entre os tratamentos, variando de 8,7 a 6,4 nm, que justificam a utilização do método proposto por Seagal et al., (1959) para o cálculo do índice de cristalinidade, onde afirma que 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 (BARROS, 2021; FRENCH; SANTIAGO CINTRÓN, 2013). Outros estudos também já relataram tamanho do cristalito de CB produzidas por bactérias *K. xylinus* e em diferentes meios variando de 5,6 até 12,7 nm (KHANDELWAL; WINDLE; HESSLER, 2016; MULLER, 2012; RUKA; SIMON; DEAN, 2012; SHEYKHNAZARI et al., 2011).

Os IC superiores obtidos indicam que MRC não comprometeu a estrutura cristalina das membranas sintetizadas e, por ter se sobressaído em relação ao MHS em alguns tratamentos, influenciou positivamente na obtenção de um dos principais atributos da CB, já que o grau de cristalinidade exerce influência sob propriedades físico-químicas e físicas da celulose, principalmente em relação às características térmicas, mecânicas e de capacidade de absorção de água (KLEMM et al., 2005; MARTÍNEZ-SANZ; LOPEZ-RUBIO; LAGARON, 2011; SCHENZEL; FISCHER; BRENDLER, 2005; SOKOLNICKI et al., 2006). Isso justifica os resultados de TGA, EMIC e CAA (Tabelas 7,8 e 9, respectivamente) obtidos pelas cepas em MRC. Além disso, uma agregação progressiva de microfibrilas de celulose na estrutura molecular é refletida pelo aumento do teor de forma cristalina e pela diminuição do estado amorfo na celulose (LIU et al., 2012), o que possivelmente justifica a maior cristalinidade para os tratamentos com MRC, já que estes apresentaram rede fibras mais interconectadas, conforme observado nas análises de MEV (Figura 15).

Os resultados de cristalinidade deste trabalho foram superiores aos relatados por Souza et al., (2020) para CB produzida por *K. xylinus* ATCC 53582 em meio de suco de caju,

melaço de soja e meio sintético HS (35 – 87 %); e semelhantes aos de Mikkelsen et al., (2009) e Ruka et al., (2012), que alcançaram IC em torno de 90 % em estudos da influência de diferentes fontes de carbono alternativas na produção de CB por *K. xylinus* ATCC 53524. Alguns outros autores também avaliaram IC em CB oriunda de substratos alternativos, tais como açúcares extraídos de pó de madeira, resíduos da indústria de açúcar mascavo, soro de leite, mistura de frutas podres, farelo de girassol, resíduos de farinha hidrolisados (ERBAS; KIZILTAS; GARDNER, 2015; HUANG et al., 2015; JUNG et al., 2010; KESHK; RAZEK; SAMESHIMA, 2006; KHATTAK et al., 2015; VAZQUEZ et al., 2013); porém nenhum relata valores superiores aos de IC obtidos em MRC.

#### **5.4 Potencial de aplicação de CB**

Resistência a diferentes tensões e temperaturas, alta cristalinidade e excelentes propriedades absorventes são atributos diferenciais para garantir a boa aplicação de CB (GREGORY et al., 2021). Os perfis de resistência térmica e mecânica são fatores determinantes para a eficiência de aplicação de um biomaterial desenvolvido. Dependendo da finalidade do produto a ser adquirido, durante o processo, inúmeros fatores adversos podem causar perdas ou modificação do material, e estes são indicativos para determinar as suas possibilidades de utilização (SWINGLER et al., 2021). Essas características estão presentes nas membranas de CB sintetizadas por *K. xylinus* ATCC 53582 e *K. xylinus* ARS B42, e sugerem possibilidades de adequação em diferentes aplicações.

Na indústria de embalagens, diante da busca pelo desenvolvimento de bioplásticos, uma das principais alternativas potenciais de base biológica atualmente estudadas é a utilização de biopoliésteres em alguma etapa do processo. No entanto, alguns dos mais utilizados, tal como o “poli(3-hidroxi-butirato)” (P(3HB)), são termicamente instáveis, apresentando degradação em temperaturas elevadas, e necessitam da associação com outros tipos de materiais para aumentar sua resistência térmica durante a fabricação. Além de ter que resistir a altas temperaturas, o material também deve suportar altos valores de força mecânica sem se deformar estruturalmente (GREGORY et al., 2021). Na indústria do papel e celulose, em estudos que buscam priorizar a temática ambiental, a necessidade de formas alternativas de produção a partir de recursos ecológicos e sustentáveis fez com que a utilização do papel reciclável se tornasse uma tendência emergente. O maior desafio para o papel reciclado é a manutenção dos seus atributos físicos e mecânicos originais. Considerando que CB naturalmente já tem capacidade

de melhorar as propriedades mecânicas dos materiais com os quais é combinado, é um forte candidato para produzir papel ou celulose de alta qualidade e de forma sustentável (PHAN et al., 2023). Algumas pesquisas já desenvolvidas nessa área demonstram que CB com módulo de Young acima de 10 GPa fornece propriedades mecânicas notáveis para um aditivo ultra resistente na fabricação de papel (GREGORY et al., 2021). Outros diferenciais que contribuem para aplicação da CB na obtenção de papel mais resistente são a alta cristalinidade e uma baixa porosidade interna (SANTOS et al., 2015). Apesar de tais particularidades, a desvantagem atual de utilizar CB, nesse caso, ainda é o alto custo associado a produção. Essas duas áreas de aplicação evidenciam a possibilidade de utilização da CB produzida por *K. xylinus* ATCC 53582 em MRC e MHS nos processos de obtenção de bioplásticos e papel reciclável, já que apresentaram valores altos de resistência mecânica e temperatura inicial de degradação, associados a uma cristalinidade acima de 95%. Levando em consideração também a problemática dos custos, a produção de CB a partir do meio MRC poderia ser uma vantagem adicional para esses processos.

Na indústria têxtil, diante da importância da perspectiva ambiental de introdução de tecidos ecológicos em roupas e produtos, as membranas de CB também apresentam propriedades mecânicas com características adequadas para utilização (WOOD, 2019). O impasse principal para essa aplicação é a pouca flexibilidade do material, porém alguns autores relatam que uma estrutura de CB densa, mesmo sendo muito porosa, apresenta maior facilidade de receber melhorias de flexibilidade devido ao maior alongamento na ruptura. Outros problemas relatados são decorrentes da decomposição do material quando este é submetido a secagem em altas temperaturas (FERNANDES et al., 2019; SILVA JUNIOR et al., 2021). Como as membranas de *K. xylinus* ATCC 53582 apresentaram uma estrutura densa com maiores valores de alongação na ruptura e altos valores de temperatura inicial de degradação, são materiais potenciais para estudos de desenvolvimento de tecidos ecológicos.

Na área biomédica, as propriedades mecânicas superiores da CB de *K. xylinus* ATCC 53582 também permitem sua aplicação na terapêutica de câncer, através da obtenção de scaffolds que ofereçam recursos mecânicos controláveis para suportar crescimento celular, motilidade, sinalização celular e microambiente tumoral e fornecer capacidade controlada de carga e transporte de drogas (BANDYOPADHYAY; SAHA; SAHA, 2018; SALARI et al., 2019). Além dos atributos mecânicos, o scaffold ideal para ser usado no tratamento de câncer deve possuir alta pureza e biocompatibilidade e capacidade de absorver líquidos (ISLAM et al., 2021). Propriedades cumulativas de alta cristalinidade e pureza, em comparação com materiais comumente usados, promovem essa CB como um material médico qualitativo superior, pois

representa um biopolímero ideal que possui alta capacidade de simular o colágeno natural devido as suas excelentes propriedades mencionadas acima (SHI et al., 2014).

