

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

ANABEL ALEXANDRA RODRIGUEZ ANDACHI

**NOVA ABORDAGEM PARA PRODUÇÃO DE NANOCELULOSE BACTERIANA A
PARTIR DE FRUTAS NATIVAS BRASILEIRAS**

DOIS VIZINHOS

2023

ANABEL ALEXANDRA RODRIGUEZ ANDACHI

**NOVA ABORDAGEM PARA PRODUÇÃO DE NANOCELULOSE BACTERIANA A
PARTIR DE FRUTAS NATIVAS BRASILEIRAS**

New Approach to Producing Bacterial Nanocellulose from Native Brazilian Fruit Pulp

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Prof^a Dr^a Samara Silva de Souza.
Coorientadora: Prof^a Dr^a Paula Fernandes Montanher.
Coorientador: Prof. Dr. Américo Wagner Júnior

DOIS VIZINHOS

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



ANABEL ALEXANDRA RODRIGUEZ ANDACHI

**NOVA ABORDAGEM PARA PRODUÇÃO DE NANOCELULOSE BACTERIANA A PARTIR DE FRUTAS
NATIVAS BRASILEIRAS**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Biotecnologia.

Data de aprovação: 04 de setembro de 2023

Dra. Samara Silva De Souza, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Luciano Lucchetta, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Mario Antonio Alves Da Cunha, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos, Doutorado - Universidade Federal da Integração Latino-Americana (Unila)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 04/09/2023.

*Dedico este trabajo a mi familia, que han sido mi fuente de
inspiración y motivación, y que a pesar de la distancia su
amor a traspasado fronteras.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força para poder enfrentar os desafios desta etapa da minha vida e resiliência para não desistir.

Agradeço aos meus pais Milton Rodríguez e Rosa Andachi, que sempre se esforçaram pela educação de qualidade de seus filhos. Obrigada mãe e pai pela educação, valores e princípios ensinados desde casa, e pelas palavras certas nos momentos certos.

Agradeço aos meus irmãos, Paola, Evelin e Maykel, ao meu cunhado Daniel e sobrinha Yarita, pelo incentivo e carinho, que tem sido importante para esta etapa.

Agradeço a Nathan Candatten sua família que tem me acolhido como um membro mais da família, foi muito fundamental o apoio que recebi nos últimos meses tortuosos.

Agradeço aos meus amigos Eric e Elizabeth, pelos bons momentos, incentivo e apoio dos momentos ruins e bons.

Agradeço à minha orientadora Prof. Dra. Samara Silva de Souza e aos coorientadores Prof. Dra. Paula Montanher e Prof. Dr. Américo Wagner pela sabedoria, ensinamentos, correções, ajuda, conselhos e disponibilidade. Vocês são um claro exemplo de comprometimento com a pesquisa.

Agradeço ao NanoBioCell - Grupo de Pesquisa em Nanocompósitos Bioativos e Multifuncionais, pela parceria e troca de experiências no desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Alimentos (LABIA) UTFPR-DV pelo suporte analítico durante a realização de antioxidante. Ao Centro de Caracterização Multiusuário em Pesquisa e Desenvolvimento de Materiais (C2MMa) UTFPR campus Ponta Grossa pelas análises de MEV. Ao Laboratório de Análises (LabAna) – UTFPR Campus Francisco Beltrão pela análise da resistência a tração. A Central de Análise – UTFPR Campus Pato Branco pela análise de FTIR.

Ao Programa Bolsas Brasil – PAEC OEA-GCUB, pelo Acordo de Cooperação entre a Organização dos Estados Americanos (OEA) e o Grupo de Cooperação Internacional de Universidades Brasileiras (GCUB). E ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBIOTEC, pela cooperação.

RESUMO

As propriedades superiores da nanocelulose bacteriana (NCB) frente à celulose vegetal como a alta pureza, alto grau de cristalinidade, nanoestrutura porosa, elevada capacidade de retenção de água, excelentes forças mecânicas, biodegradabilidade e biocompatibilidade, têm despertado o interesse da sua aplicação na área médica, farmacêutica, alimentos, cosméticos, ambiental, eletrônicos, têxtil, entre outras. Entretanto, o alto custo de produção tem limitado a sua produção em larga escala, incentivando o desenvolvimento de meios de cultivo alternativos a partir da variação de fontes de carbono e nitrogênio. As frutas da família Myrtaceae como a pitanga (*Eugenia uniflora*), araçá (*Psidium cattleianum*) e jabuticaba (*Plinia* sp.) possuem propriedades químicas interessantes como meio de cultura, pela fonte de carbono e compostos bioativos. Até o estudo em questão, não foi relatado na literatura uma metodologia de produção de NCB a partir de polpa de frutas nativas brasileiras. Nesse sentido, esse estudo tem como objetivo desenvolver um processo de produção de nanocelulose bacteriana (NCB) em meio de cultivo a partir de polpa de frutas nativas brasileiras para obtenção de NCB com um custo inferior e valor agregado com a bactéria *Komagataeibacter xylinus* ATCC® 53524™. A bactéria foi cultivada no meio líquido tradicional Hestrin & Schramm (HS) em cultura estática à 30°C por 7 dias. Seis condições de fermentação (meio tradicional HS, meio HS com polpa de fruta, meios de polpa pura - jabuticaba, pitanga ou araçá e modificações de HS com polpa de fruta) foram testadas durante 15 dias para avaliar a produção de NCB. Além disso, realizou-se a caracterização dos meios de polpa de cada fruta, a partir do carbono e nitrogênio total, pH, compostos fenólicos, e capacidade antioxidante pelos ensaios de ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) e FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Também foi avaliada as propriedades físico-química dos biomateriais de NCB produzidos nos meios onde mostraram maior rendimento, por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), capacidade de retenção de água, porosidade, resistência à tração, elasticidade e capacidade antioxidante. As condições com o meio de polpa pura de jabuticaba ou pitanga, sem a adição de outro componente no meio, obteve-se rendimentos consideráveis comparadas as membranas de NCB produzidas em meio HS. Assim as membranas a partir do meio de Jabuticaba (NCB-J) apresentaram um rendimento de 4,09 g/L, pitanga (NCB-P) com rendimento de 4,33 g/L e HS (NCB-H) com rendimento de 5,96 g/L. Além disso, as membranas de NCB-J e NCB-P mantiveram as propriedades características das membranas de NCB, como alta capacidade de retenção de água em torno de 98% e alta porosidade 73%, resistência mecânica, e a composição química estrutural também foram mantidas. A produção de NCB nas seis condições foi obtida, mas os resultados demonstraram o potencial dos meios de cultura a partir de polpa pura de jabuticaba e pitanga. Assim, esse estudo aponta uma abordagem inovadora de produção de NCB a partir de frutas nativas brasileiras, sem a adição de outros componentes complexos aos meios garantindo um alto rendimento e baixo custo.

Palavras-chave: Celulose bacteriana; meios de cultura; Myrtaceae; *Komagataeibacter xylinus*.

ABSTRACT

The superior properties of bacterial nanocellulose (BCN) compared to plant cellulose, such as its high purity, high degree of crystallinity, porous nanostructure, high water retention capacity, excellent mechanical strength, biodegradability and biocompatibility, have aroused interest in its application in the medical, pharmaceutical, food, cosmetics, environmental, electronics and textile fields, among others. However, the high cost of production has limited their large-scale production, encouraging the development of alternative cultivation media based on varying carbon and nitrogen sources. Fruits from the Myrtaceae family such as pitanga (*Eugenia uniflora*), araçá (*Psidium cattleianum*) and jabuticaba (*Plinia* sp.) have interesting chemical properties as culture media, due to their source of carbon and bioactive compounds. Until this study, no methodology for producing NCB from the pulp of native Brazilian fruits had been reported in the literature. In this sense, this study aims to develop a process for producing bacterial nanocellulose (NCB) in a culture medium from Brazilian native fruit pulp to obtain NCB at a lower cost and with added value using the bacterium *Komagataeibacter xylinus* ATCC® 53524™. The bacterium was grown in traditional Hestrin & Schramm (HS) liquid medium in static culture at 30°C for 7 days. Six fermentation conditions (traditional HS medium, HS medium with fruit pulp, pure pulp media - jabuticaba, pitanga or araçá and modifications of HS with fruit pulp) were tested for 15 days to evaluate NCB production. In addition, the pulp media of each fruit was characterized based on total carbon and nitrogen, pH, phenolic compounds and antioxidant capacity using the ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) assays. The physicochemical properties of the NCB biomaterials produced in the media with the highest yields were also evaluated by Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), water retention capacity, porosity, tensile strength, elasticity and antioxidant capacity. The conditions with the pure jabuticaba or pitanga pulp medium, without the addition of another component in the medium, obtained considerable yields compared to the NCB membranes produced in HS medium. Thus, the membranes from the Jabuticaba medium (NCB-J) showed a yield of 4.09 g/L, pitanga (NCB-P) with a yield of 4.33 g/L and HS (NCB-H) with a yield of 5.96 g/L. In addition, the NCB-J and NCB-P membranes maintained the characteristic properties of NCB membranes, such as high water retention capacity of around 98% and high porosity of 73%, mechanical strength, and the structural chemical composition were also maintained. NCB production was achieved under all six conditions, but the results demonstrated the potential of culture media from pure jabuticaba and pitanga pulp. Thus, this study points to an innovative approach to producing NCB from native Brazilian fruits, without adding other complex components to the media, guaranteeing a high yield and low cost.

Keywords: Bacterial cellulose; culture medium; Myrtaceae; *Komagataeibacter xylinus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- a) Estrutura química da molécula de celulose, as linhas pontilhadas esquematizam as possíveis ligações de hidrogênio b) Unidade de celobiose	16
Figura 2 - Descrição das propriedades funcionais da NCB.....	18
Figura 3 - Desconstrução da matriz de celulose, hemicelulose e lignina por pré-tratamento	19
Figura 4 - Sínteses da NCB a partir de glicose.....	24
Figura 5 - Representação esquemática da síntese e configuração de nanofita de membrana de NCB	25
Figura 6 - Representação esquemática das estratégias de modificação do biomaterial de NCB A) In situ B) Ex situ.....	26
Figura 7 - Aplicação na NCB na biomedicina, alimentos, têxtil, eletrônicos cosméticos e engenharia de tecido.....	20
Figura 8 - Localização do pomar da UTFPR-DV.....	38
Figura 9 - Frutas da família Myrtaceae coletadas do pomar da UTFPR-DV.....	38
Figura 10 - Representação esquemática do processo e armazenamento do meio de cultivo a partir de polpa de frutas.....	39
Figura 11 - Representação esquemática da preparação dos meios de cultura	40
Figura 12 - Representação esquemática da determinação de compostos fenólicos.....	42
Figura 13 - Representação esquemática da determinação da atividade antioxidante dos meios de fruta e HS por FRAP	43
Figura 14 - Representação esquemática atividade antioxidante dos meios de polpa de fruta e HS redução do cátion radical livre ABTS.....	44
Figura 15 - Representação esquemática da reativação e preparação de inóculo	44
Figura 16 - Representação esquemática da produção de membranas	45
Figura 17 - Representação esquemática da purificação das membranas de NCB	46
Figura 18 - Representação esquemática da determinação de antioxidantes das membranas por DPPH	49
Figura 19 - Representação esquemática da determinação de antioxidantes das membranas por FRAP	50
Figura 20 - Vista frontal e lateral das membranas de NCB produzidos nas seis condições	52
Figura 21 - Vista frontal e lateral das membranas de NCB-H (condição 1).....	53
Figura 22 - Membrana de NCB liofilizada.....	56
Figura 23 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de ampliação de 10.000x em membranas de NCB-H, NCB-J, NCB-P e NCB-A.....	62
Gráfico 1 – Capacidade de retenção de água de membranas de NCB produzidas em meio HS (NCB-H), jaboticaba (NCB-J), pitanga (NCB-P) e araçá (NCB-A).....	60
Gráfico 2 - Resistência mecânica de membranas de a) NCB-H b) NCB-J c) NCB-P	63
Gráfico 3 - Atribuição das bandas dos espectros de FTIR de membranas de NCB-H, NCB-J, NCB-P, NCB-A.....	64
Quadro 1 - Meios de cultura complexos modificados utilizando subprodutos e resíduos agrícolas por bactérias produtoras de NCB.....	30
Quadro 2 - Meios de cultura a partir de resíduos e polpas de frutas pré-tratadas para produção de NCB.....	32

Quadro 3 - Levantamento de patentes sobre produção de NCB a partir de frutas encontradas nas bases de patentes Lens.org e Google patentes	36
Quadro 4 - Meio HS, HS modificado e meio de polpa de fruta.....	40
Quadro 5 - Atribuição das bandas dos espectros FTIR de membranas de NCB	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise química em g/100g* das frutas jabuticaba, pitanga e araçá	34
Tabela 2 - Volumes do meio HS, HS modificado, meio de fruta e inóculo para síntese das membranas	45
Tabela 3 - Peso úmido e espessura da membrana de NCB produzidas em.....	52
Tabela 4 - Caracterização química dos meios.....	54
Tabela 5 - Quantidade de compostos fenólicos dos meios jabuticaba, pitanga, araçá e HS	54
Tabela 6 - Estimativa de custo de produção e rendimento em peso úmido de membranas de NCB/ L de meios HS, HS modificado e meio polpa pura.....	58
Tabela 7 - Capacidade antioxidante de membranas de NCB liofilizadas	65

LISTA DE ABREVIACOES

ABTS	[2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]
CA	Central de Análise
CMC	Carboximetilcelulose
C2Mma	Centro de Caracterizao Multiusuário em Pesquisa e Desenvolvimento de Materiais
CS	Celulose Sintase
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
FC	Folin-Ciocalteu
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FR	Radicais livres
FRAP	Poder antioxidante redutor férrico
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
HS	Hestrin & Schramm
LABIA	Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Alimentos
LAMAQ	Laboratório Multiusuário de Análise Químicas
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NCB	Nanocelulose bacteriana
PVA	Poli vinil lcool
QUENCHER	QUick, Easy, New, CHEap, and Reproducible
ROS	espécies reativas de oxigênio
TOC	Carbono Orgânico Total
UDPG	<i>Uridine diphosphate glucose</i>
UTFPR-DV	Universidade Tecnológica Federal do Paraná – <i>Campus Dois Vizinhos</i>
UTFRP-FB	Universidade Tecnológica Federal do Paraná – <i>Campus Francisco Beltrão</i>
UTPFR-PB	Universidade Tecnológica Federal do Paraná – <i>Campus Pato Branco</i>
UTFPR-PG	Universidade Tecnológica Federal do Paraná – <i>Campus Ponta Grossa</i>
WHC	Capacidade de reteno de gua

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral.....	15
2.2	Objetivos específicos.....	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	Nanocelulose Bacteriana	16
3.1.1	Características e propriedades da NCB	18
3.1.2	Aplicações da NCB.....	20
3.1.3	Biossínteses da NCB.....	23
3.1.4	Condições de cultivo.....	26
3.1.5	Meio de cultura para produção de NCB	28
3.2	Resíduos ou subprodutos para produção de NCB.....	29
3.2.1	Resíduos de frutas para produção de NCB	31
3.3	Fruta da família Myrtaceae como meio de cultivo para produção de NCB	33
3.4	Patentes de produção NCB com meio de cultivo a partir de frutas.....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	Coleta de frutas nativas brasileiras do pomar da UTFPR-DV.....	38
4.2	Processamento e armazenamento das frutas	39
4.3	Produção dos meios de cultura	39
4.4	Caracterização dos meios de cultura	40
4.4.1	Determinação de Carbono Orgânico Total e Nitrogênio Total	40
4.4.2	Determinação do pH dos meios de cultivo	41
4.4.3	Determinação de antioxidantes dos meios de cultivo.....	41
<u>4.4.3.1</u>	<u>Determinação dos compostos fenólicos totais</u>	<u>41</u>
<u>4.4.3.2</u>	<u>Determinação da atividade antioxidante por redução do ferro (FRAP)</u>	<u>42</u>
<u>4.4.3.3</u>	<u>Determinação da atividade antioxidante por redução do cátion radical livre ABTS</u>	<u>43</u>
4.5	Cultivo de microorganismos e preparação do inóculo	44
4.6	Produção das membranas	45
4.7	Purificação e secagem das membranas.....	46
4.8	Rendimento e estimativa de custo de produção de membranas de NCB ...	46
4.9	Caracterização físico-química da NCB.....	46
4.9.1	Capacidade de retenção de água (<i>Water Holding Capacity - WHC</i>).....	47

4.9.2	Porosidade das membranas de NCB.....	47
4.9.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	47
4.9.4	Propriedades mecânicas – testes tensão-deformação e Modulo de Young	47
4.9.5	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	48
4.10	Análise dos antioxidantes nas membranas	48
4.10.1	Análise de atividade antioxidante pelo método QUENCHER	48
4.10.1.1	<u>Determinação da atividade antioxidante das membranas de NCB por captura do radical livre DPPH.....</u>	<u>48</u>
4.10.1.2	<u>Determinação da atividade antioxidante dos biomateriais por captura do radical livre FRAP.....</u>	<u>49</u>
4.11	Tratamento dos dados	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1	Coleta das frutas nativas	51
5.2	Produção de membranas de NCB em meio HS, HS modificado e polpa de frutas	51
5.3	Caracterização química e capacidade antioxidante dos meios.....	53
5.4	Rendimento e estimativa de custo	56
5.5	Caracterização das membranas de NCB.....	60
5.5.1	Capacidade de retenção de água e porosidade.....	60
5.5.2	Morfologia da superfície superior e inferior de NCB-H, NCB-J, NCB-P e NCB-A	61
5.5.2	Propriedades mecânicas.....	62
5.5.3	Análise qualitativa dos grupos funcionais em membranas de NCB.....	64
5.6	Capacidade antioxidante de membranas de NCB	65
6	CONCLUSÃO.....	67
7	REFERÊNCIAS.....	68
	APÊNDICE A- Curva de calibração de atividade antioxidante para meio	85
	APÊNDICE B - Curva de calibração de atividade antioxidante para membranas de NCB.....	87

1 INTRODUÇÃO

A celulose ($C_6H_{10}O_5$) é o polímero mais abundante na Terra, considerado um produto de alta relevância no mercado mundial (GUPTA *et al.*, 2019). Esse polímero pode ser encontrado na parede celular de plantas, algas, fungos e bactérias (GUPTA *et al.*, 2019; RANGASWAMY; VANITHA; HUNGUND, 2015). A celulose vegetal é a mais utilizada como matéria prima em diferentes indústrias, entretanto apesar de ser renovável, apresenta desvantagens, pela geração de efluentes prejudiciais ao meio ambiente, a partir de processos químicos de purificação (URAKI; KODA, 2015).

Diante desse cenário, a nanocelulose bacteriana (NCB) produzida por bactérias, se apresenta como alternativa promissora. A NCB é mais comumente sintetizada pela espécie *Komagataeibacter xylinus* devido sua maior capacidade de produção de NCB a partir de diversas fontes de carbono e nitrogênio (GARCÍA-SÁNCHEZ *et al.*, 2020; KUROSUMI *et al.*, 2009; SRIKANDACE *et al.*, 2022). As propriedades físico-químicas da NCB são superiores à celulose vegetal, tais como alta pureza (PARK; JUNG; KHAN, 2009), alto grau de cristalinidade (SAMUEL; ADEFUSIKA, 2019), alta polimerização (OKAJIMA; MATSUDA; KAMIDE, 1991), força de tensão (FENG *et al.*, 2015), elevada capacidade de retenção de água (REBELO *et al.*, 2018), biodegradabilidade e biocompatibilidade (TORRES; COMMEAUX; TRONCOSO, 2012). As suas características despertaram o interesse de várias indústrias, como a biomedicina (WAHID *et al.*, 2021a), engenharia de tecidos (BOUHLOULI *et al.*, 2021), alimentos (JAMSHEERA; PRADEEP, 2021), têxtil (PROVIN *et al.*, 2021b), cosméticos (MARTINS *et al.*, 2021; ULLAH; SANTOS; KHAN, 2016), eletrônicos (PENG *et al.*, 2016), papel (CAMPANO *et al.*, 2018) entre outros.

A NCB apresenta inúmeras vantagens, mas o seu elevado custo do meio de fermentação que corresponde a quase 30% do custo total de produção, tem limitado as suas aplicações industriais (ABOL-FOTOUH *et al.*, 2020; JOZALA *et al.*, 2016). O meio padrão utilizado para produção de NCB é o meio complexo Hestrin Schramm (HS), composto por glicose, extrato de levedura, peptona, fosfato dissódico e ácido cítrico, (HESTRIN SCHRAMM, 1954). Contudo, os componentes como o extrato de levedura e peptona elevam o custo do meio (MOHAMMADKAZEMI; AZIN; ASHORI, 2015). Nesse sentido, muitos estudos têm focado em fontes alternativas de meio de cultura para produção de NCB, com o intuito de reduzir o custo de produção e/ou aumentar o rendimento da nanocelulose, e/ou reaproveitar resíduos agrícolas e agroindustriais (SPEROTTO *et al.*, 2021). Diferentes fontes nutritivas já foram avaliadas para a síntese de NCB, tais como: casca de café (RANI; APPAIAH, 2013), melão

de cana de açúcar (TYAGI; SURESH, 2016), extratos de água quente de madeira (KIZILTAS; KIZILTAS; GARDNER, 2015), suco de fruta (KUROSUMI, 2009), hidrolisado ácido de palha de arroz, hidrolisado ácido de espiga de milho, suco de tomate, melação de cana e polpa de laranja (KUMAR *et al.*, 2019), efluentes da destilaria (JAHAN; KUMAR; SAXENA, 2018), resíduos de tabaco (YE *et al.*, 2019), palha de trigo (CHEN *et al.*, 2013), resíduos agro resíduos de abacaxi (ALGAR *et al.*, 2015), resíduos têxteis à base de algodão (HONG *et al.*, 2012), resíduos de levedura de cerveja (LIN *et al.*, 2014), casca de arroz (GOELZER *et al.*, 2009) entre outros. As alterações do meio de cultura implicam em alterações das propriedades físico-químicas da NCB, custo, rendimento e aplicações, com isso ainda é uma abordagem que precisa ser explorada.

Uma alternativa inovadora na produção de NCB são os meios de cultura a partir de frutas, pois o seu alto conteúdo de açúcares e compostos bioativos podem ser aproveitados para a síntese da NCB (CALDERÓN-TOLEDO *et al.*, 2021; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). No Brasil temos as frutas da família Myrtaceae que apresentam grande potencial econômico, sendo muitas de suas espécies utilizadas na alimentação, como a pitanga (*Eugenia uniflora*), araçá (*Psidium cattleianum*) e jaboticaba (*Plinia* sp.) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Essas frutas apresentam inúmeros compostos bioativos, alto potencial antioxidante, aproveitável fonte de carbono, porém, a sua perecibilidade limita o seu uso comercial *in natura*.

Nesse sentido, uma abordagem inovadora foi proposta neste estudo, de avaliar potenciais modificações do meio de cultivo a base de polpa de frutas da família Myrtaceae para síntese de NCB com um novo valor agregado. Além de valorizar as frutas nativas, a produção de biomateriais de NCB com o potencial das frutas incorporado, pode ser uma alternativa atrativa no desenvolvimento de novos produtos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir nanocelulose bacteriana (NCB) com baixo custo de produção e valor agregado a partir de um novo meio de cultivo com polpa de frutas nativas brasileiras.

2.2 Objetivos específicos

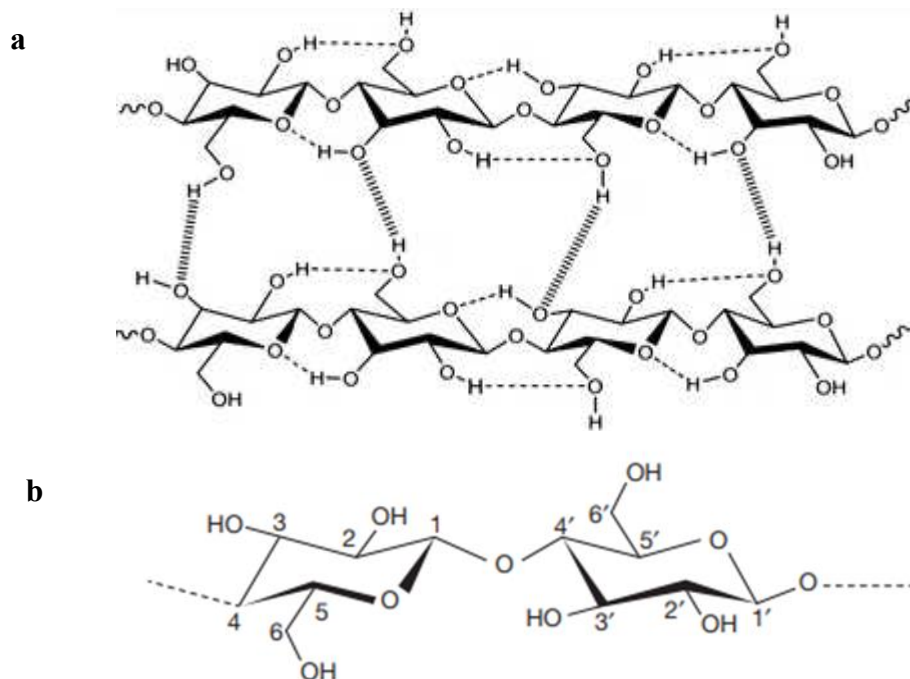
- Testar variações do meio Hestrin-Schramm (HS) a partir das polpas de frutas de pitanga (*Eugenia uniflora*), araçá (*Psidium cattleianum*) e jaboticaba (*Plinia* sp);
- Caracterizar os meios de polpa de frutas e HS quanto ao carbono e nitrogênio total, pH e antioxidantes;
- Produzir e caracterizar as membranas de NCB a partir do meio tradicional HS, HS modificado com meios de polpa jaboticaba, pitanga e araçá e polpa pura de frutas, para avaliar a influência do meio na produção;
- Avaliar o custo de produção de meio HS, HS modificado e meio de polpa pura de jaboticaba, pitanga e araçá;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Nanocelulose Bacteriana

A celulose é um homopolímero linear, composto por monômeros de glicose unidos por ligações β -1,4 glicosídicas (FONTANA *et al.*, 2017). As cadeias lineares, possuem elevado número de grupos hidroxila, que permitem ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares desses grupos, formando assim, fibras de celulose (Figura 1.a) (FONTANA *et al.*, 2017; GUPTA *et al.*, 2019). A Figura 1.b mostra a estrutura química de uma unidade de celobiose, que é a junção de dois monômeros de glicose. A celulose pode se encontrar inserida na parede celular de plantas verdes, algumas algas, fungos, e pode ser produzida por algumas bactérias acéticas (GULLO *et al.*, 2018; GUPTA *et al.*, 2019). A celulose produzida por bactérias também é chamada de nanocelulose bacteriana (NCB), por apresentar fibras de caráter nanométrico que se diferencia das fibras da celulose vegetal que são micrométricas (DONINI *et al.*, 2010).

Figura 1- a) Estrutura química da molécula de celulose, as linhas pontilhadas esquematizam as possíveis ligações de hidrogênio b) Unidade de celobiose



Fonte: Adaptado de Festucci-Buselli; Otoni; Josh (2007); *Biomaterials et al.*, (2019)

A produção de NCB foi descrita pela primeira vez por Brown, em 1886. Brown observou a formação de uma película gelatinosa translúcida, na superfície do caldo de fermentação do vinagre. Ao analisar a película descobriu que era composta de celulose. Os testes de cultivos junto com a observação microscópica, revelou a bactéria produtora de

celulose, que a designou como *Bacterium xylinum* (BROWN, 1886). Em 1954, depois de intensos estudos experimentais, Hestrin & Schramm conseguiram determinar as condições e parâmetros de cultivo, que os levou a formular um meio de cultura complexo utilizado atualmente, como Hestrin Schramm (HS) (HESTRIN; SCHRAMM, 1954).

A NCB na microbiologia é comumente chamada de biofilme, isso porque o crescimento microbiano ocorre na superfície. O biofilme se forma pela organização de células bacterianas que se aderem a uma superfície e são envoltas por uma matriz de polímeros, que são secretados pelas mesmas bactérias. A formação de biofilme pelas bactérias, tem sido visto como mecanismo de defesa, pois gera resistência a forças físicas, retarda a penetração de moléculas tóxicas e permite que as células permaneçam em um nicho favorável (MADIGAN *et al.*, 2016).

A NCB também é produzida por várias espécies bacterianas, nos gêneros: *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Sarcina* (DEINEMA; ZEVENHUIZEN, 1971; RAGHAVENDRAN; ASARE; ROY, 2020). As bactérias *Agrobacterium tumefaciens*, produzem fibrilas de celulose com a função de se ligar e depois infectar células vegetais. Esse mesmo mecanismo também tem sido observado em bactérias do gênero *Rhizobium* (LAUS; BRUSSEL; KIJNE, 2005; MATTHYSSE, 1983). As bactérias *Sarcina ventriculi* produzem também celulose com o objetivo de unir fortemente as células em grandes pacotes (CANALE-PAROLA; WOLFE, 1964).

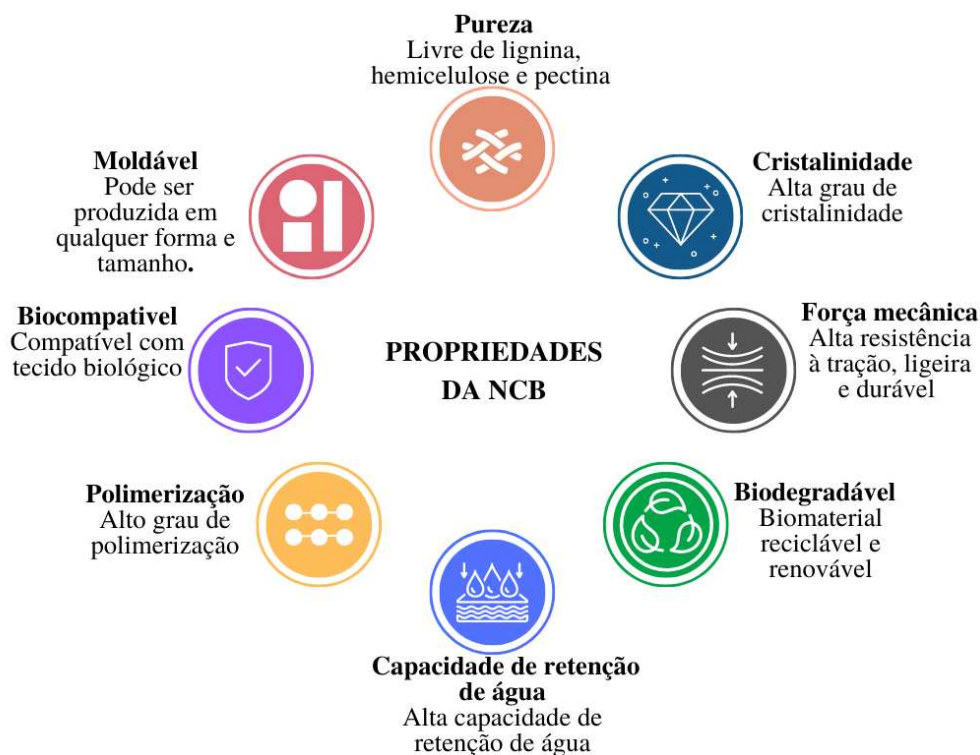
A bactéria *K. xylinus* é uma das espécies mais comumente estudadas na produção de NCB, por apresentar maior capacidade de produção a partir de diversas fontes de carbono e nitrogênio em meio de cultivo líquido (GARCÍA-SÁNCHEZ *et al.*, 2020; KUROSUMI *et al.*, 2009; SRIKANDACE *et al.*, 2022). Esta bactéria ácido acética inicialmente chamada por Brown como *Bacterium xylinum*, foi nomeada para *Acetobacter xylinum*, depois *Gluconacetobacter xylinus* e atualmente é conhecida como *Komagataeibacter xylinus* (FONTANA *et al.*, 2017). Segundo a base filogenética, esta bactéria é classificada no gênero *Komagataeibacter*, fazendo parte de um dos 29 gêneros da família Acetobacteraceae, ordem *Rhodospirillales*, classe de α -*Proteobactérias* e Filo *Proteobactérias* (EUZÉBY, 1997).

Segundo as características morfológicas, *K. xylinus* é um bacilo gram-negativo que pode medir $0,5-0,8 \times 1,0-3,0 \mu\text{m}$. Assim também, de acordo com a fisiologia, se caracteriza por ser um microrganismo não patogênico, não móvel e não fotossintético; aeróbio estrito que realiza oxidação incompleta de diversos açúcares e álcoois (YAMADA *et al.*, 2012). Este microrganismo pode ser encontrado em frutos e vegetais em processo de decomposição (ALEMAM, 2020; RANGASWAMY; VANITHA; HUNGUND, 2015).

3.1.1 Características e propriedades da NCB

A NCB possui características e propriedades físico-químicas únicas, como alta pureza, alta cristalinidade, alta capacidade de retenção de água, alta polimerização, biodegradável, biocompatível, moldável, entre outras. Diante dessas propriedades, a NCB tem-se tornado de interesse em diferentes áreas (PARTE *et al.*, 2020). A Figura 2 apresenta um resumo sobre a descrição das propriedades da NCB.

Figura 2 - Descrição das propriedades funcionais da NCB

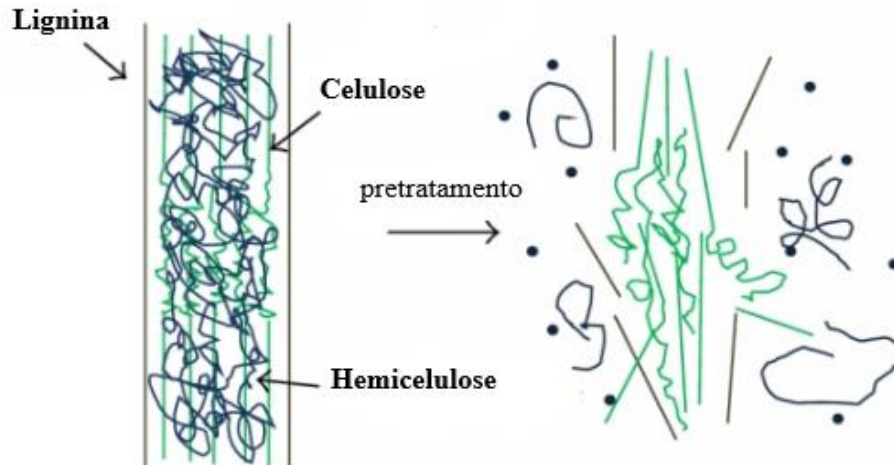


Fonte: Park; Jung; Khan (2009)

A pureza da NCB é uma das propriedades mais notáveis, já que as bactérias produzem celulose pura, sem lignina e hemicelulose. Sendo assim, a purificação da NCB é simples, consistindo na retirada das células bacterianas que se encontram aderidas ao biomaterial entre outras impurezas, através de uma purificação alcalina suave, seguida de uma autoclavagem (CHAWLA *et al.*, 2009). Por outro lado, a celulose vegetal necessita de um tratamento químico ou físico para obtenção da celulose pura que se encontra entrelaçada com as moléculas de lignina e hemicelulose (Figura 3). Esse processo acaba gerando resíduos que são prejudiciais ao meio ambiente (PANDEY; KIM, 2011; TORGET; KIM; LEE, 2000; ZENG; HIMMEL;

DING, 2017). A NCB também apresenta alto grau de polimerização (agrupamento de monômeros de glicose), podendo chegar a formar cadeias entre 16.000 a 20.000 monômeros de glicose, dependendo do tipo de cepa bacteriana, e das condições de cultivo e aditivos. Já a celulose vegetal forma cadeias em torno de 13.000 a 14.000 monômeros de glicose (EL-SAIED; BASTA; GOBRAN, 2004; WATANABE *et al.*, 1998).

Figura 3 - Desconstrução da matriz de celulose, hemicelulose e lignina por pré-tratamento



Fonte: Adaptado de Oyegoke; Tongshuwar; Oguche (2022)

A cristalinidade (regiões com alto ordem de miofibrilas) da NCB, é outra das características atraentes, já que possui entre 84-89% de cristalinidade (CZAJA; ROMANOVICZ; BROWN, 2004), sendo superior a celulose vegetal com aproximadamente 40-60% de grau de cristalinidade (KAMARUDDIN; DIRPAN; BASTIAN, 2021). De acordo com a cristalinidade, existem vários tipos de celulose. Na celulose nativa, existem dois tipos: celulose I (cadeias de glucano paralelas umas com as outras) e celulose II (cadeias de glucano antiparalelas) (DIOTALLEVI, 2007). A celulose I é a mais comumente produzida pelos organismos, e dentro desta existem dois polimorfos: celulose I α (tricíclico, encontrado em algas e bactérias) e celulose I β (monocíclico, encontrado na parede celular de plantas) (SAMUEL; ADEFUSIKA, 2019). Existe também a celulose III, que é produzida por meio de tratamento químico a partir da celulose I ou II. Já a celulose IV, é obtida através de procedimento térmico. Finalmente, a celulose tipo II também pode ser obtida por tratamentos físico-químicos, quando a celulose I é tratada com NaOH (NAOMI; IDRUS; FAUZI, 2020). A cristalinidade é considerada um dos fatores mais importantes ao analisar um biomaterial, pois tem influência direta nas propriedades mecânicas. Com isso, as propriedades mecânicas como o módulo de Young e a resistência à tração podem variar de acordo com a cepa e meio de cultura (DUARTE *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2022).

A NCB é insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, uma vez que os grupos hidroxilas geram ligações intramoleculares e intermoleculares responsáveis pela estabilidade e rigidez das cadeias (WATANABE *et al.*, 1998). Apesar de ser insolúvel a NCB é altamente hidrofílica devido a grande quantidade de hidroxilas e sua porosidade, caracterizando esse biomaterial com alta capacidade de absorção de água que pode chegar até aproximadamente 99% (PARK; JUNG; KHAN, 2009; REBELO *et al.*, 2018). A biocompatibilidade da NCB é proporcional a sua capacidade para absorver água, visto que auxilia no crescimento e proliferação celular em tecidos biológicos (NAOMI; IDRUS; FAUZI, 2020).

3.1.2 Aplicações da NCB

As propriedades físico-químicas únicas da NCB, tem incentivado a sua ampla aplicação e estudo em diferentes áreas como a biomedicina, alimentos, cosméticos, eletrônicos, têxtil, engenharia de tecidos, papel, ambiental, entre outras (Figura 7). Atualmente, várias dessas indústrias já têm produtos no mercado utilizando NCB como matéria-prima.

Figura 4 - Aplicação na NCB na biomedicina, alimentos, têxtil, eletrônicos cosméticos e engenharia de tecido



Fonte: Autoria própria (2022)

A NCB é um potencial candidato para aplicação no campo biomédico, devido a sua biocompatibilidade, resistência mecânica, alta capacidade de absorção de água, cristalinidade e versatilidade de produção (WAHID *et al.*, 2021b). Com base nessas características, esse biomaterial funcionalizado junto com outras moléculas, proporciona grande potencial como curativo para feridas (WAHID *et al.*, 2021a), queimaduras (SAJJAD *et al.*, 2020); lesões por pressão (HODEL *et al.*, 2022), feridas diabéticas (SILVA *et al.*, 2021) entre outras. No Brasil já existem produtos no mercado à base de NCB, como a Membracel® da empresa Vuelopharma, que consiste em um curativo que pode substituir temporariamente a pele (VUELOPHARMA, 2022). A NCB também é utilizada como um mecanismo de liberação controlada de medicamentos, uma vez que a NCB pode carregar antimicrobianos (SHAO *et al.*, 2016) e anti-inflamatórios (SILVA *et al.*, 2014).

Em paralelo, outra área onde a NCB está sendo aplicada é na engenharia de tecidos. A NCB está sendo empregada na produção de *scaffolds*, devido suas propriedades, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, porosidade e características mecânicas que favorecem a proliferação e diferenciação de células de tecidos (BOUHLOULI *et al.*, 2021; KHAN *et al.*, 2015). Sendo assim, a partir da NCB estão sendo desenvolvidos *scaffolds* para regeneração óssea de cartilagem (GEA *et al.*, 2018); nanocompósitos de NCB/queratina para uso na engenharia de tecidos da pele (KESKIN; URKMEZ; HAMES, 2017); desenvolvimento de estroma corneano (HAN *et al.*, 2020); *Bio-Scaffold* de NCB para terapia de reepitelização (TORGBO; SUKYAI, 2018); e hibridização de heparina e NCB como suporte para engenharia de tecidos vasculares (WAN *et al.*, 2011).

A NCB na indústria de alimentos é considerada uma fibra alimentar, e a *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA reconhece como biomaterial seguro (AZEREDO *et al.*, 2019). A indústria de alimentos se interessa pela NCB pelas suas propriedades de retenção de água, suspensão, espessamento, emulsificação e estabilidade (JAMSHEERA; PRADEEP, 2021). No mercado existe um produto em forma de cúbicos translúcidos e gelatinosos altamente consumido nas Filipinas como sobremesa, à base de NCB, chamado de Nata-de-coco. É produzido a partir de um inóculo bacteriano cultivado em água de coco, carboidratos e fonte de nitrogênio (PIADOZO, 2016). Com o objetivo de melhorar a dieta nutricional, a NCB está sendo incorporada nos alimentos como um substituto de gorduras (AZEREDO *et al.*, 2019). Essa substituição imita a funcionalidade da gordura que têm papéis importantes nas propriedades físicas, reológicas e de textura em alguns alimentos. Com isso, a NCB está substituindo a gordura em carnes e sorvetes (AZEREDO *et al.*, 2019; XAVIER; RAMANA,

2021). Além disso, a NCB está sendo utilizada como matriz para imobilizar probióticos, com o objetivo de proteger os microrganismos de sucos gástricos e garantir a chegada ao local (FIJAŁKOWSKI *et al.*, 2016). A sua porosidade permite a impregnação de outras moléculas, isso tem chamado a atenção para a produção de embalagens bioativas que tem o potencial de melhorar a qualidade e a segurança dos alimentos (AMORIM *et al.*, 2022; ZAHAN *et al.*, 2020).