Outras possibilidades de aplicação da CB que estão relacionadas ao seu desempenho mecânico superior, como é o caso das membranas de *K. xylinus* ATCC 53582, são: na fabricação de dispositivos eletrônicos, quando é interessante que a CB apresente elevada tensão de ruptura, transparência e melhor resistência aos efeitos desnaturantes dos líquidos isolantes (URBINA et al., 2021); na produção de vasos sanguíneos artificiais devido a biocompatibilidade, arquitetura de rede fibrosa e boa resistência à tração (YAN et al., 2017); na entrega e liberação de compostos antimicrobianos em sistemas biológicos, por necessitar de maior resistência a tração para receber propriedades e funções adicionais (ARGEL et al., 2022); na formulação de implantes cirúrgicos ideais, já que necessitam de alta resistência a tração, elasticidade e capacidade de absorção de água, combinadas com baixo nível de efeitos citotóxicos e biocompatibilidade (SWINGLER, et al., 2021). Em todas elas, os perfis de resistência mecânica apresentados pelas membranas de *K. xylinus* ATCC 53582 são adequados para serem aplicados no processo de modo a oferecer bons resultados.

O potencial de biopolímero superabsorvente da CB de *K. xylinus* ARS B42 também permite grandes possibilidades para sua aplicação. Na indústria alimentícia, embalagens e compressas antimicrobianas feitas de materiais superabsorventes, são capazes de conservar os atributos sensoriais de alimentos embalados, como frutas, vegetais e produtos cárneos que, de outra forma, tendem a gerar exsudatos durante o armazenamento (STROESCU et al., 2018). Dependendo da qualidade alimentar, a CB também pode fornecer embalagens comestíveis com características nutricionais, físicas e mecânicas adequadas (ZAHAN et al., 2020). CB absorvente também pode ser utilizada como um agente estabilizador, gelificante e espessante, devido sua excelente capacidade de retenção, e ainda são classificados pela FDA como produtos GRAS que podem atuar como suplemento de fibras dietéticas em alimentos (LUDWICKA; KACZMAREK; BIAŁKOWSKA, 2020; RESHMY et al., 2021). Nessa área, outro diferencial desse material é a alta cristalinidade, permitindo sua utilização na produção de probióticos, que devido a vida útil curta e problemas de instabilidade, tem sua aplicação limitada. A possibilidade de encapsular materiais biocompatíveis em probióticos é uma estratégia bem utilizada para amenizar esse problema e melhorar a proteção contra condições ácidas no gastrointestinal. Se a CB apresentar índice de cristalinidade acima de 95%, como é o caso de todas as membranas produzidas em MHS e MRC, assim como não toxicidade e propriedades em nanoescala, ela pode ser usada adequadamente para encapsular diferentes tipos de probióticos (JAYANI et al., 2020; SÁ et al., 2020).

A capacidade de absorção de água por CB também oferece possibilidades na engenharia civil. A necessidade de materiais de construção ecoeficientes abriu novas fronteiras na tecnologia de concreto, empregando materiais com propriedades multifuncionais que promovam a hidratação do cimento, o reforço a microestruturas danificadas, redução da porosidade e aumento da resistência mecânica. A natureza intrínseca hidrófila e higroscópica das CB, associadas a grande área de superfície, quando presentes em grandes quantidades nas trincas da construção civil, tornam eficientes a estabilização e supressão das rachaduras, melhorando o intertravamento mecânico da estrutura interna e garantindo o reforço do concreto (GREGORY et al., 2021; PETERS et al., 2010).

A alta performance de absorção de água é um dos requisitos mais importantes no desenvolvimento de curativos para tratamento de feridas. Os materiais poliméricos naturais que foram testados até agora como curativos para feridas incluem ágar, alginato de sódio, ácido hialurônico, quitina, quitosana, carragenina, celulose, pectina, amido e colágeno. A variedade de formas de curativos inclui bandagens, hidrogéis, papel alumínio, esponjas, espumas, mantas de nanofibras (ZHENG et al., 2020). Os curativos secos convencionais, como gaze absorvente e/ou curativos de algodão absorvente, têm um efeito terapêutico limitado e exigem várias trocas de curativos, afetando negativamente a experiência do paciente (STOICA; CHIRCOV; GRUMEZESCU, 2020). Um dos principais fatores externos responsáveis pela cicatrização ideal da ferida é a hidratação. Esse, inclusive, é um dos diferenciais da utilização de pomadas ou hidrogéis no tratamento de feridas, pois resultam em melhoria e aceleração da cicatrização, quando comparados ao tratamento com curativos (ZHANG et al., 2020). A cicatrização úmida auxilia e facilita a limpeza da ferida pelo corpo, criando um ambiente limpo para a ferida. No caso de fibrina (proteína que atua como primeira reposta sempre que o corpo humano está ferido) e tecidos necróticos, eles são amolecidos e removidos. Já os exsudatos, detritos de tecido morto e bactérias são absorvidos pelo curativo (JANKAU et al., 2022).

Além de substâncias ativas adicionais, um bom curativo moderno para feridas deve garantir (ARGEL et al., 2022; JANKAU et al., 2022; KLEMM et al., 2021; ZHENG et al., 2020):

- Umidade apropriada;
- Absorção do excesso de exsudato;
- Porosidade apropriada (mantendo uma troca apropriada de vapor de água gasoso e gases);
- Não causar reações alérgicas;

- Biocompatibilidade;
- Proteção da ferida contra infecções bacterianas (também como barreira física);
- Isolamento térmico adequado (relacionado também com a espessura do curativo);
- Fácil aplicação e remoção da ferida (adequada flexibilidade e resistência mecânica);
- Troca de curativo indolor (adesão adequada às células dos tecidos em regeneração);
- Remoção de células necróticas (adesão adequada à ferida, flexibilidade apropriada, tamanho, adaptabilidade a formas anatômicas);
- Observação do processo de cicatrização (transparência desejada);
- Veiculação de fármacos e melhoria da cinética de liberação dos princípios ativos.

A CB produzida por *K. xylinus* ARS B42 em MRC tem como grande diferencial a excelente capacidade superior de absorver água, sendo caracterizada como um biomaterial superabsorvente. Esse atributo é essencial para garantir um dos aspectos mais cruciais para boa e rápida cicatrização de feridas: a hidratação. Conforme foi relatado nos tópicos desta tese, nas análises de caracterizações realizadas, essas membranas apresentam: elevado percentual de umidade, acima de 98%, mesmo após submetidas a secagem seguida de reabsorção; porosidade e espaços vazios em sua rede estrutural para acumular água e outras moléculas, facilitar a troca gasosa e servir de suporte de agregação de fármacos; considerável resistência mecânica para servir de barreira física de proteção e permitir flexibilidade do material com durabilidade e fácil manuseio; elevada transparência e grau de pureza, sem contaminantes em sua estrutura; além de resistência térmica para permitir o isolamento térmico. Dessa forma, as membranas de CB sintetizadas por *K. xylinus* ARS B42 em meio alternativo, tem grande potencial de aplicação em processos de formulação de biocurativos para cicatrização de feridas, podendo contribuir na obtenção de um material biomédico que seja biocompatível, biodegradável e mais viável economicamente.

## 6 CONCLUSÃO

O efluente residual de cajuína microfiltrada apresentou grande potencial como meio de cultivo para produção de CB por bactérias do gênero *Komagataeibacter*. O meio alternativo foi mais vantajoso para obtenção das membranas de CB do que o próprio meio sintético, possibilitando resultados de produção e produtividade equivalentes ou superiores. MRC ainda apresentou naturalmente fontes de carboidratos, proteínas, fibras e sais minerais essenciais em quantidades favoráveis para o crescimento microbiano, sem necessidade do uso de pré-tratamentos ou suplementações.