A aplicabilidade da NCB em cosméticos tem sido explorada como material de suporte para máscaras faciais, para tratar pele seca devido a sua alta capacidade de hidratar, baixa toxicidade e facilidade de incorporar outros compostos. Bilgi *et al.* (2021) em seus estudos adicionaram moléculas antioxidantes como um suplemento para proteger a pele dos efeitos prejudiciais das espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres (FR) (BILGI *et al.*, 2021; ULLAH; SANTOS; KHAN, 2016). Também é utilizado como agente estruturante em formulações como esfoliante (HASAN; BIAK; KAMARUDIN, 2012); e lentes de contato (LEVINSON; GLONEK, 2010). A maioria dos cosméticos surfactantes utilizados em formulações de produtos podem ser irritantes cutâneos, dependendo da concentração e natureza química. Em vista disso se exploram surfactantes ou espessantes mais suaves ou naturais (MARTINS *et al.*, 2021; ULLAH; SANTOS; KHAN, 2016).

A biodegradabilidade da NCB e suas características mais sustentáveis, estão chamando atenção da indústria da moda (PROVIN *et al.*, 2021a). No mercado existem empresas como a Nanollose Ltda que produz fibras de viscose-rayon a partir de NCB, com o objetivo de substituir a celulose vegetal (NANOLLOSE, 2022). Há uma grande quantidade de resíduos nocivos que são formados em todas as etapas de fabricação, como também alto consumo de água, energia e descarte inadequado dos resíduos (PROVIN *et al.*, 2021). Em vista disso, a indústria têxtil procura alternativas em matéria prima como a NCB para fabricação de vestuário, calçados e acessórios (FERNANDES *et al.*, 2019).

As fibras de celulose que formam a membrana de NCB têm inúmeros grupos hidroxila ativos, que permitem a incorporação de nanopartículas inorgânicas e poliméricas (HU *et al.*, 2014). A funcionalização da NCB com nanopartículas pode levar à formação de nanocompósitos poliméricos eletricamente condutivos. Além da NCB se apresentar como um biomaterial condutivo, a sustentabilidade e biocompatibilidade com o meio ambiente, estimulam o estudo dentro da indústria de eletrônicos (PODDAR; DIKSHIT, 2021). Para a produção desses nanocompósitos eletricamente condutivos, diversas nanopartículas são impregnadas na NCB como; polipirrol e sulfeto de níquel (PENG *et al.*, 2016), polianilina e

nanotubos de carbono (REBELO *et al.*, 2019), iodeto de cobre (LI *et al.*, 2021), dióxido de titânio (BRANDES *et al.*, 2016); e nanoplacas de grafite esfoliadas (KIZILTAS *et al.*, 2016).

As propriedades mecânicas e alta pureza da NCB também têm despertado o interesse na indústria do papel, para apoiar a alternativa de papel reciclado. As propriedades do papel reciclado são afetadas negativamente no processo de hornificação, sendo necessário agentes de reforço como a NCB nas fibras de papel para melhorar a qualidade (BLANCO; MIRANDA; MONTE, 2013).

3.1.3 Biossínteses da NCB

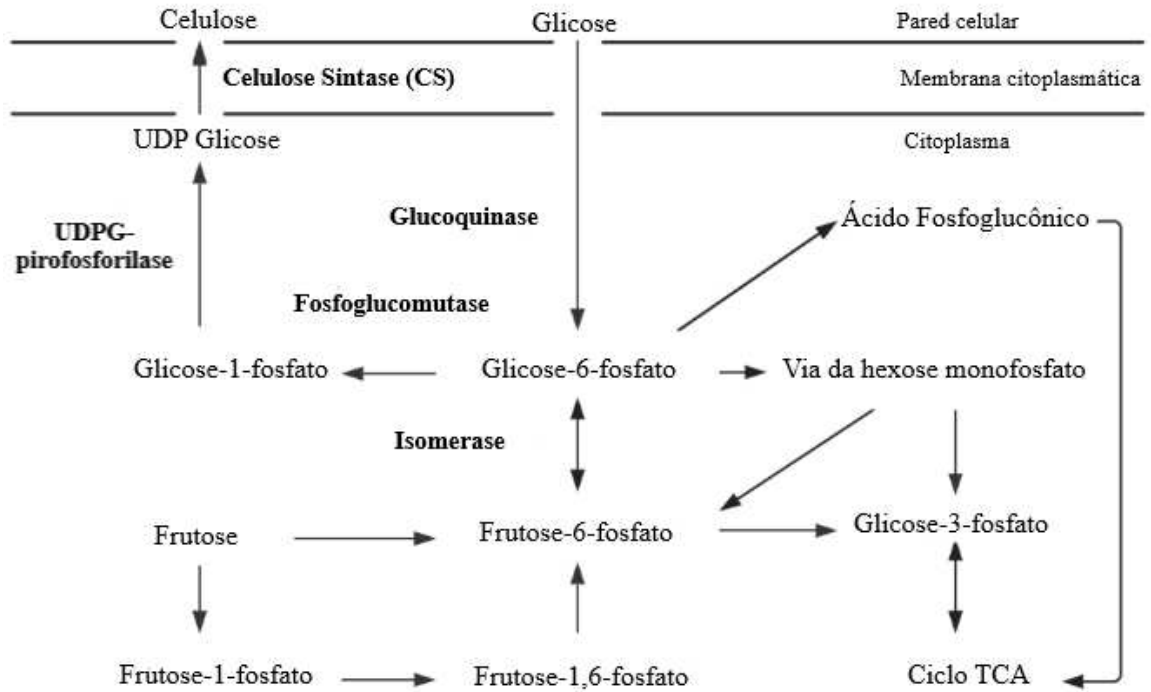
Existem várias espécies de microrganismos capazes de produzir celulose, mas a *K. xylinus* é considerada o microrganismo modelo para qualquer estudo de produção da NCB (DONINI *et al.*, 2010). A NCB produzido pelas bactérias, funciona como mecanismo de defesa, atua como barreira protetora frente a radiação ultravioleta, aumenta a capacidade de colonizar substratos, e permite a alta captação de água para evitar desidratação do substrato. Assim a membranas de NCB mantem-se em uma interface ar/líquido. Onde as bactérias em estado planctônico (meio líquido) vão para a superfície em busca de oxigênio necessário para o crescimento celular. As bactérias também podem ficar aderidas a membranas (estado sésil) (DONINI *et al.*, 2010; DUARTE *et al.*, 2019).

Em geral, os microrganismos que fazem parte do gênero *Komagataeibacter* conseguem produzir o biomaterial de NCB a partir de várias fontes de carbono como: glicose, frutose, manitol e glicerol (FONTANA *et al.*, 2017; JACEK *et al.*, 2019). Como também a partir de dissacarídeos, como a sacarose, maltose, entre outros. Porém, para os microrganismos utilizarem estas fontes, é necessário que essas moléculas sejam inicialmente hidrolisadas em monossacarídeos (JACEK *et al.*, 2019).

A biossíntese da NCB é um processo que envolve várias etapas reguladas, em que há participação de complexos de proteínas catalíticas e reguladoras (PARK; JUNG; KHAN, 2009). Assim, a produção de NCB pode ser obtida a partir de duas vertentes. Fontes internas; via gliconeogênese, convertendo o oxalacetato em piruvato pela ação da enzima piruvato carboxilase, seguido pela transformação de piruvato em fosfoenolpiruvato com ação da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (LUSTRI *et al.*, 2015). No caso das fontes externas, estas são transportadas ao citoplasma da célula e seguidamente quatro enzimas atuam nesta via: glucoquinase (fosforila o C6 da glicose e produz glicose-6-fosfato); fosfoglicomutase (catalisa a isomerização de glicose-6-fosfato a glicose-1-fosfato); UDPG (*Uridine diphosphate glucose*)

pirofosforilase (sintetiza UDP-glicose e celulose sintase CS) que produz a celulose a partir de UDP-glicose (JACEK *et al.*, 2019). A Figura 4 apresenta um resumo da via bioquímica de produção de NCB a partir de glicose.

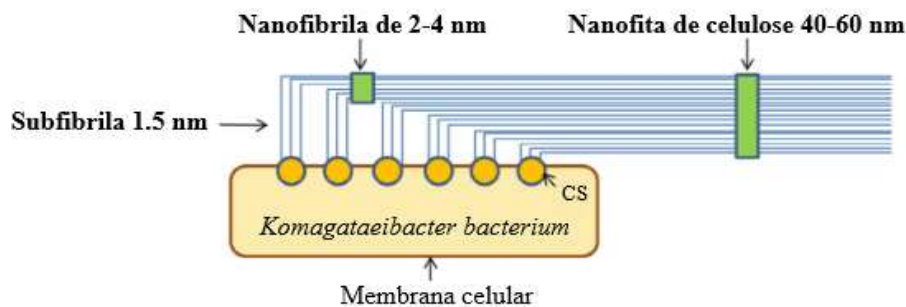
Figura 5 - Sínteses da NCB a partir de glicose



Fonte: Adaptado de Lin *et al.*, (2013); Souza (2014)

Na última etapa da síntese da membrana de NCB, o complexo enzimático celulase sintase (CS) localizado ao longo da membrana externa das bactérias, é responsável por catalisar a reação de polimerização das moléculas de glicose. O complexo enzimático ocupa-se de formar as cadeias de 1,4- β -glicano, que por um processo de sequência hierárquica se formarão fibras entrelaçadas (DONINI *et al.*, 2010). A membrana de NCB vai se formando a partir de subfibrilas de 1,5 nm, logo são montadas em nanofibrilas de 2 a 4 nm de largura, compostas por 10 a 250 cadeias poliméricas simples. As cadeias podem chegar a medir de 1 a 9 nm de comprimento, equivalente a 2000 até 18.000 - 20.000 unidades de glicose organizadas em nanofitas de 40–60 nm (Figura 5) (CACICEDO *et al.*, 2016).

Figura 6 - Representação esquemática da síntese e configuração de nanofita de membrana de NCB



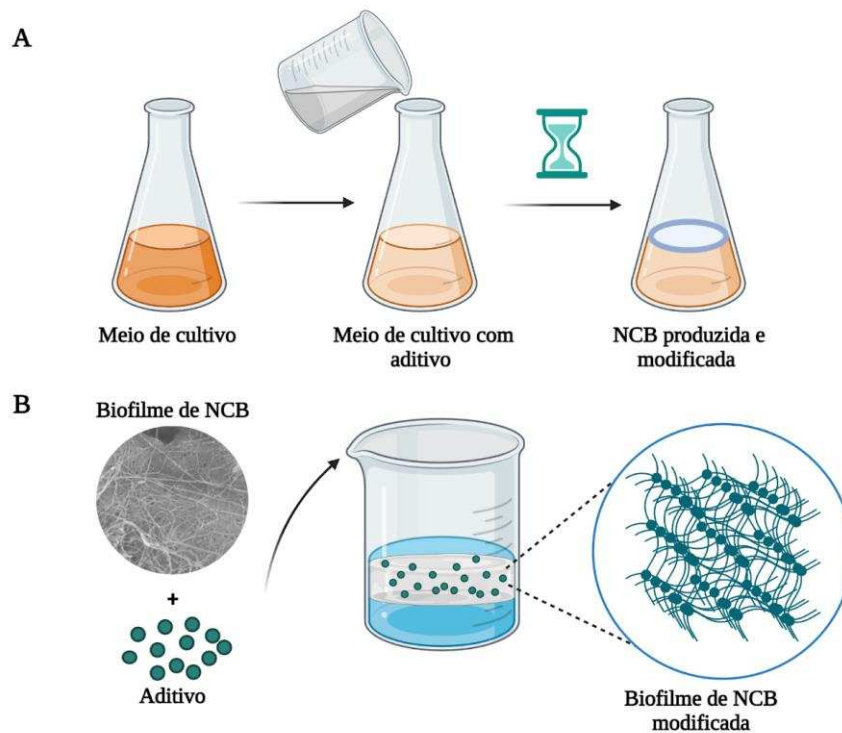
Fonte: Adaptado de Cacicedo *et al.*, (2016)

Durante a biossíntese da NCB, as fibras de celulose podem sofrer modificações pela incorporação de aditivos ao meio de cultura, com o intuito de alterar as propriedades físico-químicas do biomaterial. Esta técnica é chamada de *in situ*, permitindo a modificação da NCB para formar estruturas com qualidades adicionais. Nesse método é necessário o processo de purificação da NCB, que geralmente é realizado através de tratamentos alcalinos aliados a altas temperaturas, no qual pode levar a uma perda de atividade antioxidante de interesse. Os aditivos podem modificar a conformação das cadeias de celulose e gerar novas interações sejam: eletrostáticas, ligações de hidrogênio e van der Waals (CAZÓN; VÁZQUEZ, 2021). Alguns exemplos de aditivos já utilizados para modificação da NCB são o grafeno (DHAR; ETULA; BANKAR, 2019); gelatina (CHEN *et al.*, 2014); colágeno e moléculas bioativas (FERNANDES *et al.*, 2020); goma xantana (GAO *et al.*, 2020); poli vinil álcool (PVA) (GEA *et al.*, 2010); carboximetilcelulose (CMC) (DE LIMA FONTES *et al.*, 2018); nanopartículas de prata (MARIA *et al.*, 2010); polianilina (SHI *et al.*, 2012); fluoreto de sódio (SUN *et al.*, 2020), entre outros.

Por outro lado, a técnica de modificação *ex situ* consiste em adicionar na NCB outros materiais após a sua biossíntese e purificação (DUARTE *et al.*, 2019; GORGIEVA; TRČEK, 2019). Alguns dos compostos que podem ser incorporados na NCB com esta estratégia de modificação são: aloe vera (UL-ISLAM *et al.*, 2021); óxido de celulose e cobre (ANWAR *et al.*, 2020); ácido hialurônico e sericina de seda (WANG *et al.*, 2020); sulfadiazina de prata (ARIS *et al.*, 2019); poli(3,4-etilenodioxitiofeno)-poli(estireno sulfonato) (KHAN *et al.*, 2015); pós-bióticos de bactérias lácticas (YORDSHAHI *et al.*, 2020) entre outros. Contudo, o tamanho e a natureza da molécula podem ser um obstáculo associado ao método de modificação *ex situ*. Já que materiais hidrofóbicos não são capazes de serem combinados com a NCB, e moléculas

maiores podem não entrar nos poros. Além de que, aquelas que passarem podem ser distribuídos heterogeneamente pela matriz da NCB, em casos de arranjo estrutural não uniforme das fibrilas. A Figura 6 mostra uma representação esquemática das estratégias de incorporação de aditivos em membranas de NCB por técnicas *in situ* e *ex situ*.

Figura 7 - Representação esquemática das estratégias de modificação do biomaterial de NCB A) In situ B) Ex situ



Fonte: Autoria própria (2022)

3.1.4 Condições de cultivo

Para obtenção de NCB existem dois mecanismos de cultivo, o estático e o agitado. A seleção do método de produção vai depender da aplicação da NCB, pois a morfologia e propriedades resultantes são diferentes em qualquer desses dois mecanismos de cultivo (WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019). A produção de NCB pelo método estático é clássica, e baseia-se no cultivo em que não há movimento durante o tempo de incubação. Conseqüentemente, se obtém a formação uniforme da membrana de NCB na interface ar/líquido. Essa técnica de cultivo é a mais utilizada para produção de NCB em escala laboratorial (ISLAM *et al.*, 2017). Este processo de cultivo começa com o consumo de oxigênio pelas bactérias em suspensão, que tem como finalidade aumentar a população. Além disso,

nesta etapa ocorre pequena formação de membrana de NCB na fase líquida, onde as bactérias ficam aderidas e continuam liberando extracelularmente as nanofibrilas de NCB (DUARTE *et al.*, 2019). Outro método de cultivo é o agitado, aparecendo como estratégia para melhorar o fornecimento de oxigênio para as bactérias no tempo de cultivo e, conseqüentemente, aumentar o rendimento (WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019). A técnica de cultivo agitado gera variações irregulares na morfologia da NCB, pois podem ser formadas suspensões fibrosas como esferas e pellets (LAZARINI *et al.*, 2022). Porém, isso vai depender da velocidade de rotação, volume de inóculo e tempo de fermentação (ZAHAN; PA'E; MUHAMAD, 2016).

O rendimento da NCB e a produtividade das bactérias, podem ser afetadas pela composição do meio de fermentação: fonte de carbono e nitrogênio, assim como outros parâmetros de produção como: pH, temperatura e teor de oxigênio (LEE *et al.*, 2014). Segundo Chawla *et al.* (2009), na composição do meio de fermentação a glicose tem sido usada como fonte principal de carbono para produção de NCB. Com o intuito de baratear o custo de produção, há anos vem sendo estudadas outras fontes de carbono assim como, monossacarídeos, dissacarídeos, polissacarídeos, álcoois, ácido orgânicos entre outros (JONAS; FARAH, 1998; MOHAMMADKAZEMI; AZIN; ASHORI, 2015; SINGH *et al.*, 2016).

Outro componente principal no meio de cultivo para produção de NCB, é o nitrogênio, sendo que uma célula bacteriana é constituída por aproximadamente 13%. Este elemento se encontra presente em proteínas celulares, assim como também em ácidos nucleicos (MADIGAN *et al.*, 2016). As fontes de nitrogênio mais usadas para produção da NCB são a peptona e extrato de levedura (HESTRIN; SCHRAMM, 1954).

Dentre os parâmetros de produção da NCB, o pH é uma condição valiosa, sendo a faixa ótima para a bactéria produtora *K. xylinus* de 4-7 ou mais ácido (JONAS; FARAH, 1998). No entanto, o pH ótimo varia de acordo com a fonte de carbono, assim como também o método de produção. Em cultivo estático o pH do cultivo pode diminuir devido ao metabolismo respiratório da *K. xylinus*, isso ocorre pela oxidação do etanol a ácido acético e conversão de glicose em ácido glucônico (LUSTRI *et al.*, 2015). A temperatura é outro parâmetro que tem um papel importante que pode afetar tanto o crescimento quanto a produção da NCB, assim, a faixa de cultivo de *K. xylinus* é de 25°C - 30°C (JONAS; FARAH, 1998). O cultivo de *K. xylinus* a uma temperatura abaixo 5°C pode gerar rigidez na membrana e levar a inadequação no transporte de nutrientes, e acima de 40°C pode se desnaturar um ou mais componentes essenciais da célula (MADIGAN *et al.*, 2016; ZAHAN *et al.*, 2015).

Para a síntese e secreção da celulose é necessário condições aeróbicas (LIN *et al.*, 2013). A tensão de oxigênio é outro dos parâmetros importantes para produção de NCB, já que tensão de oxigênio superior a 15% pode interferir na produção de NCB. Isso, porque concentrações altas de oxigênio aumentam da quantidade de CO₂ que por sua vez reduz o pH de meio. O oxigênio é indispensável para o metabolismo da bactéria *K. xylinus*, mas a alta tensão de oxigênio pode levar ao processo oxidativo da rota metabólica, prejudicando assim a produção da membrana de NCB (PINEDA; MESA; RIASCOS, 2012).

Por outro lado, estudos têm focado na adição de aditivos para o meio de fermentação, com o objetivo de melhorar a produtividade e as propriedades físico-químicas das membranas de NCB. Alguns dos aditivos utilizados podem ser: ágar, carboximetilcelulose (CMC), celulose microcristalina e alginato de sódio (CHENG; CATCHMARK; DEMIRCI, 2009); ácidos orgânicos (LU *et al.*, 2015); álcool (YUNOKI; OSADA; KONO, 2004). E com a finalidade de diminuir o ácido glucônico no meio de cultivo para aumentar o rendimento já foi adicionado lignosulfonato (KESHK; SAMESHIMA, 2006).

3.1.5 Meio de cultura para produção de NCB

Em geral, os microrganismos apresentam exigências diferentes, quanto aos tipos de nutrientes, assim como também a quantidade (MADIGAN *et al.*, 2016). Portanto, alguns nutrientes são nomeados de macronutrientes como: Carbono (C), Oxigênio (O), Nitrogênio (N), Hidrogênio (H), Fósforo (P), Enxofre (S), uma vez que são necessários em grandes quantidades. Dentro desses macronutrientes tem-se o C, um dos elementos mais importantes para o crescimento microbiano, e está presente em três classes principais de nutrientes orgânicos: carboidratos, lipídios e proteínas (CHAN, 2003). Uma célula microbiana também precisa de N, pois uma célula é constituída por uma alta porcentagem de nitrogênio, o mesmo é encontrado em proteínas e ácidos nucleicos (MADIGAN *et al.*, 2016).

Na nutrição microbiana também são necessários os micronutrientes, corresponde a elementos que os microrganismos requerem em quantidades menores, mas que proporcionam funções importantes como: Boro (B), Cobalto (Co), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Molibdênio (Mo), Níquel (Ni), Selênio (Se), Cálcio (Ca) (CHAN, 2003). Assim sendo, esses micronutrientes nos microrganismos podem estar presentes em enzimas, ou podem atuar como ativadores de enzima e cofatores. Além disso, os microrganismos também precisam de compostos orgânicos como os fatores de crescimento (BEVERLY; GUIRARD, 1958).

O meio de cultivo contém vários componentes que auxiliam no crescimento, suporte e sobrevivência dos microrganismos (ARORA, 2013). Os meios de cultivo são formulados de acordo com as condições que os microrganismos se encontram no meio ambiente (BRIDSON; BRECKER, 1970). Desta forma, os meios de cultivo podem ser categorizados de acordo com a sua composição e aplicação. Os meios de cultura chamados de definidos têm composição química exata de compostos orgânicos e inorgânicos (ARORA, 2013; DOLT; BOUGHTON, 1908; SZITA *et al.*, 2003).

Já os meios complexos, também conhecido como indefinidos, podem conter produtos de origem microbiana, animal ou vegetal, como: proteína do leite, carne (extrato de carne), soja (caldo trípico de soja), células de leveduras (extrato de leveduras), entre outros (ABBASILIASI *et al.*, 2011; MADIGAN *et al.*, 2016; ROCHÍN-MEDINA *et al.*, 2018).

O meio complexo tradicional para produção de NCB é o Hestrin Schramm (HS). (HESTRIN; SCHRAMM, 1954). Porém, nos últimos anos tem sido relatado diferentes meios de cultivo alternativos para produção de NCB, através do uso de subprodutos ou resíduos agrícolas para substituir componentes do meio HS (URBINA *et al.*, 2021). Pode-se também utilizar meios quimicamente definidos (HEO; SON, 2002). Como também, meio com limitação estrita de nutrientes a partir de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, chamados de meio mínimo definido (DE SOUZA *et al.*, 2019).

3.2 Resíduos ou subprodutos para produção de NCB

Existe uma crescente exploração de meios alternativos para a produção de NCB. Como resíduos ou subprodutos liberados pela indústria ou do campo agrícola (na forma de líquidos, sólidos ou lamas), que podem substituir componentes do meio tradicional HS (HUSSAIN *et al.*, 2019; URBINA *et al.*, 2021). O emprego desses resíduos ou subprodutos como matérias-primas, é uma ação ecologicamente correta, pois ajuda a melhorar o gerenciamento dos resíduos do descarte inadequado das indústrias, que pode levar a problemas de acumulação e poluição (URBINA *et al.*, 2021). Assim nos últimos anos, tem aumentado a formulação de meios de cultura a partir de resíduos ou subprodutos para produção de NCB, onde se concentram na modificação da fonte de carbono e nitrogênio do meio complexo Hestrin-Schramm (HS) (SPEROTTO *et al.*, 2021). O Quadro 1 apresenta um levantamento de trabalhos dos último dez anos, onde foi realizada a modificação do meio complexo (HS), utilizando subprodutos industriais ou resíduos agrícolas para bactérias produtoras de nanocelulose.

Quadro 1 - Meios de cultura complexos modificados utilizando subprodutos e resíduos agrícolas por bactérias produtoras de NCB

Cepas bacterianas	Fonte de carbono	Método de produção	Rendimento NCB (g/L)	Referências
<i>Acetobacter</i> sp. V6	Glicerol	Cultura agitada a 30° C por 7 dias	4,98 g ^{PS}	Jung <i>et al.</i> (2010)
<i>Gluconacetobacter hansenii</i> UAC09	Extrato de casca de cereja de café	Cultura estática a 27° C por 14 dias	6,24 g ^{PS}	Rani <i>et al.</i> (2011)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 700178	Palhas de trigo	Cultura agitada a 29 ° C por 7 dias	10,6 g ^{PS}	Al-Abdallah e Dahman (2013)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> FC01	Melaço	Cultura estática a 30 ° C por 6 dias	0,57g ^{PS}	Çakar <i>et al.</i> (2014)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 53582	Soro de leite, frutas podres (ameixas, uvas verdes, abacaxis e maçãs)	Cultura estática a 30 ° C por 4 dias	5,9-60,2 g ^{PS}	Jozala <i>et al.</i> (2015)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> CH001	Água residual da fermentação lipídica (contendo hidrolisado de ácido de carolo de milho e 5,5% de açúcares antes da fermentação)	Cultura estática a 28 ° C por 10 dias	0,66 g ^{PS}	Huang <i>et al.</i> (2016)
<i>Acetobacter xylinum</i> LKN6	Resíduos líquidos de sagu	Cultura estática a 30°C por 14 dias	4,12g ^{PU}	Yanti <i>et al.</i> (2017)
<i>Gluconacetobacter hansenii</i> e <i>Gluconacetobacter xylinum</i>	Água de Côco; Água de polpa cítrica	Cultura estática a 30 ° C por 7 dias	8,42 g ^{PS} 9,91 g ^{PS}	Cao <i>et al.</i> (2018)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> PTCC 1734	Melaço de beterraba sacarina	Cultura estática a 28 ° C por 14 dias	4,56 g ^{PS}	Salari <i>et al.</i> (2019)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> PTCC 1734	Soro de queijo	Cultura estática a 28 ° C por 14 dias	3,55 g ^{PS}	Salari <i>et al.</i> (2019)
<i>Acetobacter xylinum</i> ATCC 23767	Glicerol bruto	Cultura estática a 30 ° C por 15 dias	2,07 g ^{PS}	Wu <i>et al.</i> (2019)
<i>Komagataeibacter saccharivorans</i> MD1	Melaço de cana tratado	Estaticamente incubado no escuro a 28 ° C por 7 dias	3,9 g ^{PS}	Canale-Parola <i>et al.</i> (2020)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 53582	Melaço de soja	Cultura estática a 30 ° C por 7 dias	10 g ^{PS}	Souza <i>et al.</i> (2020)
<i>Komagataeibacter xylinus</i> PTCC 1734	Soro de queijo e xarope de tâmaras	Cultura estática a 28°C por 10 dias	NM ^a	Raiszadeh-Jahromi <i>et al.</i> (2020)

Nota: ^{PS}peso seco, ^{PU}peso úmido e ^aNM (não mencionado).

Fonte: Adaptado de Sperotto *et al.*, (2020)

Nas últimas décadas, a indústria sucroalcooleira teve um grande crescimento, e simultaneamente, houve um aumento nas pesquisas de formulação de meios de cultivo a partir

dos seus resíduos e subprodutos (WOICIECHOWSKI, 2013). Um dos resíduos desta indústria é o melaço, que consiste em um líquido viscoso e escuro, obtido como efluente ao final da preparação do açúcar por cristalização repetida (VEANA *et al.*, 2014). O melaço é constituído geralmente por sacarose (30% - 40%), açúcares redutores (4%-12%) e proteína bruta 2,5% - 4,5% (SYRUPS, 2003). Da calda na destilação da fermentação do álcool a partir da cana-de-açúcar, é produzida a vinhaça, que se caracteriza por ser rica em matéria orgânica (DA SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007). Finalmente, o bagaço de cana, que consiste em um resíduo fibroso produzido após a prensagem do caule para extração do caldo de cana. Este resíduo contém aproximadamente 50% celuloses, 25% hemicelulose e 25% lignina (WOICIECHOWSKI, 2013).

A partir da soja, é gerado um xarope viscoso de cor marrom chamado de melaço, que é produzido a partir da soja desengordurada pela extração do álcool. Este subproduto contém principalmente carboidratos, proteínas e lipídios (RAKITA *et al.*, 2021). O refinamento do açúcar a partir da beterraba, também é gerado um resíduo chamado de melaço, que consiste em um xarope espesso com aproximadamente 50% de açúcar (GÜRÜ *et al.*, 2017).

O glicerol é outro dos subprodutos estudados como meio de cultivo em bactérias produtoras de NCB. Este resíduo é gerado a partir da produção de biodiesel, especificamente, na etapa de transesterificação, que consiste em uma reação química entre gordura de origem animal ou vegetal e álcool, na presença de um catalisador (LEONETI; ARAGÃO-LEONETI; DE OLIVEIRA, 2012). Devido a sua ocorrência na natureza, muitos microrganismos podem utilizar o glicerol como única fonte de carbono (DA SILVA; MACK; CONTIERO, 2009).

Outra indústria que se mantém em crescimento constante, é a indústria de laticínios e produz grandes quantidades de soro de leite. Por ser um forte efluente orgânico, se procuram alternativas para aproveitar esse resíduo (ZANDONA; BLAŽIĆ; JAMBRAK, 2021). O soro de leite é produzido durante a produção de queijos, e é a porção aquosa gerada no período de coagulação da caseína do leite. O soro de leite é fonte de lactose, proteínas solúveis, lipídios e sais minerais e vem sendo fortemente estudado para produção de NCB (MARTINI, 2016; KUMAR *et al.*, 2021).

3.2.1 Resíduos de frutas para produção de NCB

Os resíduos de frutas são fonte alternativa como meio de cultivo para microrganismos. Podem ser definidos como as partes não comestíveis, gerados nas etapas da cadeia de abastecimento alimentar, desde sua produção agrícola, manuseio pós colheita, armazenamento

e fases do consumo (PLAZZOTTA; MANZOCCO; NICOLI, 2017). O material restante das frutas ao longo da cadeia alimentar podem ser: cascas, pele, polpa, restos de polpa, caroço com sementes e caule (FIERASCU *et al.*, 2020). Entretanto, o descarte inadequado e a falta de gestão desses resíduos, pode gerar problemas ambientais, pois 85% desses resíduos são matéria orgânica (EDWIGES *et al.*, 2018).

O Brasil se destaca como um dos maiores produtores de frutas no ranking mundial e essa geração de resíduos pode ser um problema (FAOSTAT, 2022). Segundo Santos *et al.* (2020), 36% da produção mundial de frutas no mundo é de origem brasileira. Nos últimos anos com o objetivo de explorar e valorizar esses resíduos, estudos descrevem que esses resíduos são fonte de carbono, princípios ativos e enzimas (FIERASCU *et al.*, 2020; OKINO-DELGADO; PRADO; FLEURI, 2018; SANTOS *et al.*, 2020). Desta forma, polpas e resíduos de diferentes espécies de frutas tem sido explorado, para formulações de meio de cultivo para produção de NCB (Quadro 2).

Quadro 2 - Meios de cultura a partir de resíduos e polpas de frutas pré-tratadas para produção de NCB

Bactérias	Fonte de carbono	Pré-tratamentos	Referência
Resíduos de frutas			
<i>Saccharomyces</i> spp., <i>Zygosaccharomyces</i> spp., <i>Brettanomyces Bruxellensis</i> spp, <i>Komagataeibacter</i> spp,	Extrato da folha de banana	Físico	FIALLOS-CÁRDENAS <i>et al.</i> , (2021)
<i>Komagataeibacter xylinus</i> DSM 651	Bagaço de uva branca e vermelha	Físico e térmico	OGRIZEK <i>et al.</i> , (2021)
<i>Acetobacter xylinum</i> CGMCC 1.2378	Casca de coco	Químico	LIU; WANG; SUN <i>et al.</i> , (2021)
<i>Komagataeibacter.hansenii</i> GA2016	Cascas de frutas (melão, kiwifruit, maçã, romã)	Químico	GUZEL; AKPINAR (2020)
<i>Komagataeibacter sucrofermentans</i> DSM 15973	Resíduos de casca de laranja	Químico e enzimático	TSOUKO <i>et al.</i> , (2020)
<i>Komagataeibacter nataicola</i> TISTR 2661	Casca de maracujá e casca de banana	Enzimático	MOUKAMNERD <i>et al.</i> , (2020)
Polpa de frutas			
<i>Komagataeibacter</i> sp. SU12	Extratos de manga	-	CALDERÓN-TOLEDO <i>et al.</i> , (2021)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 53582	Suco de caju	-	SOUZA <i>et al.</i> , (2020)
<i>Gluconacetobacter hansenii</i> <i>Gluconacetobacter hansenii</i>	Polpa cítricas	Enzimática	CAO; LU; YANG (2018)
<i>Gluconobacter xylinum</i> CCM 3611T	Suco de maçã	-	BANDYOPADHYAY; SAHA; SAHA (2018)

Fonte: Aatoria própria (2022)

Entretanto tem-se uma desvantagem dos resíduos de frutas e outros resíduos sólidos serem utilizados como meio de cultivo. Primeiro em relação a composição química, visto que, esse tipo de resíduos contém celulose, lignina e hemicelulose. Assim, essas moléculas complexas, precisam ser tratadas para que os microorganismos possam aproveitar as fontes de carbono ou nitrogênio (FAN *et al.*, 2016; PATSIOS *et al.*, 2016).

Os pré-tratamentos utilizados podem ser métodos físicos (microondas, alta pressão, ultra sônica, etc.); químicos (ácido, álcali, etc.) e enzimáticos (LACA; LACA; DÍAZ, 2019). No tratamento químico para decomposição da celulose ou lignina, são utilizados reagentes alcalinos ou ácidos. No entanto, são processos onerosos, minuciosos, e geram alguns compostos poluentes (BRODEUR *et al.*, 2011; NI *et al.*, 2013). Para os tratamentos que utilizam métodos químicos ou físicos, é necessário o uso de reagentes e equipamentos de alto custo, e há um alto consumo de energia (AFTAB *et al.*, 2016). Já as enzimas, aparecem como alternativa ecológica para serem utilizadas como método de pré-tratamento, porém, a produção industrial de enzimas é significativamente cara, conseqüentemente, o produto no mercado também será (MERCK, 2022). Neste contexto, a utilização de matérias primas a partir de resíduos sólidos como meio alternativo para produção de NCB, ainda precisa ser estudado.

As polpas de frutas também são utilizadas como meios de cultura para produção de NCB, a maioria dos estudos formulam os extratos de fruta para substituir um dos componentes do meio HS, como a fonte de carbono (glicose), ou as fontes de nitrogênio (extrato de levedura e peptona) (BANDYOPADHYAY; SAHA; SAHA, 2018; CALDERÓN-TOLEDO *et al.*, 2022; CAO; LU; YANG, 2018; SOUZA *et al.*, 2020).

3.3 Fruta da família Myrtaceae como meio de cultivo para produção de NCB

Na região Sul do Brasil se concentra grande parte do bioma da Mata Atlântica (Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Aberta; Floresta Estacional Semidecidual; e Floresta Estacional Decidual) e pampa. Além de pequenos núcleos do Bioma Cerrado no Estado do Paraná. O Bioma da Mata Atlântica apresenta uma área de 390.869,13 km² na Região Sul, por sua vez, 98% do Estado do Paraná está coberto desse bioma (CORADIN; SIMININSKI; REIS, 2011). A Mata Atlântica é abraçada por uma enorme quantidade de espécies vegetais, e o endemismo é bastante alto, tanto na Mata Atlântica (50%), como também no Cerrado (35%) (CORADIN; SIMININSKI; REIS, 2011). Entre as espécies vegetais que fazem parte desses Biomas temos a família Myrtaceae (CORADIN; SIMININSKI; REIS, 2011; SIMPSON, 2010).

A família das Myrtaceae apresenta 121 gêneros e entre 3800 a 5800 espécies (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011). Esta família tem alto potencial econômico, pois as frutas como a goiaba de nome científico *Psidium guajava*, é uma das frutas mais consumidas no mundo e possui alto valor nutricional (TAKEDA *et al*, 2022). Os produtos no mercado a partir da goiaba podem ser transformados em suco, néctar, polpa, geleia, fatias em calda, barra de frutas ou produtos desidratados, além de ser utilizado como aditivo para outros sucos ou polpas de frutas (KADAM; KAUSHIK; KUMAR, 2012). Outra fruta desta família é a pitanga da espécie *Eugenia uniflora*. Esta fruta é consumida pelos brasileiros, na forma *in natura* ou processada como sucos, refrescos, geleias, doces, assim como também em bebidas, o famoso "licor ou conhaque de pitanga" (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). A jabuticaba (*Plinia sp*), outra fruteira nativa desta família também é utilizada para doces, geleias, licor ou vinho, assim também o araçá (*Psidium cattleianum* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). O perfume característico da jabuticaba, quanto da pitanga, tem chamado atenção de algumas linhas de produtos cosméticos, para serem utilizados como perfumes, óleos, cremes entre outras (NATURA, 2022).

Porém, a maioria das frutas da família Myrtaceae apresenta alta perecibilidade, sendo isso uma limitação para explorar o seu uso comercial. Várias frutas desta família apresentam características interessantes quanto à transformação de produtos, assim como também fontes e compostos bioativos (Tabela 1) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; PEREIRA *et al.*, 2021).

Tabela 1 - Análise química em g/100g* das frutas jabuticaba, pitanga e araçá

Análise química em g/100g*												
Jabuticaba (<i>Plinia sp</i>)												
Energia (kcal)	Ptn (g)	Lip (g)	Carb (g)	Fibra (g)	Cálcio (mg)	Fósforo (mg)	Ferro (mg)	Vit B1 (mg)	Vit B2 (mg)	Niacina (mg)	Vit C (mg)	
43	1,0	0,1	10,8	0,30	13,00	14,00	1,90	0,06	0,16	2,40	12,0	
Pitanga (<i>Eugenia uniflora</i>)												
Energia (kcal)	Ptn (g)	Lip (g)	Carb (g)	Fibra (g)	Cálcio (mg)	Fósforo (mg)	Retinol (mg)	Vit B1 (mg)	Vit B2 (mg)	Niacina (mg)	Vit C (mg)	
38	0,3	0,2	9,80	1,80	19,0	20,0	210,0	0,03	0,06	0,30	14,0	
Araçá (<i>Psidium cattleianum</i>)												
Energia (kcal)	Ptn (g)	Lip (g)	Carb (g)	Fibra (g)	Cálcio (mg)	Fósforo (mg)	Retinol (mg)	Vit B1 (mg)	Vit B2 (mg)	Niacina (mg)	Vit C (mg)	
62	1,5	0,6	14,3	5,20	48,00	33,00	48,00	0,06	0,04	1,30	326	

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde (2002)

Com base na Tabela 2, a jabuticaba (*Plinia sp*), pitanga (*Eugenia uniflora*) e araçá (*Psidium cattleianum*), contém boa fonte de carbono e vários compostos orgânicos, necessários em inúmeras reações metabólicas dos microrganismos (BEVERLY; GUIRARD, 1958). As vitaminas são compostas orgânicos que se classificam de acordo com a solubilidade em gordura, como a vitamina A (retinol e carotenoides). Já as vitaminas solúveis em água são: vitamina C (ácido ascórbico), vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B3 (niacina) (BLANC, 2019). Segundo Keshk (2014), a vitamina C aumenta a produtividade de NCB, e isso pode estar associado a diminuição do ácido glucônico (afeta a produção de NCB), que é formado no meio durante a fermentação (KESH, 2014). A suplementação do meio de cultivo com vitamina C, pode resultar em uma membrana de NCB com porosidade aprimorada e maior elasticidade (CIELECKA *et al.*, 2021).

As frutas da família Myrtaceae apresentam propriedades químicas interessantes para serem utilizadas como meio de cultivo para a biossíntese de NCB, tanto pela fonte carbono como pelos compostos bioativos que elas possuem, além da valorização das frutas nativas. A possibilidade de usar essas frutas como meio alternativo para produção de NCB pode ser uma abordagem inovadora. A partir do método *in situ* é possível avaliar as frutas como um meio de cultura para produção de NCB, porém devido ao processo de purificação após a sua produção pode inviabilizar o poder antioxidante. Além disso, partes das frutas contém compostos fenólicos que não permitem o crescimento bacteriano e tornaria o método *in situ* inviável. Nesse sentido torna-se necessário o estudo em questão para avaliar o potencial do desenvolvimento de novos biomateriais a base de NCB com frutas nativas brasileiras.

3.4 Patentes de produção NCB com meio de cultivo a partir de frutas

Para a busca de patentes em relação a produção de NCB a partir de resíduo ou polpas de frutas se utilizaram a seguintes palavras chaves (“bacterial cellulose” and “fruits”; “bacterial nanocellulose” and “fruits”; “biocellulose” and “fruits”; “microbial cellulose” and “fruits”) e (“bacterial cellulose” and “fermentation”). Para a busca se utilizaram duas bases de patentes: LENS (<https://www.lens.org/>) e Google Patents. O Quadro 3 apresenta um levantamento das patentes encontradas nessas bases.

Google Patents, é um sistema de busca de patentes do Google. Já o LENS possui dados provenientes do Escritório Europeu de Patentes, do Escritório Americano de Patentes, do Escritório Australiano de Patentes e dos documentos relacionados ao Tratado de Cooperação em termos de Patentes da WIPO (PIRES; RIBEIRO; QUINTELLA, 2020). As patentes

selecionadas se encontram em diferentes estados legais. As patentes em estado legal ativos, são patentes em que o último evento legal não está relacionado com a retirada ou caducidade. Já as patentes pendentes são aquelas que a patente de invenção ainda não foi concedida, mas o pedido está em fase de arquivamento ou pré-concessão. Finalmente as patentes interrompidas, são aquelas que o pedido foi rejeitado, recusado ou retirado, mas pode ser reativado (LENS.ORG, 2022). Das buscas realizadas não foi encontrado nenhum registro de patente que considere a produção de NCB a partir de frutas nativas brasileiras como a pitanga, jabuticaba ou araçá.