Os maiores níveis de produção de CB foram alcançados por *K. xylinus* ATCC 53582, sem diferença entre os meios de cultivo avaliados. Apesar de *K. hansenii* ATCC 23769 e *K. xylinus* ARS B42 terem produzido menor quantidade de CB, os resultados do meio alternativo foram superiores ao do meio sintético. As produtividades também foram maiores nos tratamentos com MRC, porém, de modo geral, decresceram após alcançado metade do tempo de cultivo, o que não é atrativo do ponto de vista industrial. Já os rendimentos em função do consumo de substrato foram mais baixos em MRC, em razão, principalmente, da grande quantidade de açúcares presentes nesse meio. Uma avaliação da quantidade de ácido glucônico produzido e consumido durante o processo é necessária para a obtenção de maiores ganhos na produção de CB.

Membranas de CB produzidas em MRC apresentaram características térmicas, mecânicas e estruturais, superiores ou similares as do MHS, comprovando que o meio alternativo residual de suco de caju não comprometeu as propriedades do biopolímero. As análises EMIC mostraram que *K. xylinus* ATCC 53582 produziu CB em MRC e MHS com atributos superiores de resistência mecânica; enquanto *K. xylinus* ARS B42, apesar de menor taxa de produção, sintetizou CB em MRC com excelentes propriedades térmicas e, principalmente, hidrofílicas, muito superiores as do meio sintético, que são justificados pela associação dos resultados de CAA, MEV E TGA.

Por seus atributos de biopolímero superabsorvente, capaz de reter até 14864% de água em relação ao seu peso inicial, as membranas de *K. xylinus* ARS B42 produzidas em MRC são consideradas de alta performance e apresentam grande potencial de aplicação para curativos, probióticos, cosméticos, embalagens, fármacos e outros processos da indústria, podendo contribuir para obtenção de um produto biocompatível, biodegradável e de alto valor agregado.

## 7 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

- Realizar estudo das rotas metabólicas de *K. xylinus* com ênfase nos subprodutos formados, principalmente o ácido glucônico, durante o consumo de diferentes substratos;
- Estudar otimizações no meio alternativo MRC, tais como diluição da quantidade de açúcares presentes e uso de suplementação, para maiores ganhos de produção de CB;
- Investigar a importância da vitamina C no meio MRC como fator diferencial da produção de CB;
- Realizar ensaios de biodegradabilidade, citotoxicidade e reticulação nas membranas de *K. xylinus* ARS 242;
- Avaliar o potencial de absorção das membranas superabsorventes por repetidos ciclos de secagem e reabsorção de água;
- Realizar estudos de aplicação da CB de *K. xylinus* ARS B42 como biocurativo.

## REFERÊNCIAS

- ABDELRAOF, M.; HASANIN, M. S.; EL-SAIED, H. Ecofriendly green conversion of potato peel wastes to high productivity bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 211, n. October 2018, p. 75–83, 2019.
- ABEER, M. M.; MOHD AMIN, M. C. I.; MARTIN, C. A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: Their biochemistry, current approaches and future prospects. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 66, n. 8, p. 1047–1061, 2014.
- ABREU, F. A. P. DE; SOUZA, A. C. R. DE. Cajuína: Como Produzir Com Qualidade. [s. l.], [s. n.], 2004.
- ADETUYI, F. O.; IBRAHIM, T. A. Effect of Fermentation Time on the Phenolic, Flavonoid and Vitamin C Contents and Antioxidant Activities of Okra (*Abelmoschus esculentus*) Seeds. **Nigerian Food Journal**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 128–137, 2014.
- ADOU, M. *et al.* Phenolic profile of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) from Yamoussoukro and Korhogo (Côte d’Ivoire). **Journal of Applied Bioscience**, [s. l.], v. 49, n. January, p. 3331–3338, 2012.
- ALEMAM, A. M. *et al.* Production enhancement of bacterial cellulose nanofiber using local *Komagataeibacter xylinus* SB3.1 under static conditions. **Egyptian Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 2213–2221, 2021.
- ALGAR, I. *et al.* Pineapple agroindustrial residues for the production of high value bacterial cellulose with different morphologies. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 132, n. 1, p. 1–8, 2015.
- ALMEIDA, L. R. *et al.* New biotextiles for tissue engineering: Development, characterization and in vitro cellular viability. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 8167–8181, 2013.
- ALMEIDA, T. *et al.* Bacterial nanocellulose toward green cosmetics: Recent progresses and challenges. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 1–25, 2021.
- AMASON, A. C. *et al.* Effect of Atomized Delivery of Nutrients on the Growth Characteristics and Microstructure Morphology of Bacterial Cellulose. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 508–516, 2020.
- ANDRADE, I. DE *et al.* International Journal of Biological Macromolecules Bacterial cellulose : From production optimization to new applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 164, p. 2598–2611, 2020.
- ANDRADE, F. K.; DOURADO, F.; GAMA, F. M. Bacterial Cellulose : Properties , Production. [s. l.], p. 427–458, 2010.
- ANDRIANI, D.; APRIYANA, A. Y.; KARINA, M. The optimization of bacterial cellulose production and its applications: a review. **Cellulose**, [s. l.], v. 27, n. 12, p. 6747–6766, 2020.

ANKOM. Technology method 2: rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction. Macedon, 2009. p. 2

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis**.off AOAC International. 20 ed. Editor: Dr. George W. Latimer, Jr. Rockville, MD, [s. l.], USA, 2016.

AOCS. AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Method Am 5-04, Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction**. Urbana: Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, [s. l.], 2005.

ARGEL, S. *et al.* Assessment of Bacterial Nanocellulose Loaded with Acetylsalicylic Acid or Povidone-Iodine as Bioactive Dressings for Skin and Soft Tissue Infections. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 14, n. 8, 2022.

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**, [s. l.], v. 6, n. DEC, p. 1–19, 2015.

AVRĂMESCU, R. E. *et al.* Liquid marbles: From industrial to medical applications. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 1–30, 2018.

AZEREDO, H. M. C. *et al.* Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, [s. l.], v. 3, n. February, 2019.

AZILA, A. *et al.* Adnan, 2015. **Malaysian Journal of Analytical Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 1131–1136, 2015.

BAE, S.; SHODA, M. Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 1366–1371, 2004.

BANDYOPADHYAY, S.; SAHA, N.; SAHA, P. Characterization of Bacterial Cellulose Produced using Media Containing Waste Apple Juice. **Applied Biochemistry and Microbiology**, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 649–657, 2018.

BARROS, M. DE O. **Propriedades de celulose bacteriana: Influência do tempo de fermentação em diferentes cepas**. [s. l.], Universidade Federal do Ceará, 2021.

BARSHAN, S. *et al.* Optimization and characterization of bacterial cellulose produced by *Komagatacibacter xylinus* PTCC 1734 using vinasse as a cheap cultivation medium. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 136, p. 1188–1195, 2019.

BEKATOROU, A. *et al.* Bacterial cellulose production using the corinthian currant finishing side-stream and cheese whey: Process optimization and textural characterization. **Foods**, [s. l.], v. 8, n. 6, 2019.

BERNAUD, F. S. R.; RODRIGUES, T. C. Fibra alimentar - Ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, [s.

*l.*], v. 57, n. 6, p. 397–405, 2013.