Quadro 3 - Levantamento de patentes sobre produção de NCB a partir de frutas encontradas nas bases de patentes Lens.org e Google patentes

Nº de Patente	Requerentes	Título	Fruta	Estado legal	Referência
Lens.org					
CN 102392062 A	Univ Donghua	Method for preparing bacterial cellulose by using decayed fruits as raw materials	Rotten fruit, apples, pears, peaches, watermelons, grapes and kiwi fruit.	Interrompido	YANG; WANG (2012)
CN 102168056A	Zhejiang Acad Agricultural Sci	Method for producing bacterial cellulose by taking citrus pomace as raw material	Citrus fruit bagasse	Ativo	LU <i>et al.</i> , (2013)
CN 104031956 A	Univ Shaanxi Science & Tech	Bacterial cellulose fermentation medium made from apple pomace and method for producing bacterial cellulose by utilizing medium	Apple pomace	Ativo	XUECHUAN <i>et al.</i> , (2016)
KR 101816859B12	Korea Res Inst Bioscience & Biotechnolog, Jadam Co Ltd	A Method for producing Bacterial Cellulose Using juice extraction cake of Citrus Fruits	Citrus fruit juice	Ativo	YONG; KON; YEONG (2018)
CN 109259216 A	Univ Tianjin Science & Tech	Preparation method of edible bacterial cellulose/dietary fiber	Fruit juice	Pendente	CHENG <i>et al</i> (2019)
CN 111893149A	Univ, Quanzhou Jianneng Environment Protection Tech Co Ltd	Method for preparing bacterial cellulose by utilizing soapberry fruit shells	Soap tree fruit peels	Interrompida	SHANSHAN; LIQUIN (2020)
WO 2022/049502 A1	Knowledge for Business SRL	Process for the Production of Nanocellulose	Juice from oranges, pineapples, clementines, peaches, apricots, plums, apples, melons, pears and grapes	Pendente	MARCO (2022)
Google patentes					
CN 101671708A	South China University of Technology SCUT	Method for fermented-producing bacteria cellulose with pineapple	Pineapple peel juice	Ativo	DONGMEI; HUI; SHUJUAN (2012)

CN 101805765A	ShangHai Yi Fang Rural Technology Holdings Co.,Ltd.	Method producing edible colorful bacterial cellulose with abandoned fruit juice or pomace	Fruit juice: orange, grape, kiwi, apple, pear, pineapple, watermelon, strawberry, redley carry, blackberry juice and pomace	Ativo	CHEN <i>et al.</i> , (2013)
CN 102925514A	HAINAN YEGUO FOODS CO Ltd	Application of mangos in bio-cellulose fermentation medium	Mango juice	Ativo	HAINAN YEGUO FOODS CO Ltd (2016)
CN 102911982A	HAINAN YEGUO FOODS CO LTD	Application of bananas in bio-cellulose fermentation media	Banana juice	Ativo	HAINAN YEGUO FOODS CO LTD (2016)

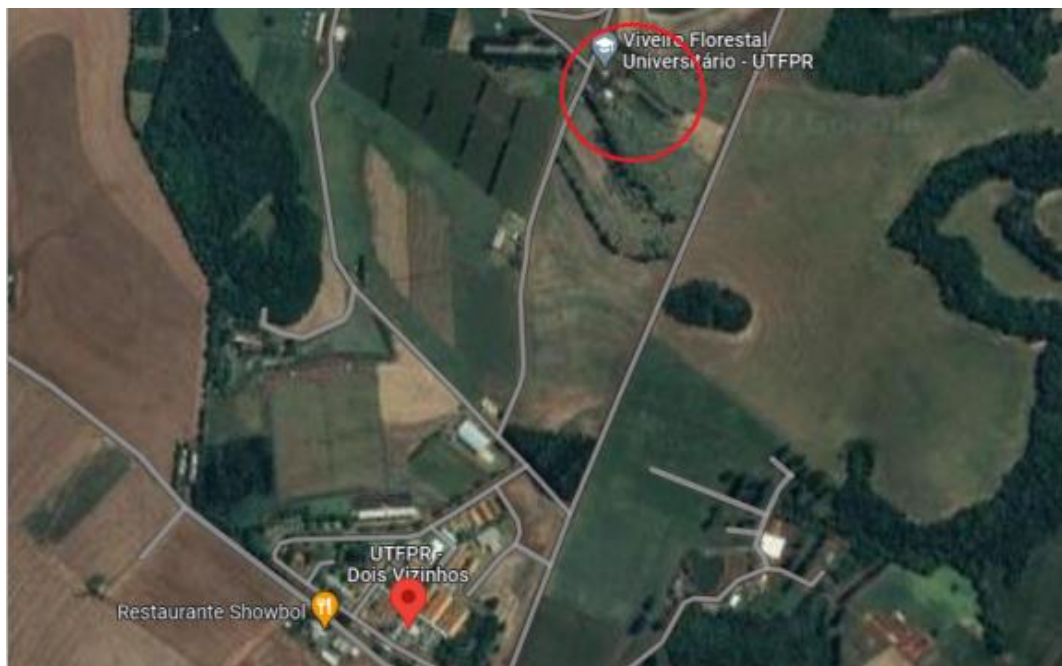
Fonte: Autoria própria (2022)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta de frutas nativas brasileiras do pomar da UTFPR-DV

As frutas nativas brasileiras da família Myrtaceae, jabuticaba (*Plinia* sp), pitanga (*Eugenia uniflora*) e araçá (*Psidium cattleianum*), foram obtidas do pomar da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus Dois Vizinhos* (Figura 8 e 9). Situado ao Sudeste do Estado de Paraná, 25°42” S, longitude de 53°06” W, com altitude de cerca de 520 m, segundo a classificação de Köppen, Clima subtropical.

Figura 8 - Localização do pomar da UTFPR-DV



Fonte: Google maps (2022)

Figura 9 - Frutas da família Myrtaceae coletadas do pomar da UTFPR-DV



pitanga (*Eugenia uniflora*)

jabuticaba (*Plinia* sp)

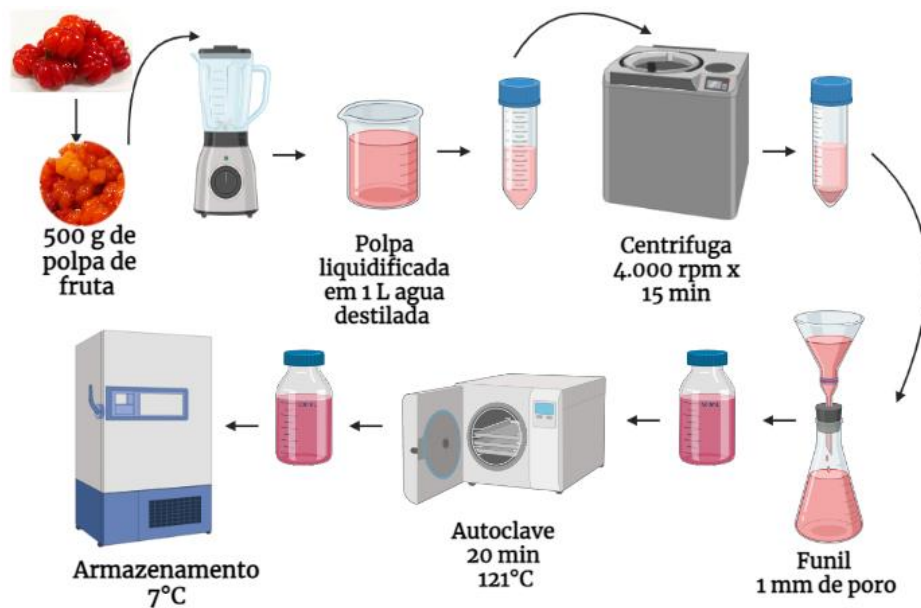
araçá (*Psidium cattleianum*)

Fonte: Autoria própria (2023)

4.2 Processamento e armazenamento das frutas

O método de despulpagem e filtragem dos meios de polpa de fruta foram adaptados de CALDERÓN-TOLEDO *et al.* (2021) e KHAN *et al.* (2021). As frutas foram despulpadas e preparou-se o meio com 500 g de polpa de fruta em 1 L de água destilada, seguidamente, liquidificada (CALDERÓN-TOLEDO *et al.*, 2021; KHAN *et al.*, 2021). Após seguiu-se para uma centrifugação por 15 min a 4.000 rpm. O filtrado foi passado por uma malha de 1 mm de diâmetro do poro, e seguiu-se para a autoclave (CALDERÓN-TOLEDO *et al.*, 2021). O meio de cultivo a partir da polpa de fruta foi armazenado a 7°C para posterior análises (Figura 10).

Figura 10 - Representação esquemática do processo e armazenamento do meio de cultivo a partir de polpa de frutas

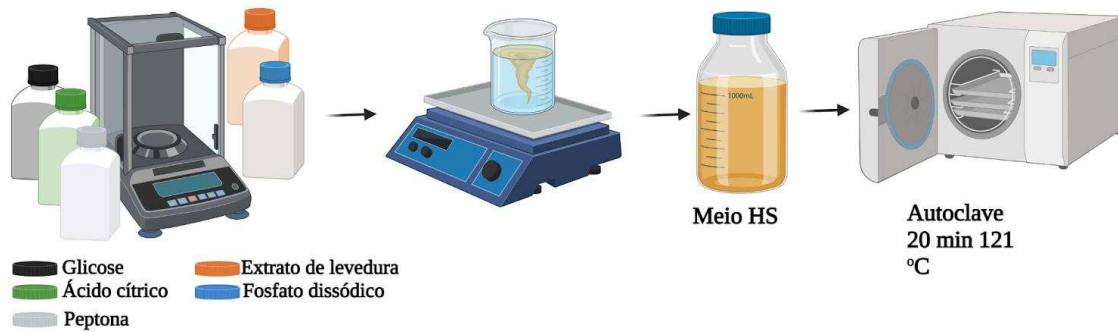


Fonte: Autoria própria (2022)

4.3 Produção dos meios de cultura

O meio padrão utilizado para produção de NCB, é o Hestrin Schramm (HS), preparado a partir de 20 g de glicose, 5,0 g de extrato de levedura, 5,0 g de peptona, 2,7 g de fosfato disódico (Na_2HPO_4) e 1,15 g de ácido cítrico por litro de água destilada. O meio foi esterilizado em autoclave por 20 min a 121°C (Figura 11) (HESTRIN; SCHRAMM, 1954). Foram realizadas diferentes modificações do meio a partir da substituição da glicose, extrato de levedura, peptona e/ou ácido cítrico pelo meio de polpa de fruta de jabuticaba, pitanga ou araçá. Além disso, testou-se o uso da polpa pura sem a adição de nenhum outro componente na produção (Quadro 4). As variações dos meios realizada, foi de acordo com a literatura.

Figura 11 - Representação esquemática da preparação dos meios de cultura



Fonte: Autoria própria (2022)

Quadro 4 - Meio HS, HS modificado e meio de polpa de fruta

Condições	Meio
1	HS completo (100%)
2	Meio de polpa de fruta (100%)
3	HS completo + meio de polpa de fruta (50% v/v)
4	HS modificado (sem glicose) (50% v/v) + meio de polpa de fruta (50% v/v)
5	HS modificado (sem extrato de levedura, sem peptona) (50% v/v) + meio de polpa de fruta (50% v/v)
6	HS modificado (sem ácido cítrico) (50% v/v) + meio de polpa de fruta (50% v/v)

Fonte: Autoria própria (2022)

4.4 Caracterização dos meios de cultura

Foram realizadas análises para a caracterização dos meios HS (condição 1), e os meios de polpa de fruta - jabuticaba, pitanga e araçá (condição 2). Determinou-se o carbono total e nitrogênio total por meio do Analisador de Carbono Orgânico Total, pH, conteúdo de compostos fenólicos e capacidade antioxidante pelo ensaio ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) e FRAP (poder antioxidante redutor férrico) (BENZIE; STRAIN, 1996; RE *et al.*, 1999; SINGLETON; ROSSI, 1965).

4.4.1 Determinação de Carbono Orgânico Total e Nitrogênio Total

Antes de iniciar as análises foi realizada a calibração do equipamento. O Analisador de Carbono Orgânico Total (TOC-LCSH, Shimadzu®), foi utilizada para determinar o Carbono Total e Nitrogenio Total do meio HS e meios de polpa jabuticaba, pitanga e araçá.

Aproximadamente 20 mL de cada meio de polpa fruta e HS foram injetadas no equipamento para à leitura. A análise foi realizada no Laboratório Multiusuário Central de Análises – LabCA na UTFPR – Campus Dois Vizinhos.

4.4.2 Determinação do pH dos meios de cultivo

Em um medidor de pH calibrado, o eletrodo de vidro foi submerso em um becker de 25 mL contendo 10 mL do meio de cultivo HS, jabuticaba, pitanga, araçá. A leitura foi registrada uma vez que o pHmetro foi estabilizado.

4.4.3 Determinação de antioxidantes dos meios de cultivo

A capacidade antioxidantes dos meios de cultivo HS, jabuticaba, pitanga e araçá, foram analisados pelo ensaio ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] (RE et al., 1999) e FRAP (poder antioxidante redutor férrico) (BENZIE; STRAIN, 1996). Assim também foi realizada a determinação de compostos fenólicos totais dos meios de jabuticaba, pitanga, araçá e HS pelo método Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965).

4.4.3.1 Determinação dos compostos fenólicos totais

Um volume de 250 μ L de cada meio de polpa de frutas ou HS, foram misturadas com 250 μ L do reagente Folin-Ciocalteu (diluído em água destilada, 1:1 v/v). Seguidamente, foi adicionado 500 μ L de solução de carbonato de sódio saturada e 4 mL de água destilada. Após 25 min de repouso, a mistura foi centrifugada por 10 min a 3000 rpm, e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 725 nm (Figura 12) (SINGLETON; ROSSI, 1965).

Soluções de concentrações conhecidas de ácido gálico com os seguintes pontos, 0,013 mg L⁻¹, 0,026 mg L⁻¹, 0,078 mg L⁻¹, 0,130 mg L⁻¹, 0,182 mg L⁻¹, 0,260 mg L⁻¹, foram usadas para a curva de calibração $y = 4,819x - 0,071$ ($R^2 = 0,9869$), as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em mg/L de meio.

Figura 12 - Representação esquemática da determinação de compostos fenólicos



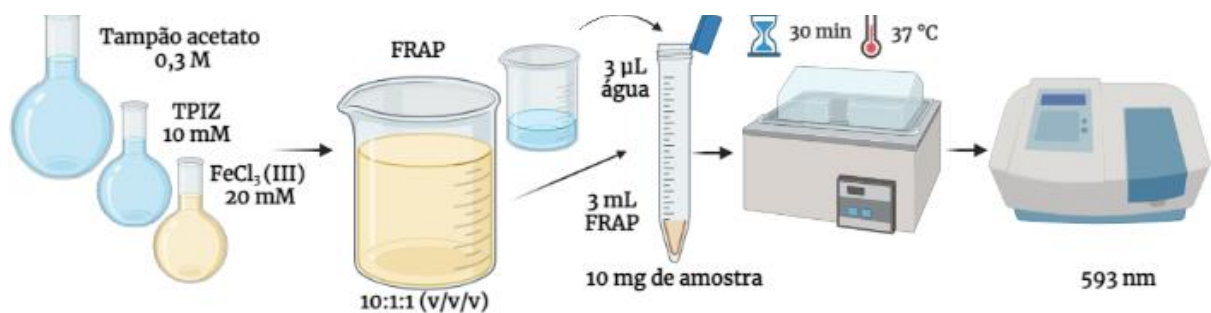
Fonte: Autoria própria (2022)

4.4.3.2 Determinação da atividade antioxidante por redução do ferro (FRAP)

A análise da atividade antioxidante por redução do ferro foi determinada conforme a metodologia Benzie Strain (1996) modificado (BENZIE; STRAIN, 1996). Inicialmente, a solução de FRAP foi preparada com a mistura das soluções aquosas de TPTZ [2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine] 10 mM, cloreto de férrico 20 mM e solução tampão de acetato de sódio 0,3 mol/L em pH 3,6 na proporção 1:1:10 (v/v/v). Posteriormente, 100 µL dos meios de polpa de fruta ou HS, junto com 300 µL de água destilada, e 3 mL do reagente FRAP foram adicionadas, e agitados por 1 minuto. Os tubos foram colocados a 30°C por 30 minutos. A absorbância foi medida em comparação com um branco a 593 nm (Figura 13).

Soluções aquosas de concentrações conhecidas de Fe (II) cada ponto de, 0 µmol L⁻¹, 90 µmol L⁻¹, 180 µmol L⁻¹, 460 µmol L⁻¹, 600 µmol L⁻¹, 900 µmol L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O, foram usadas para a curva de calibração $y = 0,0006x + 0,1455$ ($R^2 = 0,9901$), as análises foram realizadas em triplicata (SERPEN; GÖKMEN; FOGLIANO, 2012). Os resultados foram expressos em mmol Fe²⁺/L de meio.

Figura 13 - Representação esquemática da determinação da atividade antioxidante dos meios de fruta e HS por FRAP



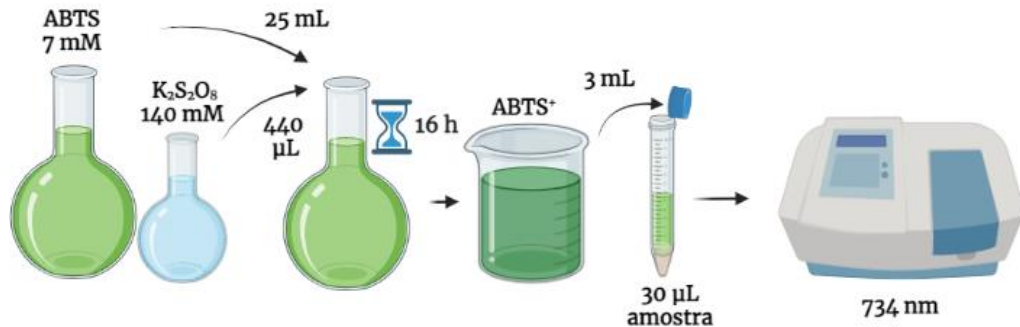
Fonte: Autoria própria criada em biorender.com (2022)

4.4.3.3 Determinação da atividade antioxidante por redução do cátion radical livre ABTS

A análise da atividade antioxidante através da captura do radical livre ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi determinada conforme a metodologia de Re *et al.* (1999) (RE *et al.*, 1999). A solução de ABTS foi preparada a partir das soluções aquosas de ABTS 7 mM e solução de persulfato de potássio (K₂S₂O₈) 140 mM. Para isso 25 mL da solução estoque de ABTS e 440 uL da solução persulfato de potássio foram misturados e mantidos ao abrigo por 16 horas em temperatura ambiente antes do uso. Em seguida a mistura foi diluída em álcool etílico até obter uma absorbância entre 0,750-0,800 a 734 nm, após 6 minutos. Seguidamente, foi adicionado 30 µL de soluções de meio de polpa de fruta ou HS para 3 mL de uma solução ABTS^{•+} diluída. Foi misturada, e a absorbância foi medida em comparação com um branco a 734 nm (Figura 14).

Concentrações conhecidas de soluções etanólicas de Trolox de cada ponto, 100 µmol L⁻¹, 500 µmol L⁻¹, 1000 µmol L⁻¹, 1500 µmol L⁻¹, 2000 µmol L⁻¹, foram usados para a curva de calibração $y = -0,0003x + 0,7368$ (R² = 0,9857), as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em mmol de ET (equivalente trolox) por litro de meio (SERPEN; GÖKMEN; FOGLIANO, 2012).

Figura 14 - Representação esquemática atividade antioxidante dos meios de polpa de fruta e HS redução do cátion radical livre ABTS

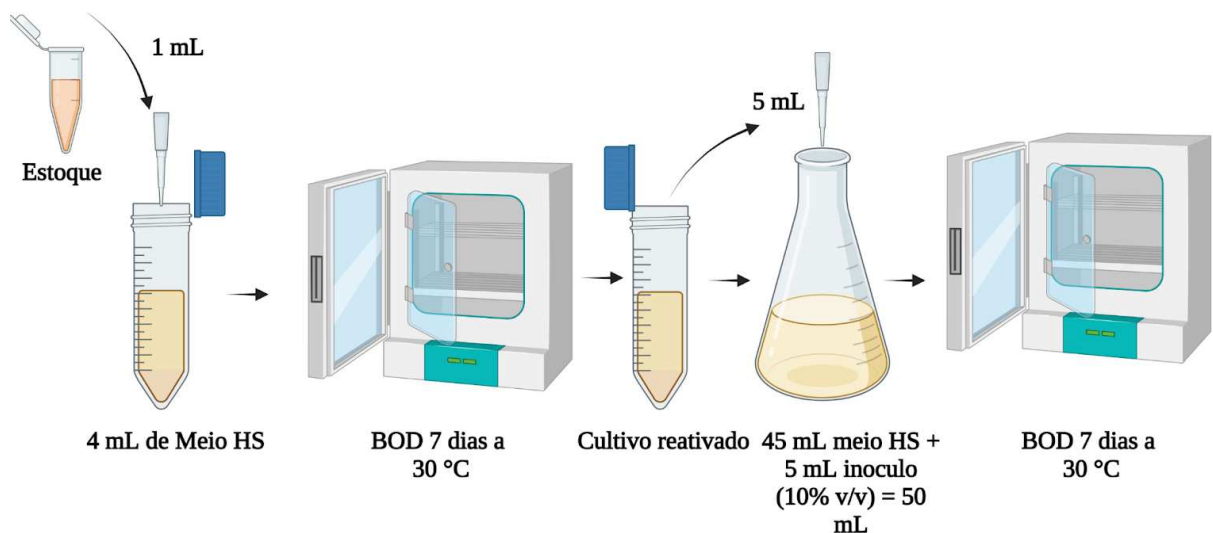


Fonte: Autoria própria (2022)

4.5 Cultivo de microorganismos e preparação do inóculo

A bactéria *Komagataeibacter xylinum* (ATCC® 53524™), foi utilizada neste trabalho. Foi necessário a reativação da cepa que se encontrava armazenada em um estoque no ultra freezer a -80°C. Foi realizado o descongelamento de uma alíquota de 1 mL do estoque e colocado em um tubo com 4 mL de meio HS, sendo finalmente homogeneizado no vórtex. Os tubos foram colocados na BOD a 30°C em cultura estática por 7 dias. O cultivo reativado foi expandido em erlenmeyer, chamado de pré-inóculo. Para os experimentos os inóculos foram produzidos a partir de pré-inóculo em uma proporção de 10 % (v/v) com meio HS, e mantido em BOD a 30°C por 7 dias (Figura 15).

Figura 15 - Representação esquemática da reativação e preparação de inóculo



Fonte: Autoria própria (2022)

4.6 Produção das membranas

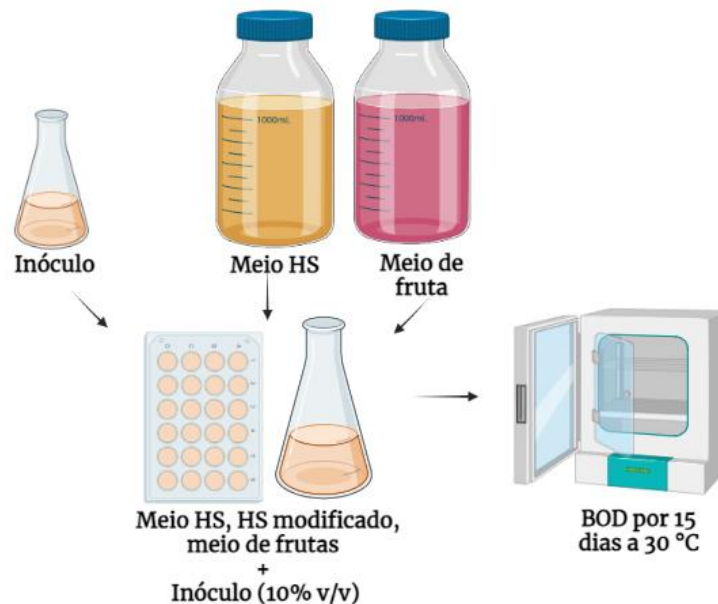
Para a produção de NCB foram utilizadas placas de 6, 12 e 24 poços para serem utilizadas nas caracterizações das membranas e em Erlenmeyer de 250 mL para a produção de NCB em escala maior e para o cálculo de rendimento foram inoculados os seguintes volumes conforme a Tabela 2, posteriormente, incubadas em condição estática na BOD a 30°C por 15 dias. O tempo de incubação foi definido para avaliar o potencial do uso das frutas nativas durante a fermentação em termos de rendimento de NCB (Figura 16).

Tabela 2 - Volumes do meio HS, HS modificado, meio de fruta e inóculo para síntese das membranas

Condições	Meio HS, polpa de fruta e HS modificado	Volume de meio (mL)	Inóculo (mL)	Volume total (mL)
1	HS (100%)	90	10	100
2	Meio de polpa de fruta (100%)	180	20	200
3	HS + meio de polpa de fruta (50% v/v)	180	20	200
4	HS (sem glicose) (50% v/v) + meio de polpa de fruta (50% v/v)	180	20	200
5	HS (sem extrato de levedura, sem peptona) (50% v/v) + meio de polpa de fruta (50% v/v)	180	20	200
6	HS (sem ácido cítrico) (50% v/v) + meio de polpa de fruta (50% v/v)	180	20	200

Fonte: Autoria própria (2022)

Figura 16 - Representação esquemática da produção de membranas

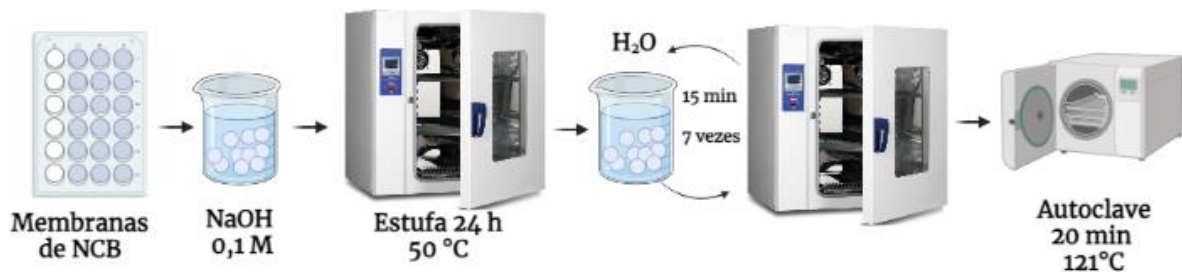


Fonte: Autoria própria (2022)

4.7 Purificação e secagem das membranas

Após o período de incubação, as membranas produzidas, foram removidas e purificadas em um béquer contendo solução de 0,1 M de hidróxido de sódio por 24 horas a 50°C, em condição estática. O objetivo da purificação, é retirar as bactérias e resíduos que se encontram embebidos nas membranas. Após essa etapa, as membranas passaram por períodos de lavagem em água destilada e mantiveram-se por 15 minutos na estufa a 50°C. Esse procedimento foi repetido por 7 vezes, e finalmente, as membranas foram autoclavados por 20 minutos a 121°C (Figura 17). Algumas amostras de NCB passaram pelo processo de secagem em um liofilizador para posteriores análises. Para esse processo, as membranas foram congeladas a -20°C por 24 horas e posteriormente liofilizadas por um período de 24 horas.

Figura 17 - Representação esquemática da purificação das membranas de NCB



Fonte: Autoria própria (2022)

4.8 Rendimento e estimativa de custo de produção de membranas de NCB

Para a determinação do rendimento foi considerado o peso seco das membranas de NCB que apresentaram o maior rendimento, sendo que a análise foi realizada em triplica. Para a estimativa de custo de produção de membrana de NCB foi realizado um levantamento de preço dos componentes dos meios HS, e o preço médio do preço das frutas de jabuticaba e pitanga, em escala laboratorial. A estimativa de custo dos meios foi relacionada a produção de NCB em peso úmido das membranas produzidas nas seis condições avaliadas.

4.9 Caracterização físico-química da NCB

A caracterização físico-química foi realizada apenas nas condições 1 e 2, referente ao meio HS tradicional (NCB-H) e aos meios com polpa pura das frutas (NCB-J, NCB-P e NCB-A).

4.9.1 Capacidade de retenção de água (*Water Holding Capacity - WHC*)

A capacidade de retenção de água (WHC) foi determinada pela imersão das membranas NCB-H, NCB-J, NCB-P e NCB-A em água destilada, seguida da pesagem das membranas hidratadas. Após, as amostras foram liofilizadas para determinar o seu peso seco. Foi considerada uma média de três amostras (DO NASCIMENTO, 2022). O WHC foi calculado através da seguinte equação (1):

$$WHC = \frac{\text{massa hidratada (g)} - \text{massa seca (g)}}{\text{massa hidratada (g)}} \times 100 \% \quad (1)$$

4.9.2 Porosidade das membranas de NCB

A determinação porosidade da superfície das membranas foi obtido a partir da Equação 2. Para isso, considerou-se o peso úmido W_w e peso seco W_d das membranas, densidade da água d (1 g.cm^{-3}), espessura da membrana D (cm), e a área da membrana A (cm^2), foi considerada uma média de três amostras (DING *et al.*, 2016; DO NASCIMENTO, 2022).

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

4.9.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Micrografias com aproximações 10.000x das membranas NCB-H, NCB-J, NCB-P e NCB-A foram observadas no Microscópio Eletrônico de Varredura (Marca Quorum, Modelo SC7620) para avaliação da porosidade e da microestrutura do lado superior e inferior das membranas. A análise foi realizada no Centro de Caracterização Multiusuário em Pesquisa e Desenvolvimento de Materiais (C2MMA) UTFPR campus Ponta Grossa. Para a análise, cada uma das membranas de NCB-H, NCB-J, NCB-P e NCB-A foram cortadas em 3x3 cm e recobertas por ouro.

4.9.4 Propriedades mecânicas – testes tensão-deformação e Modulo de Young

Para a análise da força de tração das membranas de NCB, foi utilizado Texturizador (ou texturometro) TA.XTplus/50 da Stable Micro System do Laboratório de Análises (LabAna) –

UTFPR *Campus* Francisco Beltrão. Para isso, foram produzidas membranas de NCB-H, NCB-J, NCB-P e NCB-A retangulares na dimensão de 5x1 cm, as análises foram realizadas em duplicata.

4.9.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Para analisar qualitativamente os grupos funcionais das membranas de NCB-H, NCB-J, NCB-P e NCB foi realizada a análise dos espectros de FTIR das membranas. Para a análise de espectroscopia de infravermelho, foi utilizado amostras secas de 1x1 cm para leitura, com número de onda de 4000 - 400 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e acumulações de 32 varreduras, com o método de amostragem ATR (Reflectância Total Atenuada). A análise foi realizada na Central de Análise – UTFPR Campus Pato Branco.

4.10 Análise dos antioxidantes nas membranas

4.10.1 Análise de atividade antioxidante pelo método QUENCHER

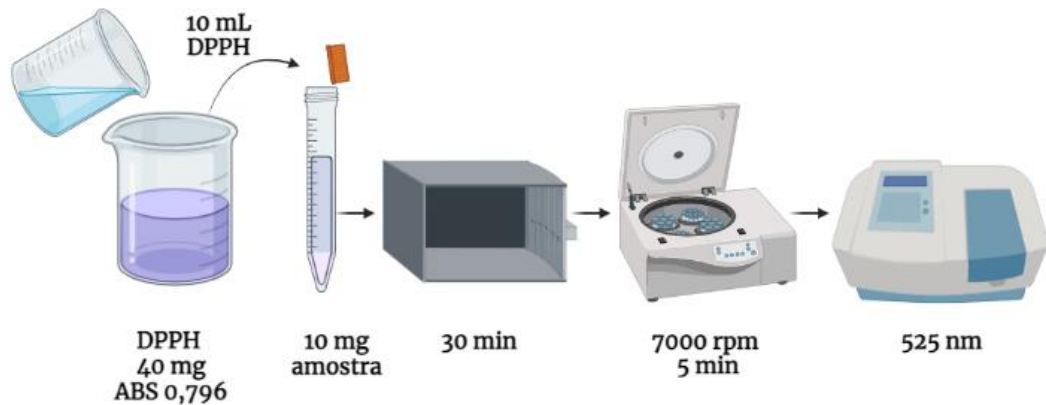
A capacidade antioxidante das membranas foi determinada utilizando o método “QUENCHER” (o inglês QUick, Easy, New, CHEap and Reproducible). Esse método é baseado na análise direta de amostras sólidas misturadas com os radicais, seguido da leitura em espectrofotômetro (GÖKMEN; SERPEN; FOGLIANO, 2009). Amostras das membranas de NCB-H, NCB-J, NCB-P e NCB, foram secas e moídas a 60 mesh. As reações foram desenvolvidas em triplicata e os resultados foram expressos $\mu\text{mol ET/g}$ de amostra seca.

4.10.1.1 Determinação da atividade antioxidante das membranas de NCB por captura do radical livre DPPH

A atividade antioxidante por inibição do radical livre DPPH (2,2- difenil-1-picril hidrazil) foi determinada conforme a metodologia de Blois (1958), adaptado por Brand-Williams et al (1995) (BLOIS, 1958; BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Inicialmente, foi preparada uma solução metanólica de DPPH de concentração de 40 mg/L com absorvância ajustada para 0,750 - 0,800 a 525 nm. Em seguida, 10 mg de amostra foi pesada e transferida para tubos de centrifuga. A reação foi iniciada pela adição de 10 mL da solução de DPPH e agitados vigorosamente por 1 minutos permanecendo ao abrigo de luz. Após 30 min

os tubos foram centrifugados a 7000 rpm por 5 minutos, após a reação 2 mL do sobrenadante foi transferido para uma cubeta para a leitura da absorbância a 525 nm (Figura 18) (SERPEN; GÖKMEN; FOGLIANO, 2012).

Figura 18 - Representação esquemática da determinação de antioxidantes das membranas por DPPH



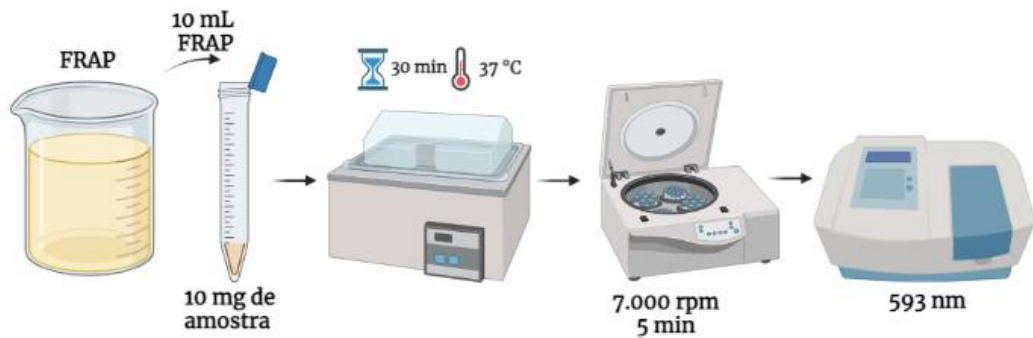
Fonte: Autoria própria (2022)

Soluções metanólicas de concentrações conhecidas de Trolox, cada ponto foi de 30 $\mu\text{mol/L}$, 90 $\mu\text{mol/L}$, 180 $\mu\text{mol/L}$, 360 $\mu\text{mol/L}$, 600 $\mu\text{mol/L}$, foram utilizadas para a confecção da curva de calibração ($y = -1255,3x + 946,46$ $R^2 = 0,9976$). Para os pontos da curva, transferiu-se para tubos de ensaio 0,1 mL da solução de trolox adicionada a 9,9 mL de da solução de DPPH e mantidos ao abrigo de luz por 30 minutos. Após esse período 2 mL dessa mistura foi transferido para uma cubeta para leitura da absorbância a 525 nm (SERPEN; GÖKMEN; FOGLIANO, 2012).

4.10.1.2 Determinação da atividade antioxidante dos biomateriais por captura do radical livre FRAP

Para análise dos antioxidantes das membranas, foi utilizado a solução de FRAP preparada no item 4.3.3.1. Foi pesado 10 mg de amostras e transferida para tubos de centrífuga. A reação foi iniciada pela adição de 10 mL da solução FRAP e agitados vigorosamente por 1 minutos, depois os tubos foram colocados em banho maria a 37°C por 30 minutos do início da reação. As amostras foram centrifugadas a 7000 rpm por 5 min, e 2 mL do sobrenadante foi transferido para cubeta para a leitura da absorbância a 593 nm (Figura 19) (SERPEN; GÖKMEN; FOGLIANO, 2012).

Figura 19 - Representação esquemática da determinação de antioxidantes das membranas por FRAP



Fonte: Autoria própria (2022)

Soluções aquosas de concentrações conhecidas de Trolox, cada ponto foi de 30 $\mu\text{mol/L}$, 90 $\mu\text{mol/L}$, 180 $\mu\text{mol/L}$, 360 $\mu\text{mol/L}$, 600 $\mu\text{mol/L}$, foram utilizadas para a confecção da curva de calibração $y = 890,72x - 46,925$ $R^2 = 0,9999$. Para os pontos da curva, transferiu-se para tubos de ensaio 0,1 mL da solução de trolox adicionada a 9,9 mL de da solução FRAP. Depois os tubos foram colocados em banho maria a 37°C por 30 minutos do início da reação, 2 mL do sobrenadante foi transferido para cubeta para a leitura da absorbância a 593 nm (SERPEN; GÖKMEN; FOGLIANO, 2012).

4.11 Tratamento dos dados

Análise estatística ANOVA de um fator ($p \leq 0,05$) foi usada para determinar as diferenças estatísticas da capacidade antioxidante dos meios, capacidade de retenção de água e porosidade de membranas (análises em triplicata), propriedades mecânicas e capacidade antioxidantes de membranas de NCB-H, NCB-J, NCB-P e NCB-A (análise em duplicata). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando scripts R (versão 3.2.3) no RStudio.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta das frutas nativas

As frutas de jabuticaba foram coletadas na primavera em outubro e dezembro em dois estados de maturação: estágio IV, frutos com textura mole com pigmentos vermelhos e escuros; estágio V, frutos totalmente maduros. As frutas pitanga foram coletadas no verão e primavera no estado de maturação de acordo com a coloração do epicarpo, amarelo, alaranjado e vermelho (BEZERRA *et al.*, 2018a). Já as frutas de araçá foram coletadas no verão com uma coloração do epicarpo de amarelado a amarelo (BEZERRA *et al.*, 2018b).

5.2 Produção de membranas de NCB em meio HS, HS modificado e polpa de frutas

As membranas produzidas nas seis condições apresentaram os seguintes rendimentos conforme a Tabela 5. Os meios HS, variações de meio HS com fruta e polpa de fruta a partir de jabuticaba, pitanga, araçá e polpa pura das frutas, mostraram capacidade para sintetizar membranas de NCB. Os resultados apresentados referem-se a membranas produzidas em Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de cada meio (Tabela 3) (Figura 20).

As membranas de NCB produzidas no meio de polpa pura jabuticaba (NCB-J) (condição 2) gerou uma membrana de 37 g e 8,9 mm de espessura, o meio HS modificado sem ácido cítrico com polpa de jabuticaba (condição 6) obteve uma membrana de 40 g e o meio com polpa pura de pitanga (NCB-P) (condição 2), a membrana apresentou um peso de 38,10 g e 9 mm de espessura. Essas condições apresentaram valores de rendimento consideráveis comparado a membrana produzida no meio HS completo (NCB-H) com 40,3 g de peso úmido e 9,27 mm de espessura.

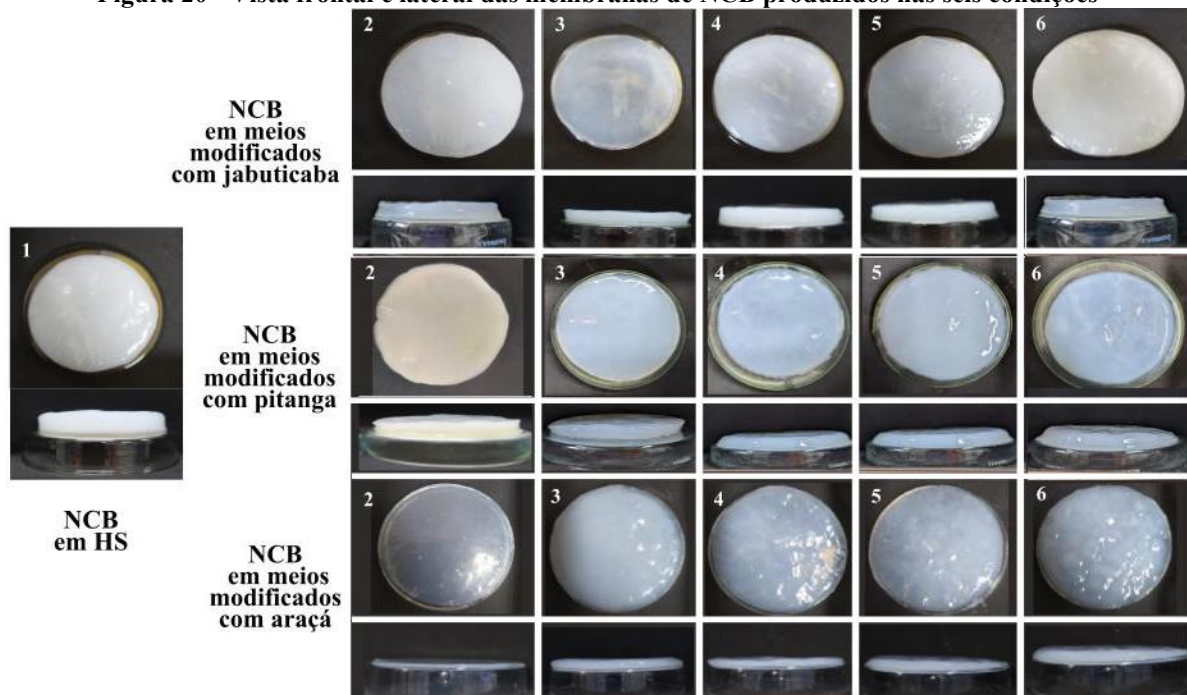
Os resultados evidenciam um potencial do uso de polpa pura de jabuticaba e pitanga para produção de NCB, uma vez que a condição 2 não há adição de nenhum componente químico do meio HS na composição. Por outro lado, as membranas de NCB produzidas a partir de araçá (NCB-A) não resultaram em um bom rendimento de produção com peso de 2,42 g e espessura de 0,52 mm. A Figura 21 mostra a vista frontal das membranas de NCB produzidas em meio HS (NCB-H), polpa pura de jabuticaba (NCB-J), polpa pura de pitanga (NCB-P) e polpa pura de araçá (NCB-A).