BILGI, E. *et al.* Optimization of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* using carob and haricot bean. **International Journal of Biological Macromolecules**, [*s. l.*], v. 90, p. 2–10, 2016.

BLANCO, A. *et al.* **Nanocellulose for industrial use: Cellulose nanofibers (CNF), cellulose nanocrystals (CNC), and bacterial cellulose (BC)**. [*s. l.*], Elsevier Inc., 2018.

BOLDRIN, L. F. *Biossíntese, Aplicabilidade e Recentes Avanços no Estudo da Celulose Bacteriana*. [*s. l.*], p. 50, 2015.

BOZTUĞ, A.; BASAN, S. Characterization and synthesis of maleic anhydride-styrene-vinyl acetate terpolymer ester derivatives. **Journal of Materials Science**, [*s. l.*], v. 39, n. 22, p. 6843–6846, 2004.

BRAGA, D. C. *et al.* Multivariate correlation of the astringency sensory perception with the phenolic profiling of cashew apple genotypes. **Food Bioscience**, [*s. l.*], v. 41, n. December 2019, 2021.

BRASIL, M. A. P. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Instrução Normativa n.º. 37, de 1 de outubro de 2018. Instrução Normativa n.º. 37, de 1 de outubro de 2018**, 2018.

BUDHIONO, A. *et al.* Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system. **Carbohydrate Polymers**, [*s. l.*], v. 40, n. 2, p. 137–143, 1999.

ÇAKAR, F. *et al.* Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. **Carbohydrate Polymers**, [*s. l.*], 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**, [*s. l.*], v. 23, n. 1, p. 57–91, 2016.

CARNEIRO, M. J. M. **Produção e caracterização de celulose bacteriana obtida de suco de caju**. [*s.l: s.n.*].

CARREIRA, P. *et al.* Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. **Bioresource Technology**, [*s. l.*], v. 102, n. 15, p. 7354–7360, 2011.

CASTRO, C. *et al.* Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. **Carbohydrate Polymers**, [*s. l.*], v. 84, n. 1, p. 96–102, 2011.

CASTRO, T. DE; ABREU, F. A. P. DE; CARIOCA, J. O. B. Obtenção de suco clarificado de caju (*Anacardium occidentale*, L) utilizando processos de separação por membranas. **Revista Ciência ...**, [*s. l.*], p. 164–168, 2007.

CAZÓN, P.; VÁZQUEZ, M. Bacterial cellulose as a biodegradable food packaging material: A review. **Food Hydrocolloids**, [*s. l.*], v. 113, 2021.

CHAGAS, B. S. DAS. **Produção de celulose bacteriana em meio à base de melaço de soja em cultivo estático.** [s. l.], Universidade Federal do Ceará, 2018.

CHARCOSSET, C. Classical and Recent Applications of Membrane Processes in the Food Industry To cite this version : HAL Id : hal-03028872. 2020.

CHAWLA, P. R. *et al.* Microbial cellulose: Fermentative production and applications. **Food Technology and Biotechnology**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 107–124, 2009.

CHEN, C. *et al.* Bacterial cellulose-based biomaterials: From fabrication to application. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 278, n. November 2021, p. 118995, 2022.

CHEN, S.-Q. *et al.* Mechanical properties of bacterial cellulose synthesised by diverse strains of the genus *Komagataeibacter*. [s. l.], p. 87–95, 2018.

CHOI, S. M. *et al.* Bacterial Cellulose and Its Applications. **Polymers**, [s. l.], p. 183–222, 2022.

CIANCI, F. C. *et al.* Clarificação e concentração de suco de caju por processos com membranas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 579–583, 2005.

CIECHOLEWSKA-JUŚKO, D. *et al.* Potato juice, a starch industry waste, as a cost-effective medium for the biosynthesis of bacterial cellulose. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 19, 2021.

CIELECKA, I. *et al.* Highly Stretchable Bacterial Cellulose Produced by *Komagataeibacter hansenii* S11. [s. l.], 2021.

COLLADO, L. *et al.* hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. p. 1391–1396, 2009.

CZAJA, W. K. *et al.* The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications. [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–12, 2007.

DANTAS, B. D. S. **Efeito dos processos de extração e clarificação na composição química, perfil de ácidos anacárdicos e na adstringência do suco de caju.** [s. l.], Universidade Federal do Ceará, 2021.

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.** [s. l.], Universidade Federal de Viçosa, 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**, [s. l.], v. 238, p. 117859, 2019.

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

DOURADO, F. *et al.* **Taxonomic Review and Microbial Ecology in Bacterial**

**NanoCellulose Fermentation.** [s. l.], Elsevier B.V., 2016.

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.

DUARTE, É. B. *et al.* Celulose bacteriana: propriedades, meios fermentativos e aplicações. **Documentos (Embrapa Agroindústria Tropical)**, [s. l.], v. 186, p. 1–37, 2019.

DUARTE, F. N. D. *et al.* Potential prebiotic properties of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) agro-industrial byproduct on *Lactobacillus* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 97, n. 11, p. 3712–3719, 2017.

EICHHORN, S. J. *et al.* **Review : current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites.** [s.l: s.n.].

EPE, E. DE P. E. **A indústria de papel e celulose no Brasil e no mundo.** Disponível em: [https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-650/Pulp and paper\\_EPE+IEA\\_Português\\_2022\\_01\\_25\\_IBA.pdf](https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-650/Pulp%20and%20paper_EPE+IEA_Português_2022_01_25_IBA.pdf).

ERBAS, K. E.; KIZILTAS, A.; GARDNER, D. J. Synthesis of bacterial cellulose using hot water extracted wood sugars. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 124, p. 131–138, 2015.

FANG, L.; CATCHMARK, J. M. Characterization of cellulose and other exopolysaccharides produced from *Gluconacetobacter* strains. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 115, p. 663–669, 2015.

FERNANDES, M. *et al.* Development of novel bacterial cellulose composites for the textile and shoe industry. **Microbial Biotechnology**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 650–661, 2019.

FLOREA, M. *et al.* Genome sequence and plasmid transformation of the model high-yield bacterial cellulose producer *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 53582. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. March, p. 1–9, 2016.

FREITAS, A. S. DE *et al.* Suitability of peduncles of new cashew tree clones for commercial purposes. **Revista Ciencia Agronomica**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 1–8, 2020.

FRENCH, A. D.; SANTIAGO CINTRÓN, M. Cellulose polymorphy, crystallite size, and the Segal Crystallinity Index. **Cellulose**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 583–588, 2013.

GAO, M. *et al.* A natural in situ fabrication method of functional bacterial cellulose using a microorganism. **Nature Communications**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–10, 2019.

GASPARETTO, D. Caracterização do processo de separação por membranas aplicado a remoção de taninos do suco de caju Characterization of the separation-by-membrane process applied to the removal of tannin from cashew juice. p. 57–65, 2007.

GAYATHRY, G.; JOTHILAKSHMI, K. Fermentative Production of nata-de-cashew from Calcium Alginate Incorporated Cashew Apple Juice Medium. **International Journal of**

**Fermented Foods**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 37–41, 2020.

GEA, S. *et al.* Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 102, n. 19, p. 9105–9110, 2011.

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

GIBSON, L. J. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. n. August, p. 2749–2766, 2012.

GNOUMOU, J. I. K. *et al.* Optimization of a Cocktail Based on Cashew Apple and Papaya Juice Using Mixing Design. **Journal of Food and Nutrition Research**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 50–57, 2022.

GOTTSCHALK, L.; OLIVEIRA, A.; SILVA, O. Produção de Celulose Bacteriana e suas Aplicações. **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, [s. l.], n. Rio de Janeiro, 2021.

GREGORY, D. A. *et al.* Bacterial cellulose: A smart biomaterial with diverse applications. **Materials Science and Engineering R: Reports**, [s. l.], v. 145, n. May, p. 100623, 2021.

GÜZEL, M.; AKPINAR, Ö. Production and Characterization of Bacterial Cellulose from Citrus Peels. **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 2165–2175, 2019.

HA, J. H. *et al.* Bacterial cellulose production from a single sugar  $\alpha$ -linked glucuronic acid-based oligosaccharide. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 46, n. 9, p. 1717–1723, 2011.

HASSAN, E. *et al.* The Characterization of Bacterial Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum* and *Komagataeibacter saccharovorans* under Optimized Fermentation Conditions. **British Microbiology Research Journal**, v. 9, n. 3, p. 1–13, 2015.

HE, F. *et al.* Production and characterization of bacterial cellulose obtained by *Gluconacetobacter xylinus* utilizing the by-products from Baijiu production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 927–936, 2020.

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

HUANG, C. *et al.* Utilization of Corn cob Acid Hydrolysate for Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter xylinus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 175, n. 3, p. 1678–1688, 2015.

HUANG, Y.; ZHU, C.; YANG, J. Recent advances in bacterial cellulose. p. 1–30, 2014.

ILLA, M. P.; SHARMA, C. S.; KHANDELWAL, M. I F E S sciences for life Tuning the physiochemical properties of bacterial cellulose : effect of drying conditions. **Journal of Materials Science**, [s. l.], v. 54, n. 18, p. 12024–12035, 2019.

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

ISLAM, S. U. *et al.* Potential applications of bacterial cellulose and its composites for cancer treatment. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 301–309, 2021.

JACEK, P. *et al.* Molecular aspects of bacterial nanocellulose biosynthesis. **Microbial Biotechnology**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 633–649, 2019.

JAHAN, F.; KUMAR, V.; SAXENA, R. K. Distillery effluent as a potential medium for bacterial cellulose production: a biopolymer of great commercial importance. **Bioresource Technology**, 2017.

JANKAU, J. *et al.* Bacterial Cellulose Properties Fulfilling Requirements for a Biomaterial of Choice in Reconstructive Surgery and Wound Healing. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, n. February, 2022.

JAYANI, T. *et al.* Bacterial Cellulose Nano Fiber (BCNF) as carrier support for the immobilization of probiotic, *Lactobacillus acidophilus* 016. **Carbohydrate Polymers**, v. 250, n. March, p. 116965, 2020.

JEDRZEJCZAK-KRZEPKOWSKA, M. *et al.* **Recent Findings**. [s. l.], Elsevier B.V., 2016.

JÉSSYCA DE ARAÚJO BORRO. **Produção de celulose bacteriana utilizando substratos alternativos no meio de cultura**. [s. l.], Universidade estadual paulista, 2021.

JIA, Y. *et al.* Rheological behaviors of Pickering emulsions stabilized by TEMPO-oxidized bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 215, n. March, p. 263–271, 2019.

JOZALA, A. F. *et al.* Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1181–1190, 2015.

JUNG, H. IL *et al.* Production and characterization of cellulose by *acetobacter* sp. V6 using a cost-effective molasses-corn steep liquor medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 2, p. 486–497, 2010.

K. F. LEITE, A. *et al.* Atmospheric cold plasma frequency imparts changes on cashew apple juice composition and improves vitamin C bioaccessibility. **Food Research International**, [s. l.], v. 147, n. May, p. 110479, 2021.

KADIER, A. *et al.* Use of industrial wastes as sustainable nutrient sources for bacterial cellulose (BC) production: Mechanism, advances, and future perspectives. **Polymers**, v. 13, n. 19, 2021.

KAMARUDIN, S. *et al.* Different media formulation on biocellulose production by *Acetobacter xylinum* (0416). **Pertanika Journal of Science and Technology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 29–36, 2013.

- KANNAN, V. *et al.* Microbial production of value-added products from cashew apples - an economical boost to cashew farmers. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 1816–1832, 2021.
- KAPRASOB, R. *et al.* Changes in physico-chemical, astringency, volatile compounds and antioxidant activity of fresh and concentrated cashew apple juice fermented with *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 55, n. 10, p. 3979–3990, 2018.
- KAWANO, S. *et al.* Cloning of cellulose synthesis related genes from *Acetobacter xylinum* ATCC23769 and ATCC53582: Comparison of cellulose synthetic ability between strains. **DNA Research**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 149–156, 2002.
- KESHK, S. M. A. S. Vitamin C enhances bacterial cellulose production in *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 99, p. 98–100, 2014.
- KESHK, S. M. A. S.; RAZEK, T. M. A.; SAMESHIMA, K. Bacterial cellulose production from beet molasses. **African Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 5, n. 17, p. 1519–1523, 2006.
- KHALIL, H. P. S. A.; BHAT, A. H.; YUSRA, A. F. I. Green composites from sustainable cellulose nanofibrils : A review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 87, n. 2, p. 963–979, 2012.
- KHANDELWAL, M.; WINDLE, A. H.; HESSLER, N. In situ tunability of bacteria produced cellulose by additives in the culture media. **Journal of Materials Science**, [s. l.], v. 51, n. 10, p. 4839–4844, 2016.
- KHATTAK, W. A. *et al.* Production, characterization and biological features of bacterial cellulose from scum obtained during preparation of sugarcane jaggery (gur). **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 52, n. 12, p. 8343–8349, 2015.
- KIM, Y.-J. *et al.* Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter* sp . RKY5 in a Rotary. v. 136, n. 4, p. 529–537, 2007.
- KLEMM, D. *et al.* Bacterial synthesized cellulose  $\text{D arti}^{\text{®}}$  cial blood vessels for microsurgery. v. 26, 2001.
- KLEMM, D. *et al.* Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, [s. l.], v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.
- KLEMM, D. *et al.* Biotech nanocellulose: A review on progress in product design and today's state of technical and medical applications. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 254, n. October 2020, p. 117313, 2021.
- KONGRUANG, S. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 148, n. 1–3, p. 245–256, 2008.
- KUO, C. H. *et al.* Hydrolysis of Orange Peel with Cellulase and Pectinase to Produce

Bacterial Cellulose using *Gluconacetobacter xylinus*. **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 85–93, 2019.

KUROSUMI, A. *et al.* Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 76, n. 2, p. 333–335, 2009.

LAHIRI, D. *et al.* Bacterial cellulose: Production, characterization and application as antimicrobial agent. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 23, p. 1–18, 2021.

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

LAVOINE, N. *et al.* Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials : A review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], 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**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 10–32, 2014.

LI, Y. *et al.* Improvement of bacterial cellulose production by manipulating the metabolic pathways in which ethanol and sodium citrate involved. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 96, n. 6, p. 1479–1487, 2012.

LIMA, B. L.; ALVES, A. S.; MARTINS, G. C. F. Artigos Biofabricação : Cultivo De Celulose Bacteriana Para a Área De Moda Biofabrication : Bacterial Cellulose Cultivation for Fashion Application. v. 0899, p. 153–164, 2021.

LIMA, H. L. S. **Avaliação do potencial do líquido de sisal e do suco de caju para a produção de celulose bacteriana**. [s. l.], Universidade Federal do Ceará, 2014.

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

LIMA, M. H. A. **Obtenção de nanocelulose a partir da funcionalização de celulose por oxipropilação**. [s. l.], Universidade Federal de São Carlos, 2020.

LIN, W. C. *et al.* Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 603–611, 2013.