Tabela 3 - Peso úmido e espessura da membrana de NCB produzidas em

Condições	NCB-H		NCB-J		NCB-P		NCB-A	
	Peso (g)	Espessura (mm)	Peso (g)	Espessura (mm)	Peso (g)	Espessura (mm)	Peso (g)	Espessura (mm)
1 HS completo (100%)	40,30	9,27	-	-	-	-	-	-
2 Meio polpa de fruta (100%)			37,30	8,90	38,10	9,00	2,42	0,52
3 HS completo (50%) + meio polpa de fruta (50%)			24,85	5,05	32,70	5,96	20,86	3,63
4 HS modificado (sem glicose) (50% v/v) + meio polpa de fruta (50% v/v)			35,00	9,13	20,32	4,83	14,09	2,89
5 HS modificado (sem extrato de levedura e peptona) (50% v/v) + meio polpa de fruta (50% v/v)			33,55	7,39	30,18	5,50	8,89	1,71
6 HS modificado (sem ácido cítrico) (50% v/v) + meio polpa de fruta (50% v/v)			40,00	9,90	22,18	5,24	17,32	2,56

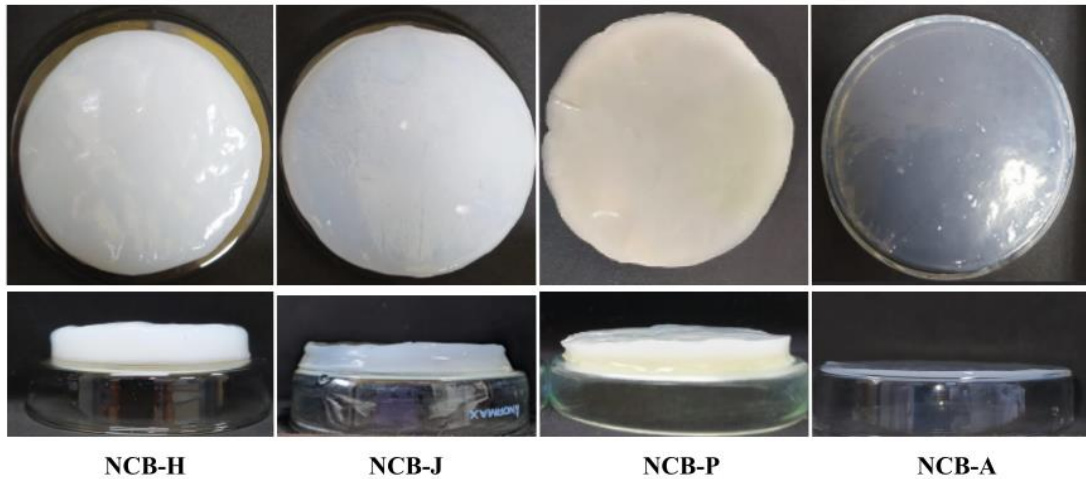
Fonte: Autoria própria (2023)

Figura 20 - Vista frontal e lateral das membranas de NCB produzidos nas seis condições



Fonte: Autoria própria (2023)

Figura 21 - Vista frontal e lateral das membranas de NCB-H (condição 1) e NCB-J, NCB-P, NCB-A (condição 2)



Fonte: Autoria própria (2023)

Trabalhos como Calderón-Toledo *et al.* (2021), Cao *et al.* (2018) e Souza *et al.* (2020) focam na modificação do meio HS com a adição de outras fontes de carbono, nitrogênio ou aditivos (CALDERÓN-TOLEDO *et al.*, 2021; CAO; LU; YANG 2018; SOUZA *et al.*, 2020). A condição 2, que considerou apenas o uso da polpa pura sem nenhum componente do meio HS foi um teste realizado nesse estudo que revelou excelentes resultados quando se tratou do meio a partir de jabuticaba e pitanga.

A partir destes resultados a condição 1 (HS completo) e condição 2 (polpa pura de jabuticaba, pitanga e araçá) foi realizado a caracterização química e capacidade antioxidante dos meios de cultura. Além disso, seguiu-se com a caracterização físico-química e capacidade antioxidante das membranas produzidas nestes meios, NCB-H, NCH-J, NCB-P e NCB-A.

5.3 Caracterização química e capacidade antioxidante dos meios

Os resultados da caracterização do meio HS, meios de polpa pura de jabuticaba, pitanga e araçá, são mostrados na Tabela 4. Verifica-se que o meio HS com 23,66 g/L apresentou maior conteúdo de carbono orgânico, seguido pelo meio de jabuticaba com 19,85 g/L, pitanga com 17,20 g/L, e finalmente o meio araçá com 14,67 g/L. Por outro lado, o nitrogênio total foi mais notável no meio HS (0,62 g/L), seguido o meio araçá (0,12 g/L) e pitanga (0,11 g/L), finalmente o meio jabuticaba (0,09 g/L). Em relação ao pH, o meio jabuticaba com 2.83 apresentou o pH mais ácido, seguido por meio pitanga 2.95, meio araçá 3.38 e finalmente HS de 5.80.

Tabela 4 - Caracterização química dos meios

Meio	Carbono Orgânico (g/L)	Nitrogênio total (g/L)	pH
HS	23,66	0,62	5.80
Jaboticaba	19,85	0,09	2.83
Pitanga	17,20	0,11	2.95
Araçá	14,67	0,12	3.38

Fonte: Autoria própria (2023)

A capacidade antioxidante dos meios HS e meios de polpa pura de jabuticaba, pitanga e araçá foi apresentada na Tabela 7. A capacidade antioxidante determinada pelo método Folin-Ciocalteu revelou que há diferença significativa ($p \leq 0,05$) do meio de polpa de jabuticaba, pitanga e araçá comparado ao meio HS. Assim, os meios de polpa pura de jabuticaba e pitanga com $0,32 \pm 0,01$ e $0,33$ mg/L de meio foram estatisticamente iguais, e o meio araçá $0,58 \pm 0,02$ mg/L apresentou maior atividade antioxidante. Por outro lado, o meio HS apresentou menor capacidade antioxidante comparado a todos os meios.

Tabela 5 - Quantidade de compostos fenólicos dos meios jabuticaba, pitanga, araçá e HS

Meio	Compostos fenólicos (mg/L)	FRAP (mmol Fe ²⁺ /L)	ABTS (mmol ET/L)
HS	$0,06 \pm 0,01^c$	$0,88 \pm 0,04^d$	$1,46 \pm 0,07^b$
Jabuticaba	$0,32 \pm 0,01^b$	$2,70 \pm 0,04^c$	$0,76 \pm 0,20^c$
Pitanga	$0,33 \pm 0,00^b$	$3,84 \pm 0,07^b$	$1,36 \pm 0,02^b$
Araçá	$0,58 \pm 0,02^a$	$9,81 \pm 0,07^a$	$2,23 \pm 0,05^a$

Os resultados são analisados como a média \pm desvio padrão. Análises realizadas em triplicata. Valores de cada coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Fonte: Autoria própria (2023)

A atividade antioxidante determinada pelo método de FRAP também mostrou diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os meios de polpa pura de jabuticaba, pitanga e araçá, comparado com o meio HS. Pelo método FRAP o meio de polpa de araçá com $9,10 \pm 0,07$ mmol Fe²⁺/L de meio apresentou maior capacidade antioxidante, seguido pelo meio de polpa de pitanga com $3,84 \pm 0,07$ mmol Fe²⁺/L de meio, meio de polpa de jabuticaba com $2,70 \pm 0,04$ mmol Fe²⁺/L de meio, e por último o meio HS com $0,88 \pm 0,01$ mmol Fe²⁺/L de meio.

Pelo método de ABTS para determinação da atividade antioxidante, o meio de polpa pura de araçá com $1,46 \pm 0,07$ mmol ET/L de meio apresentou maior atividade antioxidante, seguido pelo meio de polpa pura de pitanga $1,36 \pm 0,02$ e HS $1,46 \pm 0,07$ mmol ET/L de meio que foram estatisticamente iguais, e o meio de polpa pura de jabuticaba com $0,76 \pm 0,20$ mmol ET/L de meio que apresentou menor capacidade antioxidante.

Com base nestes resultados os meios com polpa de frutas apresentaram capacidade antioxidante pelo método Folin-Ciocalteu, FRAP e ABTS, apesar de todos os meios serem submetidos a um processo de esterilização em autoclave a 121 °C por 20 min. Vários parâmetros como a temperatura, oxigênio, iluminação, pH, forma de armazenamento, podem influenciar no processo de degradação dos antioxidantes (LING *et al.*, 2022).

De acordo com a caracterização dos meios de polpa de frutas, jabuticaba e pitanga mostraram maior conteúdo de carbono total com 19,85 g/L e 17,20 g/L, respectivamente (Tabela 4). Com base nesses resultados pode se dizer que a fonte de carbono exerce grande influência nessa bactéria, favorecendo a produção de NCB. Mesmo que, o conteúdo de nitrogênio tenha sido baixo nos meios de polpa de pitanga e jabuticaba, isso não interferiu significativamente na produção de membranas de NCB. Em vista disso, a grande maioria dos estudos encontrados na literatura focam na exploração principalmente da fonte de carbono utilizando extrato de manga (CALDERÓN-TOLEDO *et al.*, 2021), casca de coco (LIU; WANG; SUN *et al.*, 2021) ou resíduos de casca de laranja (TSOUKO *et al.*, (2020). Wang *et al.* (2018), avaliou o rendimento de NCB substituindo a glicose por acetato, frutose, glicerol, lactose, manitol e sacarose (WANG *et al.*, 2018). Outro estudo avaliou as fontes de carbono a partir da indústria açucareira, como o suco de cana de açúcar, suco clarificado e suco de coco para produção de NCB (JAROENNONTHASIT; LAM; SUKYAI, 2021).

Por outro lado, o pH dos meios de polpa de jabuticaba e pitanga mostrou maior grau de acidez comparados ao meio HS. O pH dos meios também não mostrou interferência na produção de NCB. Isso pode ser devido as características fisiológicas da bactéria *Komagateibacter xylinus*, já que é uma bactéria ácido acética que pode crescer em pH baixo (LAVASANI *et al.*, 2019). É importante destacar que neste estudo não foi necessário ajustar o pH do meio, o pH dos meios de polpa de frutas foi mantido e apresentou um bom rendimento.

Como observado, houve baixa produção de NCB quando testado as condições com araçá. A condição 2 referentes a polpa pura (100%) com araçá, o peso úmido e espessura da membrana foi de 2,42 g e 0,52 mm respectivamente, valores bem inferiores as outras frutas. As outras condições com araçá substituindo apenas um dos componentes do meio HS apresentou uma melhor produção de membranas. Contudo, no geral as membranas de NCB produzidas nas cinco diferentes condições com araçá, apresentaram uma menor produção comparado as mesmas condições do meio de jabuticaba e pitanga.

Os resultados mostram que o meio a partir de polpa de araçá poderia estar impedindo a síntese de NCB. Isso pode ser explicado pela atividade antimicrobiana que possuem os compostos fenólicos. Medina *et al.* (2011) evidenciou em seu estudo que o extrato de araçá em

água tem potencial antimicrobiano em bactérias patogênicas devido a presença de compostos fenólicos (MEDINA *et al.*, 2011). O maior conteúdo de compostos fenólicos encontrado no meio de polpa de fruta de araçá pode ser uma hipótese para a baixa síntese de NCB. O processo de despolpação em frutas de araçá foi mais difícil, já que apresentam muitas sementes e acabaram fazendo parte da polpa final para a produção do meio.

5.4 Rendimento e estimativa de custo

A análise em relação ao rendimento foi realizada considerando-se o peso seco das membranas de NCB-H, NCB-J, NCB-P e NCB-A liofilizadas produzidas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio, incubados por 15 dias (Figura 22). Assim, de acordo como peso seco das membranas o rendimento de NCB-H foi de $5,96 \text{ g/L} \pm 0,07$, seguida de NCB-P $4,33 \text{ g/L} \pm 0,01$, NCB-J $4,09 \text{ g/L} \pm 0,04$ e NCB-A $0,29 \text{ g/L}$. O rendimento de NCB-H apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$) frente ao rendimento de NCB-P e NCB-J.

Figura 22 - Membrana de NCB liofilizada



Fonte: A autoria própria (2023)

O rendimento em termos de peso seco das membranas de NCB-J e NCB-P obtida nesse estudo foi de grande relevância comparado a estudos já relatados na literatura. Ogrizek *et al.* (2021) utilizaram extrato de bagaço de uva vermelha e branca, incubadas por 14 dias e tiveram o máximo rendimento a partir de extrato de bagaço de uva vermelha, substituindo a fonte de carbono (glicose) em meio HS ($1,25 \pm 0,09 \text{ g/L}$). O teste realizado apenas com o extrato de bagaço de uva vermelha o rendimento foi inferior chegando a $0,67 \pm 0,09 \text{ g/L}$. Para o extrato de bagaço de uva branca os rendimentos também foram bem inferiores comparado as membranas obtidas nesse estudo.

Para produção de NCB também são testados outros componentes diferentes do meio HS, como o trabalho descrito por Souza *et al.* (2020) que utilizou suco de caju com melação de soja e obteve-se um rendimento de 4,50 g/L, em 7 dias (SOUZA *et al.*, 2020). Já o trabalho de Kurosumi *et al.* (2009) testou várias frutas, e o rendimento de peso seco de membranas produzidas em meio com laranja foi de (1,90 g/L), abacaxi (0,50 g/L), maçã (0,30 g/L), pera japonesa (0,50 g/L) e uva (0,40 g/L), em 14 dias de incubação (KUROSUMI *et al.*, 2009). O trabalho de Hungund *et al.* (2013) produziu membranas de NCB em suco de melão com 2,0 % de peptona, 0,5 % extrato de levedura, 0,115% de ácido cítrico e obteve-se um rendimento em peso seco de 8,08 g/L, em 14 dias (HUNGUND *et al.*, 2013). A maioria dos trabalhos que utilizam frutas como meio de cultura alternativo para produção de NCB, só substituem um dos componentes do meio HS (CALDERÓN-TOLEDO *et al.*, 2021; HUNGUND *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2020). Com base na literatura não foram relatados estudos que utilizem como meio de cultivo apenas o uso de polpa pura de frutas nativas para obtenção de NCB com o rendimento obtido neste trabalho.

Para uma análise de custos de produção de NCB em escala laboratorial fez-se uma estimativa de valores. A Tabela 6 mostra a estimativa de custo de produção e rendimento em peso úmido de membranas de NCB em g/L nas seis condições testadas. Verificou-se que produzir membranas de NCB nos meios contendo apenas polpa pura de fruta de jaboticaba ou pitanga (condição 2), ou nas condições 3,4,5,6, é mais viável economicamente do que produzir no meio tradicional HS (condição 1).

A partir do meio polpa pura de jaboticaba é possível produzir 373 g/L de NCB-J em peso úmido e 381 g/L do meio de polpa pura de pitanga (NCB-P). Uma estimativa média de custo desses dois meios (condição 2) é de R\$ 13,50 e 18,02. A produção com o meio tradicional HS obtém-se um bom rendimento em torno de 400 g/L de peso úmido de membranas NCB-H (condição 1), porém o preço de produção estimado de um litro de meio é R\$ 25,00. Considerando-se apenas o custo de reagentes e não levando-se em consideração o custo de água destilada e a preparação.

Tabela 6 - Estimativa de custo de produção e rendimento em peso úmido de membranas de NCB/ L de meios HS, HS modificado e meio polpa pura

(continua)

Componentes	Custo por Kg (R\$)	Fornecedor de origem	Meio g/L	Custo médio (R\$)	Rendimento (g/L)			
					NCB-H	NCB-J	NCB-P	R\$/L
HS 100% (condição 1)								
Glicose	558,00	Millipore	20,00	11,16				
Extrato de levedura	1.130,00	Sigma-Aldrich	5,00	5,65				
Peptona	1.357,00	Sigma-Aldrich	5,00	6,79	403,00	-	-	25,01
Fosfato Dissódico	357,00	Sigma-Aldrich	2,75	0,98				
Ácido cítrico	373,00	Sigma-Aldrich	1,15	0,43				
Meios polpa de fruta 100% (condição 2)								
Jabuticaba	27,00	CEAGESP	500,00	13,50	-	373,00		13,50
Pitanga	36,05	HORTIFRUT NET	500,00	18,02	-	-	381,00	18,02
HS 50% + meio polpa de fruta 50% v/v (condição 3)								
Glicose	558,00	Millipore	20,00	5,80				
Extrato de levedura	1.130,00	Sigma-Aldrich	2,50	2,82				
Peptona	1.357,00	Sigma-Aldrich	2,50	3,40				
Fosfato Dissódico	357,00	Sigma-Aldrich	1,38	0,49	-	248,50	327,00	
Ácido cítrico	373,00	Sigma-Aldrich	0,58	0,21				
Meio polpa jabuticaba	30,00	CEAGESP	250,00	6,75				19,47
Meios polpa pitanga	36,05	HORTIFRUT NET	250,00	9,01				21,82
HS modificado (sem glicose) 50% + meio polpa de fruta 50% v/v (condição 4)								
Extrato de levedura	1.130,00	Sigma-Aldrich	2,50	2,82				
Peptona	1.357,00	Sigma-Aldrich	2,50	3,40				
Fosfato Dissódico	357,00	Sigma-Aldrich	1,38	0,49	-	350,00	203,30	
Ácido cítrico	373,00	Sigma-Aldrich	0,58	0,21				
Meio polpa de jabuticaba	30,00	CEAGESP	250,00	6,75				13,67
Meios polpa de pitanga	36,05	HORTIFRUT NET	250,00	9,01				15,93
HS modificado (sem extrato de levedura e peptona) 50% + meio polpa de fruta 50% v/v (condição 5)								
Glicose	558,00	Millipore	10,00	5,58				
Fosfato Dissódico	357,00	Sigma-Aldrich	1,38	0,49				
Ácido cítrico	373,00	Sigma-Aldrich	0,58	0,21	-	335,50	301,80	
Meio polpa de jabuticaba	30,00	CEAGESP	250,00	6,75				13,08
Meio polpa de pitanga	36,05	HORTIFRUT NET	250,00	9,01				15,29

Tabela 6 - Estimativa de custo de produção e rendimento em peso úmido de membranas de NCB/ L de meios HS, HS modificado e meio polpa pura

Componentes	Custo por Kg (R\$)	Fornecedor de origem	Meio g/L	Custo médio (R\$)	Rendimento (g/L)			R\$/L
					NCB-H	NCB-J	NCB-P	
HS modificado (sem ácido cítrico) 50% + meio polpa de fruta 50% v/v (condição 6)								
Glicose	558,00	Millipore	10,00	5,58				
Extrato de levedura	1.130,00	Sigma-Aldrich	2,50	2,82				
Peptona	1.357,00	Sigma-Aldrich	2,50	3,40				
Fosfato Dissódico	357,00	Sigma-Aldrich	1,38	0,49	-	400,00	220,18	
Meio polpa de jabuticaba	30,00	CEAGESP	250,00	6,75				19,04
Meio polpa de pitanga	36,05	HORTIFRUT NET	250,00	9,01				21,30

Fonte: Autoria própria (2023)

Por outro lado, o meio HS modificado (sem ácido cítrico) 50% (v/v) + meio polpa de jabuticaba 50% (v/v) (condição 6), resultou em membranas de NCB com bom rendimento 400 g/L, porém apenas o ácido cítrico foi retirado do meio, resultando em um meio de cultura com uma estimativa de custo de R\$ 19,04. As membranas de NCB no meio HS 50% + meio polpa de jabuticaba 50% (v/v) (condição 3) apresentou um rendimento de 248,50 g/L, com uma estimativa de custo de R\$ 19,47. Já as membranas produzidas na condição 4 e condição 5 mostraram um rendimento de 350 g/L e 335,50 g/L e um custo de produção de R\$ 13,67 e R\$ 13,08, respectivamente.

Os meios a partir da pitanga com HS 50% + meio polpa de pitanga 50% (v/v) (condição 3) apresentou um rendimento considerável de membranas de NCB 327 g/L, mas com uma estimativa de custo de R\$ 21,22. As membranas produzidas nos meios HS modificado (sem glicose) 50% + meio polpa de pitanga 50% (v/v) (condição 4) e HS modificado (sem extrato de levedura e peptona) 50% + meio polpa de pitanga 50% (v/v) (condição 5), indicam uma estimativa de custo médio de R\$ 15,93 e R\$ 15,29, respectivamente, mas com um rendimento de 203,30 g/L e 301,80 g/L. O meio HS modificado (sem ácido cítrico) 50% + meio polpa de pitanga 50% (v/v) (condição 6), apresentou um rendimento de 220,18 g/L com uma estimativa de R\$ 21,30.