LIU, L. P. *et al.* A lambda red and FLP/FRT-mediated site-specific recombination system in *komagataeibacter xylinus* and its application to enhance the productivity of bacterial cellulose. **ACS Synthetic Biology**, v. 9, n. 11, p. 3171–3180, 2020.

LIU, Y. *et al.* Comparative investigation of fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and X-ray diffraction (XRD) in the determination of cotton fiber crystallinity. **Applied Spectroscopy**, v. 66, n. 8, p. 983–986, 2012.

LUDWICKA, K. *et al.* Stable composite of bacterial nanocellulose and perforated polypropylene mesh for biomedical applications. v. 1, p. 1–10, 2018.

LUDWICKA, K.; KACZMAREK, M.; BIAŁKOWSKA, A. Bacterial nanocellulose—a biobased polymer for active and intelligent food packaging applications: Recent advances and developments. **Polymers**, v. 12, n. 10, p. 1–23, 2020.

MADALOZZO, E. S. *et al.* Obtention of *Acetobacter xylinum* bacteria's cepas isolated from the Capim-limão's leaves in nature. 2008.

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

MARTIN, C. Indústria de celulose e papel demonstra resiliência em meio a cenário adverso. **Revista O papel**, n. March, p. 46–55, mar. 2022.

MARTÍNEZ-SANZ, M.; LOPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. Optimization of the nanofabrication by acid hydrolysis of bacterial cellulose nanowhiskers. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 228–236, 2011.

MASAOKA, S.; OHE, T.; SAKOTA, N. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 1, p. 18–22, 1993.

MIAO, J. *et al.* Lysostaphin-functionalized cellulose fibers with antistaphylococcal activity for wound healing applications. **Biomaterials**, v. 32, n. 36, p. 9557–9567, 2011.

MIKKELSEN, D. *et al.* Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 2, p. 576–583, 2009.

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.

MONTE, P. M. P.; ARAÚJO, R. C. P. DE; FIGUEIRÊDO, M. C. B. Avaliação das pegadas hídrica e de carbono da amêndoa da castanha de caju processada em minifábricas no estado do Ceará. v. 15, n. 2021, p. 51–71, 2022.

MOON, R. J. *et al.* **Chem Soc Rev Cellulose nanomaterials review : structure , properties and nanocomposites.** [s.l.: s.n.].

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, n. 2, p. 134–179, 2008.

MULLER, D. **Incorporação de polímeros intrinsecamente condutores em nanofibras de celulose bacteriana.** [s. l.], Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

NAGASHIMA, A.; TSUJI, T.; KONDO, T. A uniaxially oriented nanofibrous cellulose scaffold from pellicles produced by *Gluconacetobacter xylinus* in dissolved oxygen culture. **Carbohydrate Polymers**, v. 135, p. 215–224, 2016.

NAGPAL, R.; KUMAR, A.; KUMAR, M. Fortification and fermentation of fruit juices with probiotic lactobacilli. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1573–1578, 2012.

NASCIMENTO, E. S. DO. **Extrato de algabroba como fonte alternativa para produção de celulose bacteriana**. [s. l.], Universidade Federal do ceará, 2014.

NASCIMENTO, H. A. DO. **Produção de biopolímero de celulose bacteriana aditivado com antioxidante natural**. [s. l.], Universidade Federal de Pernambuco, 2022.

NAZ, S.; ALI, J. S.; ZIA, M. Nanocellulose isolation characterization and applications : a journey from non-remedial to biomedical claims. **Bio-Design and Manufacturing**, 2019.

NECHYPORCHUK, O.; BELGACEM, M. N.; BRAS, J. Production of cellulose nanofibrils : A review of recent advances. **Industrial Crops & Products**, v. 93, p. 2–25, 2016.

OLIVEIRA BARUD, H. G. *et al.* Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk fibroin sponge scaffold for tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 128, p. 41–51, 2015.

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, n. January, p. 13–19, 2017.

PANESAR, P. S. *et al.* Production of microbial cellulose : Response surface methodology approach Reducing and total sugars were estimated by the method of. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 930–934, 2012.

PANG, M. *et al.* Application of Bacterial Cellulose in Skin and Bone Tissue Engineering. **EUROPEAN POLYMER JOURNAL**, p. 109365, 2019.

PECORARO, É. *et al.* Bacterial cellulose from *gluconacetobacter xylinus*: Preparation, properties and applications. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**, p. 369–383, 2007.

PENTTILÄ, P. A.; SUGIYAMA, J.; IMAI, T. Effects of reaction conditions on cellulose structures synthesized in vitro by bacterial cellulose synthases. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 656–666, 2016.

PETERS, S. J. *et al.* Nanocellulose and microcellulose fibers for concrete. **Transportation Research Record**, n. 2142, p. 25–28, 2010.

PHAN, H. N. *et al.* **Fabrication of fabric-like Bacterial Cellulose/Collagen membranes by applying textile padding method for wound dressing applications**. [s. l.], Springer Netherlands, 2023. v. 30

PHANTHONG, P. *et al.* Nanocellulose : Extraction and application. **Carbon Resources**

**Conversion**, v. 1, n. 1, p. 32–43, 2018.

PHISALAPHONG, M.; JATUPAIBOON, N. Biosynthesis and characterization of bacteria cellulose-chitosan film. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 482–488, 2008.

PODDAR, M. K.; DIKSHIT, P. K. Recent development in bacterial cellulose production and synthesis of cellulose based conductive polymer nanocomposites. **Nano Select**, v. 2, n. 9, p. 1605–1628, 2021.

POPA, L. *et al.* Bacterial Cellulose—A Remarkable Polymer as a Source for Biomaterials Tailoring. **Materials**, v. 15, n. 3, 2022.

PÖTZINGER, Y. Therapeutic Delivery. v. 8, p. 753–761, 2017.

POYRAZO, E.; BIYIK, H. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter lovaniensis* HBB5. v. 10, n. 27, p. 5346–5354, 2011.

QIAN, H. *et al.* The state-of-the-art application of functional bacterial cellulose-based materials in biomedical fields. **Carbohydrate Polymers**, v. 300, n. July 2022, p. 120252, 2023.

QIAO, N. *et al.* Food Hydrocolloids Soybean oil refinery effluent treatment and its utilization for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. v. 97, n. June, 2019.

RAGHUNATHAN, D. Original Research Article Production of Microbial Cellulose from the New Bacterial Strain Isolated From Temple Wash Waters. v. 2, n. 12, p. 275–290, 2013.

RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M.; KUMBHAR, J. V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. 2015.

RAMASAMY, U. S. *et al.* Effect of soluble and insoluble fibers within the in vitro fermentation of chicory root pulp by human gut bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 28, p. 6794–6802, 2014.

RAMÍREZ, J. A. Á. *et al.* Nanocomposites Based on Poly(lactic acid) and Bacterial Cellulose Acetylated by an  $\alpha$ -Hydroxyacid Catalyzed Route. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 27, n. 3, p. 510–520, 2019.

RAUT, M. P. *et al.* Bacterial Cellulose-Based Blends and Composites: Versatile Biomaterials for Tissue Engineering Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, 2023.

RESHMY, R. *et al.* Bacterial nanocellulose: engineering, production, and applications. **Bioengineered**, v. 12, n. 2, p. 11463–11483, 2021.

RIVAS, B. *et al.* Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, n. 1, p. 93–98, 2004.

RODRÍGUEZ, Ó. *et al.* Effect of indirect cold plasma treatment on cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 457–463, 2017.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, A. N. D. M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria positive control. **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.

SÁ, N. M. S. M. *et al.* From cashew byproducts to biodegradable active materials: Bacterial cellulose-lignin-cellulose nanocrystal nanocomposite films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1337–1345, 2020.

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

SAID, J. M. **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS QUITOSANA , PARA USO NO PROCESSO DE**. [s. l.], 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal (RN), 2009.

SALARI, M. *et al.* Preparation and characterization of cellulose nanocrystals from bacterial cellulose produced in sugar beet molasses and cheese whey media. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 280–288, 2019.

SALVI, D. T. B. DE *et al.* Bacterial cellulose/triethanolamine based ion-conducting membranes. **Cellulose**, v. 21, n. 3, p. 1975–1985, 2014.

SANTANA, R. V. *et al.* Quality parameters and sensorial profile of clarified “Cerrado” cashew juice supplemented with *Sacharomyces boulardii* and different sweeteners. **Lwt**, v. 128, n. March, 2020.

SANTOS, C. P. *et al.* Papel: como se fabrica? **Química e sociedade**, n. 14, 2001.

SANTOS, S. M. *et al.* Characterization of purified bacterial cellulose focused on its use on paper restoration. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 173–181, 2015.

SARKAR, D.; YABUSAKI, M.; HASEBE, Y. Fermentation and metabolic characteristics of *Gluconacetobacter oboediens* for different carbon sources. p. 127–136, 2010.

SCHENZEL, K.; FISCHER, S.; BRENDLER, E. New method for determining the degree of cellulose I crystallinity by means of FT Raman spectroscopy. **Cellulose**, v. 12, n. 3, p. 223–231, 2005.

SEGAL, L. *et al.* An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, n. 10, p. 786–794, 1959.

SHEN, T.; GNANAKARAN, S. The Stability of Cellulose : A Statistical Perspective from a Coarse-Grained Model of Hydrogen-Bond Networks. **Biophysj**, v. 96, n. 8, p. 3032–3040, 2009.

SHEYKHNAZARI, S. *et al.* Bacterial synthesized cellulose nanofibers; Effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1187–1191, 2011.

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.

SHEZAD, O. *et al.* Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simple fed-batch cultivation strategy. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 1, p. 173–180, 2010.

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.

SHI, Z. *et al.* Utilization of bacterial cellulose in food. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 539–545, 2014.

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.

SILVA, A. L. L. E. *et al.* “Cerrado” cashew (*Anacardium othonianum* Rizz.) juice improves metabolic parameters in women: A pilot study. **Journal of Functional Foods**, v. 69, n. December 2019, p. 103950, 2020.

SILVA, D. J.; D’ALMEIDA, J. M. L. O. Nanocristais de celulose Cellulose whiskers. **O papel**, v. 70, p. 34–52, 2009.

SILVA JUNIOR, C. J. G. DA *et al.* Bacterial cellulose biotextiles for the future of sustainable fashion: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, n. 4, p. 2967–2980, 2021.

SILVA NETO, R. M. DA; ABREU, F. A. P. DE; PAIVA, F. F. D. A. Processamento do Pedúnculo de Caju: Cajuína. p. 38, 2009.

SILVIANA, S.; SUSANTI, S. Bacterial Cellulose Based Biocomposite from Guava Fruit Reinforced with Bamboo Microfibrillated Cellulose Through Impregnation Method. 2019.

SINGH, H.; GUPTA, R. Cellulose fiber as bacteria-carrier in mortar : Self-healing quantification using UPV. **Journal of Building Engineering**, v. 28, n. July 2019, p. 101090, 2020.

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.

SIQUEIRA, A. M. DE A.; BRITO, E. S. DE. Aproveitamento do bagaço do caju para alimentação humana e utilização em outras indústrias de alimentos. **Agronegócio caju: práticas e inovações**, n. Figura 1, p. 349–361, 2013.

SIQUEIRA, G.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Cellulosic Bionanocomposites: A Review of Preparation, Properties and Applications. n. i, p. 728–765, 2010.

SIQUEIRA, P. F. *et al.* Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8156–8163, 2008.

SKIBA, E. A. *et al.* Study of the influence of *Medusomyces gisevii* Sa-12 inoculum dosage on bacterial cellulose yield and degree of polymerisation. **Proceedings of Universities Applied Chemistry and Biotechnology**, v. 3, n. 9, p. 420–429, 2019.

SKOC, M. Bacterial nanocellulose in papermaking. v. 0123456789, p. 6477–6488, 2019.

SOKOLNICKI, A. M. *et al.* Permeability of bacterial cellulose membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 272, n. 1–2, p. 15–27, 2006.

SON, J. *et al.* Enhanced Production of Bacterial Cellulose from *Miscanthus* as Sustainable Feedstock through Statistical Optimization of Culture Conditions. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 2, 2022.

SOUZA, S. S. DE *et al.* Nanocellulose biosynthesis by *Komagataeibacter hansenii* in a defined minimal culture medium. **Cellulose**, v. 26, n. 3, p. 1641–1655, 2019.

SOUZA, E. F. *et al.* Production and characterization of *Gluconacetobacter xylinus* bacterial cellulose using cashew apple juice and soybean molasses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 146, p. 285–289, 2020.

SPEROTTO, G. *et al.* A review of culture media for bacterial cellulose production: complex, chemically defined and minimal media modulations. **Cellulose**, v. 28, n. 5, p. 2649–2673, 2021.

STOICA, A. E.; CHIRCOV, C.; GRUMEZESCU, A. M. Hydrogel dressings for the treatment of burn wounds: An up-to-date overview. **Materials**, v. 13, n. 12, p. 1–24, 2020.

STROESCU, M. *et al.* **Antimicrobial Food Pads Containing Bacterial Cellulose and Polysaccharides**. [*s.l.: s.n.*].

TABARSA, T. *et al.* Preparation and characterization of reinforced papers using nano bacterial cellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.

TAHARA, N. *et al.* Degree of polymerization of cellulose from *acetobacter xylinum* BPR2001 decreased by cellulase produced by the strain. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, n. 11, p. 1862–1865, 1997.

TRČEK, J. *et al.* Acetan and acetan-like polysaccharides: Genetics, biosynthesis, structure, and viscoelasticity. **Polymers**, v. 13, n. 5, p. 1–16, 2021.

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.

TYAGI, N.; SURESH, S. Production of cellulose from sugarcane molasses using *Gluconacetobacter intermedius* SNT-1: Optimization & characterization. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 71–80, 2016.

UDHARDT, U.; HESSE, S.; KLEMM, D. Analytical investigations of bacterial cellulose. **Macromolecular Symposia**, v. 223, p. 201–212, 2005.

UL-ISLAM, M. *et al.* Effect of chitosan penetration on physico-chemical and mechanical properties of bacterial cellulose. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 8, p. 1736–1743, 2011.

UL-ISLAM, M. *et al.* Bacterial cellulose composites : Synthetic strategies and multiple applications in bio-medical and electro-conductive fields. p. 1847–1861, 2015.

URBINA, L. *et al.* A review of bacterial cellulose: sustainable production from agricultural waste and applications in various fields. **Cellulose**, v. 28, n. 13, p. 8229–8253, 2021.

USHA RANI, M.; ANU APPAIAH, K. A. *Gluconacetobacter hansenii* UAC09-mediated transformation of polyphenols and pectin of coffee cherry husk extract. **Food Chemistry**, v. 130, n. 2, p. 243–247, 2012.

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.

VELASCO-BEDRÁN, H.; LÓPEZ-ISUNZA, F. The unified metabolism of *Gluconacetobacter entanii* in continuous and batch processes. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 8, p. 1180–1190, 2007.

VOISIN, H. *et al.* Nanocellulose-Based Materials for Water Purification. 2017.

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

WOOD, J. Bioinspiration in Fashion–A Review. **Biomimetics**, v. 4, n. 1, 2019.

WU, M. *et al.* Science of the Total Environment Valorizing kitchen waste through bacterial cellulose production towards a more sustainable biorefinery. **Science of the Total Environment**, v. 695, p. 133898, 2019.

WU, S. C.; LIA, Y. K. Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization.

- Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, n. 3–4, p. 103–108, 2008.
- YAN, H. *et al.* Food Hydrocolloids Synthesis of bacterial cellulose and bacterial cellulose nanocrystals for their applications in the stabilization of olive oil pickering emulsion. **Food hydrocolloids**, v. 72, p. 127–135, 2017.
- YANG, X. Y. *et al.* Bacterial cellulose production from the litchi extract by *Gluconacetobacter xylinus*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 39–43, 2016.
- YANTI, N. A. *et al.* Screening of Acetic Acid Bacteria from Pineapple Waste for Bacterial Cellulose Production using Sago Liquid Waste. **Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education**, v. 9, n. 3, p. 387, 2017.
- YE, J. *et al.* Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* ATCC 23767 using tobacco waste extract as culture medium. v. 274, n. November 2018, p. 518–524, 2019.
- YOSHINO, A. *et al.* Acta Biomaterialia Applicability of bacterial cellulose as an alternative to paper points in endodontic treatment. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 4, p. 6116–6122, 2013.
- YU, B. *et al.* Stability and repeatability improvement of horseradish peroxidase by immobilization on amino-functionalized bacterial cellulose. **Process Biochemistry**, v. 79, n. July 2018, p. 40–48, 2019.
- YUAN, H. *et al.* Enhanced decolourization efficiency of textile dye Reactive Blue 19 in a horizontal rotating reactor using strips of BNC-immobilized laccase : Optimization of conditions and comparison of decolourization efficiency. **Biochemical Engineering Journal**, v. 156, n. August 2019, p. 107501, 2020.
- ZAHAN, K. A. *et al.* Application of bacterial cellulose film as a biodegradable and antimicrobial packaging material. **Materials Today: Proceedings**, v. 31, p. 83–88, 2020.
- ZHANG, L. *et al.* Evaluation of BepanGel Hydrogel Efficacy and Tolerability Using an Abrasive Wound Model in a Within-Person, Single-Center, Randomized, Investigator-Blind Clinical Investigation. **Dermatology and Therapy**, v. 10, n. 5, p. 1075–1088, 2020.
- ZHENG, L. *et al.* Latest Advances on Bacterial Cellulose-Based Antibacterial Materials as Wound Dressings. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. November, p. 1–15, 2020.
- ZHONG, C. *et al.* Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 14, p. 6189–6199, 2013.
- ZHONG, C. Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. December, p. 1–19, 2020.
- ZMEJKOSKI, D. *et al.* Bacterial cellulose-lignin composite hydrogel as a promising agent in chronic wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 494–503, 2018.

ŻYWICKA, A. *et al.* Bacterial cellulose as a support for yeast immobilization – Correlation between carrier properties and process efficiency. **Journal of Biotechnology**, v. 291, n. July 2018, p. 1–6, 2019.

# APÊNDICE A – ARTIGO: SUPERABSORBENT BACTERIAL CELLULOSE FILM PRODUCED FROM INDUSTRIAL RESIDUE OF CASHEW APPLE JUICE PROCESSING

International Journal of Biological Macromolecules 242 (2023) 124405



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijbiomac](http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac)



## Superabsorbent bacterial cellulose film produced from industrial residue of cashew apple juice processing

Darlyson Tavares Guimarães<sup>a</sup>, Matheus de Oliveira Barros<sup>b</sup>, Renata de Araújo e Silva<sup>c</sup>, Sarah Maria Frota Silva<sup>b</sup>, Jessica Silva de Almeida<sup>b</sup>, Morsyleide de Freitas Rosa<sup>d</sup>, Luciana Rocha Barros Gonçalves<sup>b</sup>, Ana Iraídy Santa Brígida<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza, CE CEP 60455-760, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, bloco 709, Fortaleza, CE CEP 60455-760, Brazil

<sup>c</sup> Universidade Estadual do Ceará, Departamento de Ciência e Tecnologia, Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Bairro Itaperi, Fortaleza, CE CEP 60714-903, Brazil

<sup>d</sup> Empresa Agroindústria Tropical, Rua Dna. Sara Mesquita, 2.270, Bairro Planalto do Pici, Fortaleza, CE CEP 60511-110, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords

Water absorption capacity  
Alternative substrate  
Biopolymer  
Exopolysaccharides  
Static culture

### ABSTRACT

The industrial residue of cashew apple juice processing (MRC) was evaluated as an alternative medium for bacterial cellulose (BC) production by *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 and *Komagataeibacter xylinus* ARS B42. The synthetic Hestrin-Schramm medium (MHS) was used as a control for growing and BC production. First, BC production was assessed after 4, 6, 8, 10, and 12 days under static culture. After 12 days of cultivation, *K. xylinus* ATCC 53582 produced the highest BC titer in MHS ( $3.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and MRC ( $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), while significant productivity was attained at 6 days of fermentation. To understand the effect of culture medium and fermentation time on the properties of the obtained films, BC produced at 4, 6, or 8 days were submitted to infrared spectroscopy with Fourier transform, thermogravimetry, mechanical tests, water absorption capacity, scanning electron microscopy, degree of polymerization and X-ray diffraction. The properties of BC synthesized in MRC were identical to those of BC from MHS, according to structural, physical, and thermal studies. MRC, on the other hand, allows the production of BC with a high water absorption capacity when compared to MHS. Despite the lower titer ( $0.88 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) achieved in MRC, the BC from *K. xylinus* ARS B42 presented a high thermal resistance and a remarkable absorption capacity (14664 %), suggesting that it might be used as a superabsorbent biomaterial.

### 1. Introduction

Superabsorbent polymers are fascinating materials in modern macromolecule technology. They are known for their water absorption and retention performance due to their crosslinked network with excellent hydrophilic capacity, capable of absorbing up to 1.5 g of water per gram of material [1,2]. Although BC is a competitive biopolymer for superabsorbent materials, the formation of strong inter and intramolecular hydrogen bonding after drying still limits its absorptive abilities. Some strategies have been applied to improve BC films' swelling properties, by decreasing the density of the network or decreasing the crystallinity, since this affects the BC's liquid absorption characteristic, which depends primarily on fibril arrangement, surface area, and porosity. Overall, the more space available between the BC fibrils, the more liquid penetrates and adsorbs into the material [3,4].

Additionally, it is well-known that changes in BC fermentation parameters, including strain, culture growth conditions, as well as medium components, and cultivation time, may determine structural features, namely crystallinity and average degree of polymerization, which can affect the physical properties of the biopolymer [5,6].

In recent years, various carbon sources, including by-products from agroindustry, were evaluated to maximize BC production and reduce costs [7]. The synthetic medium HS (Hestrin-Schramm), most used for the biosynthesis of the biopolymer, accounts for up to 50–65 % of the total cost of the process [8]. In fact, BC can be efficiently produced in alternative culture media; however, it is worth noting that the carbon source may also determine structural features and properties changes related to the differences in microstructure, namely, crystallinity and average degree of polymerization [9]. Our Group has been working on obtaining BC from different alternative mediums, and we have recently

\* Corresponding author.

E-mail address: [ana.iraiddy@embrapa.br](mailto:ana.iraiddy@embrapa.br) (A.L.S. Brígida).

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124405>

Received 30 January 2023; Received in revised form 31 March 2023; Accepted 6 April 2023

Available online 25 April 2023

0141-8130/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.