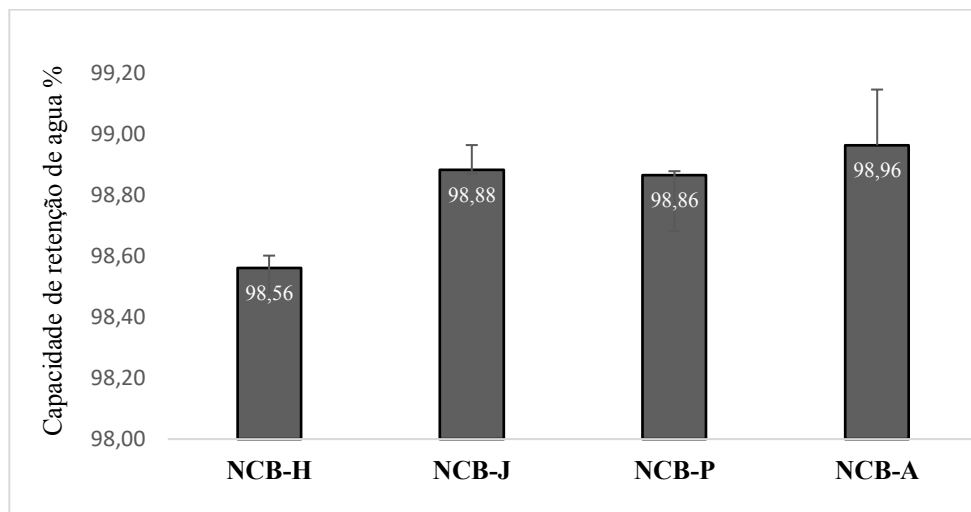
De maneira geral, verificou-se que a possibilidade de produção de NCB a partir do uso da polpa pura das frutas sem a necessidade de adição de nenhum componente químico do meio tradicional é uma excelente estratégia, em termos de custos, rendimento e potencial de inovação.

5.5 Caracterização das membranas de NCB

5.5.1 Capacidade de retenção de água e porosidade

As membranas NCB-A apresentaram maior capacidade de retenção de água $98,96 \pm 0,18\%$. As membranas NCB-J tiveram $98,88 \pm 0,08\%$, seguido da NCB-P de $98,86 \pm 0,01\%$. Já as membranas no meio tradicional HS (NCB-H) apresentaram uma capacidade de retenção de água menor, de $98,56 \pm 0,04\%$ (Gráfico 1). Houve uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) da capacidade de retenção de água em membranas de NCB-J, NCB-P e NCB-A em relação as membranas NCB-H.

Gráfico 1 – Capacidade de retenção de água de membranas de NCB produzidas em meio HS (NCB-H), jabuticaba (NCB-J), pitanga (NCB-P) e araçá (NCB-A)



Fonte: Autoria própria (2023)

Os resultados confirmam que as membranas de NCB-H, NCB-J, NCB-P e NCB-A possuem uma elevada capacidade de retenção de água com valores em torno de 98%. Os resultados estão conforme descritos no trabalho de Galdino *et al.* (2020) em membranas de NCB produzidas em HS em 10 dias, mantiveram essa porcentagem de capacidade de retenção de água (GALDINO *et al.*, 2020). A alta capacidade de retenção de água é uma das características interessantes das membranas de NCB, proporcionado pelos grupos hidroxila intramoleculares e intermoleculares, assim como também a porosidade (PARK; JUNG; KHAN, 2009). Essa propriedade tem permitido sua ampla aplicação, tanto na biomedicina (WAHID *et al.*, 2021a), cosméticos (BILGI *et al.*, 2021), eletrônicos (PODDAR; DIKSHIT, 2021) entre outros.

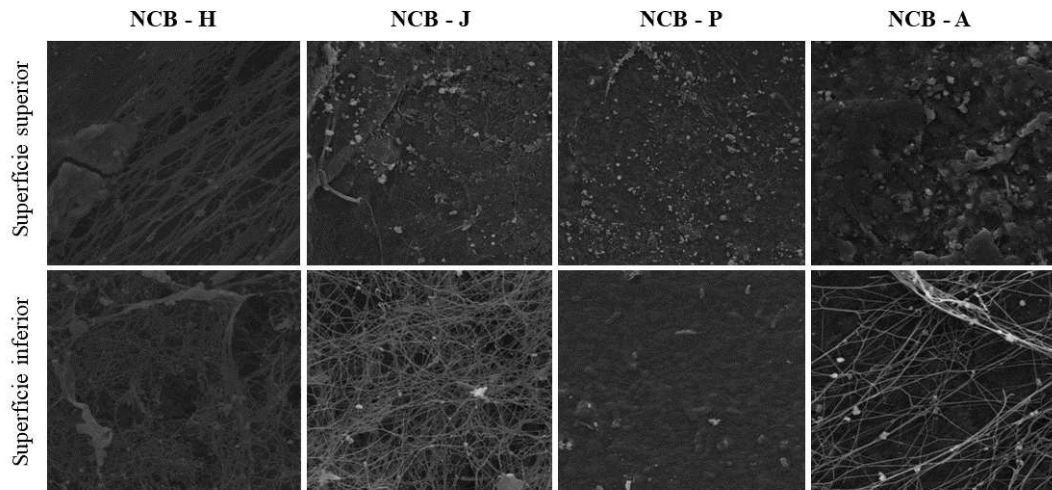
A capacidade de retenção de água é proporcional a porosidade das membranas de NCB. Assim, as membranas de NCB-A apresentaram maior porosidade $99,41 \pm 2,15 \%$, seguida pelas membranas NCB-J com $75,03 \pm 1,7\%$, NCB-P com $73,72 \pm 1,01\%$, e de NCB-H com $73,36 \pm 0,38\%$. Com base nesses resultados todas as membranas apresentaram alta porcentagem de porosidade entre 73% e 99%. As membranas de NCB-A apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) comparada as membranas de NCB-J, NCB-P e NCB-H. A alta porosidade em membranas de NCB é outra característica importante, já que permite a incorporação de moléculas que proporcionem o potencial para desenvolver novos produtos de NCB (PENG *et al.*, 2016). Além disso a porosidade permite o crescimento celular, o que tem chamado muito atenção a área de engenharia de tecidos (BOUHLOULI *et al.*, 2021).

A porosidade das membranas de NCB pode ser afetada de acordo com os meios de cultura, ou pela adição de aditivos ao meio (CIELECKA *et al.*, 2021). A espessura das membranas também pode afetar a porosidade. Nesse estudo optou-se por uma fermentação de 15 dias o que resulta em membranas com uma maior espessura e conseqüentemente uma menor porosidade. O objetivo aqui foi avaliar em termos de rendimento de produção visto que se avaliou meios alternativos de produção. Assim as membranas de NCB-A produzidas a partir do araquá apresentaram uma maior porosidade, visto que sua produção não foi efetiva e resultou em membranas mais finas. A alta porosidade em NCB-A pode ser explicado pela matriz nanofibrilar, que quanto menos espessa a membrana de NCB, menor é a concentração das nanofibrilas (CACICEDO *et al.*, 2016). O trabalho de Galdino *et al.* (2020) determinou que quanto maior é o tempo de fermentação as membranas de NCB mostram-se mais espessas e menos porosas (GALDINO *et al.* (2020).

5.5.2 Morfologia da superfície superior e inferior de NCB-H, NCB-J, NCB-P e NCB-A

A avaliação da morfologia das membranas de NCB-H, NCB-J, NCB-P e NCB-A foram analisados com a técnica de Microscopia eletrônica de varredura com ampliação de imagens de 10.000x (Figura 23). A análise foi realizada em membranas liofilizadas da superfície inferior e superfície superior. As membranas de NCB são produzidos no meio de cultura na interface ar/liquido, assim uma das superfícies permanece em contato com ar (superfície superior), e a outra parte permanece em contato com o meio liquido (superfície inferior) (DONINI *et al.*, 2010).

Figura 23 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de ampliação de 10.000x em membranas de NCB-H, NCB-J, NCB-P e NCB-A



Fonte: Autorial própria (2023)

A visualização das membranas de NCB no MEV mostra a superfície superior mais densa e a superfície inferior mais porosa (TURECK *et al.*, 202). A superfície inferior das membranas NCB-J e NCB-A demonstra a morfologia estruturada reticulada nanofibrilar (LIU; WANG; SUN *et al.*, 2021). Por outro lado, a superfície inferior de membranas de NCB produzidas a partir da pitanga se apresenta mais densa (TURECK *et al.*, 2021). A visualização das nanofibrilas de membranas de NCB-H e NCB-P não é tão clara, comparada com as membranas de NCB-A e NCB-J. A espessura das membranas produzidas nesses meios pode ter interferido na observação das nanofibrilas, já que a matriz fica mais concentrada (ZHAO *et al.*, 2018).

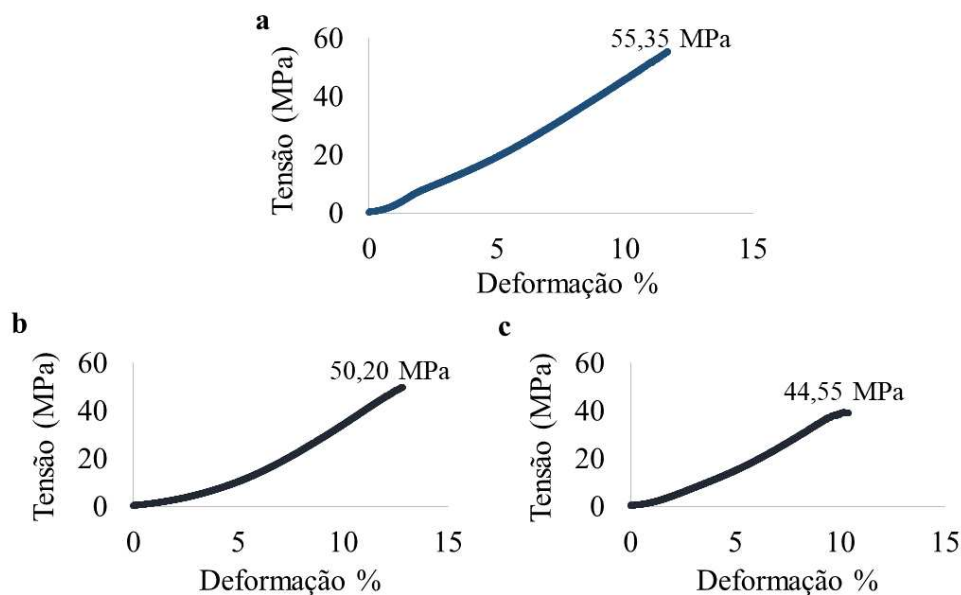
As micrografias de MEV estão de acordo com a análise da capacidade de retenção de água, porosidade e espessura. As membranas NCB-A apresentaram menor rendimento, o que permitiu uma boa capacidade de retenção de água e alta porosidade. Assim também, foi possível visualizar na superfície inferior da membrana, com as nanofibrilas reticuladas. Já no caso das membranas de NCB-P observou-se um maior rendimento, boa capacidade de retenção de água, mas, menor porosidade, o que se verifica nas superfícies mais densas na superfície superior e inferior do MEV.

5.5.2 Propriedades mecânicas

As membranas de NCB úmidas, foram avaliadas para determinar a resistência a tração. Assim, as membranas de NCB-H apresentaram resistência a tração de 55,35 MPa, NCB-J de 50,20 MPa e NCB-P de 44,55 MPa, conforme verificado no Gráfico 2. A partir da resistência

a tração foi calculado o módulo de Young, que se refere à capacidade de um material a ser deformado sob a aplicação de uma força externa e retornar à sua forma original quando a força é removida. As membranas de NCB-H apresentaram elasticidade de 3,05 MPa, as membranas de NCB-P 1,64 MPa e membranas de NCB-J 1,09 MPa. As membranas NCB-J e NCB-P não apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) frente a NCB-H, tanto na resistência mecânica quanto na elasticidade. Os resultados obtidos mostram valores inferiores comparado com a literatura. A forma como as membranas de NCB foram tratadas para a análise pode ter influenciado nos resultados. Já que as membranas produzidas no erlenmeyer foram cortadas com bisturi no formato retangular que é o recomendável para o teste de tensão-deformação.

Gráfico 2 - Resistência mecânica de membranas de a) NCB-H b) NCB-J c) NCB-P



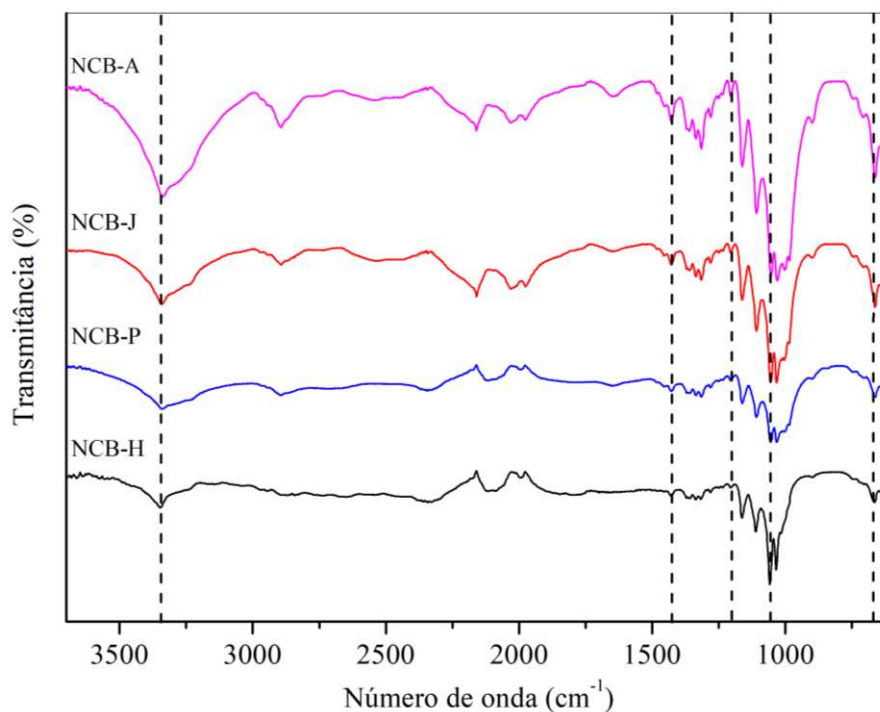
Fonte: Autoria própria (2023)

A resistência mecânica e elasticidade são propriedades importantes da NCB, que podem ser afetadas pelo meio de cultivo, cepa bacteriana e aditivos no meio de cultivo (CHEN *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2022). Na área da engenharia de tecidos, é importante que as membranas de NCB sejam suficientemente resistentes e elásticas para suportar tensões mecânicas durante o crescimento celular (BOUHLOULI *et al.*, 2021). Assim também, a elasticidade e resistência mecânica das membranas de NCB na área de embalagens é fundamental, já que estas propriedades garantem a integridade estrutural e a durabilidade dos produtos (AMORIM *et al.*, 2022).

5.5.3 Análise qualitativa dos grupos funcionais em membranas de NCB

No Gráfico 3 estão dispostos os espectros das membranas de NCB-H, NCB-J, NCB-P e NCB-A. As bandas características de membrana de NCB foram encontradas em todas as membranas NCB-H, NCB-J, NCB-P e NCB-A, descritas na Tabela 9. Estes resultados mostram que, as ligações químicas apresentadas nas membranas de NCB em todas as condições são similares. Os meios de polpa de frutas de jabuticaba, araçá e pitanga não interferiu na estrutura molecular das NCB obtidas, visto que não apresentou nenhum pico adicional. Não foram encontrados na literatura espectros de FTIR de NCB obtidos a partir do uso da polpa dessas frutas como meio de cultivo para comparação.

Gráfico 3 - Atribuição das bandas dos espectros de FTIR de membranas de NCB-H, NCB-J, NCB-P, NCB-A



Fonte: Autoria própria (2023)

As principais bandas de NCB destacadas nos espectros foram, uma banda intensa na região $3346,4 \text{ cm}^{-1}$ atribuída ao estiramento (O-H) celulose I_a , um pico agudo em $1059,3 \text{ cm}^{-1}$ e $667,3 \text{ cm}^{-1}$, atribuída a ligações (C-O) de (C-OH) de carboidrato e vibração fora do plano, e nas regiões $1161,1 \text{ cm}^{-1}$ e $1427,1 \text{ cm}^{-1}$ atribuídas ao estiramento assimétrico (C-O-C) deformação CH e ligações (HCH, OCH) no plano (Quadro 5).

Quadro 5 - Atribuição das bandas dos espectros FTIR de membranas de NCB

Tipo de ligação	Número de onda cm⁻¹ em membranas de NCB	Referência
Ligação (C-OH) vibração for do plano	667,3	(OH <i>et al.</i> , 2005)
Ligação(C-O) de (C-OH) de carboidrato	1059,3	(MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008)
Estiramento assimétrico (C-O-C) deformação CH	1161,1	(KAČURÁKOVÁ <i>et al.</i> , 2002)
Ligação (HCH, OCH), no plano	1427,1	(OH <i>et al.</i> , 2005)
Estiramento (O-H) celulose I _a	3346,4	(YAMAMOTO; HORII; HIRAI, 1996)

Fonte: A autoria própria (2023)

5.6 Capacidade antioxidante de membranas de NCB

Os resultados obtidos mostram que as membranas NCB-H, NCB-J, NCB-P e NCB-A não apresentaram atividade antioxidante pelo método de DPPH via QUENCHER. Com o ensaio de FRAP via QUENCHER as membranas de NCB-H, NCB-J, NCB-P e NCB-A apresentaram uma capacidade antioxidante, porém não houve diferença estatística comparando as membranas de NCB-J, NCB-P e NCB-A com a membrana produzida no meio tradicional (NCB-H) (Tabela 7). Ou seja, as modificações dos meios com polpa de fruta não mostraram potencial para incorporação de bioativos.

Tabela 7 - Capacidade antioxidante de membranas de NCB liofilizadas

Membranas de NCB	FRAP (mmol ET/g)	DPPH (mmol ET/g)
NCB-H	12,65 ± 1,84	-
NCB-J	17,06 ± 3,15	-
NCB-P	11,91 ± 0,59	-
NCB-A	13,53 ± 2,62	-

Fonte: A autoria própria (2023)

Os resultados referentes a atividade antioxidante das membranas já eram esperados, uma vez que a abordagem adotada nesse estudo é o método *in situ*. Ou seja, que durante a síntese das membranas de NCB pudesse acontecer a incorporação dos compostos bioativos dos meios a partir dos meios polpa de fruta. Mas, após a produção da NCB as membranas são submetidas a um processo de purificação/esterilização. Esses tratamentos podem causar uma perda considerável de compostos fenólicos e diminuir a ação antioxidante. Assim, se o objetivo é a incorporação de compostos fenólicos provenientes de frutas na NCB, sua modificação pelo

método *ex situ* é a mais recomendada, pois evita a perda desses compostos e de suas propriedades.

Para estudos futuros sugere-se vincular as duas estratégias, através da abordagem *in situ* aqui adotada, com a despolpação das frutas, que garantiu excelentes rendimentos com o meio de polpa pura. Ademais, utilizar as cascas/sementes que apresentam um alto teor de compostos fenólicos com atividade antioxidantes além de minerais, e seguir com uma funcionalização *ex-situ* a partir de um extrato das cascas/sementes das frutas para obtenção de nanocelulose com propriedades funcionais e antioxidantes. A produção de NCB também pode ser otimizada através de ajuste de parâmetros como pH e componentes do meio, além de um escalonamento.

6 CONCLUSÃO

As frutas avaliadas nesse trabalho apresentam valor nutricional, potencial antioxidante, porém a sua perecibilidade limita o seu uso comercial, não tendo um tempo hábil de prateleira. Até o presente momento, não há registros do uso de polpa pura dessas frutas sem a adição de outro componente no meio de cultivo para produção de NCB com o rendimento obtido no processo. Ademais, a abordagem adotada para produzir as membranas de NCB a partir de um meio de cultivo com polpa de frutas manteve as propriedades físico-químicas da NCB, com um alto rendimento e um menor custo de produção.

Assim nesse estudo foi possível desenvolver uma nova abordagem de processo de produção *in situ* utilizando como fonte apenas a polpa da fruta, sem cascas e sementes, favorecendo o crescimento bacteriano e a síntese da nanocelulose bacteriana com rendimento significativo ao meio tradicional HS.

REFERÊNCIAS

- ABBASILIASI, S. et al. Effect of Medium Composition and Culture Condition on the Production of Bacteriocin-like Inhibitory Substances (BLIS) by *Lactobacillus paracasei* LA07, a Strain Isolated from Budu. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 25, n. 4, p. 2652–2657, 2011.
- ABOL-FOTOUH, D. et al. Bacterial Nanocellulose from Agro-industrial Wastes: Low-cost and Enhanced Production by *Komagataeibacter Saccharivorans* MD1. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020.
- AFTAB, M. N, et al. Different pretreatment methods of lignocellulosic biomass for use in biofuel production. *In*: ABOMOHRA, A. **Biomass for Bioenergy - Recent Trends and Future Challenges**. IntechOpen, 2016. v. 1, cap. 2, p. 1 – 13.
- ALEMAM, A. Isolation and Characterization of Cellulose Nano Fiber Producing Bacterial Strain From Fermented Fruits. **Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, n. 2, p. 152–163, 2020.
- ALGAR, C. et al. Pineapple Agroindustrial Residues for the Production of High Value Bacterial Cellulose with Different Morphologies. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 1, p. 1–8, 2015.
- AMORIM, L. F. A. et al. Antimicrobial Food Packaging Based on Prodigiosin-Incorporated Double-Layered Bacterial Cellulose and Chitosan Composites. **Polymers**, v. 14, n. 2, 2022.
- ANWAR, Y. et al. Ex-situ Synthesis of Bacterial Cellulose-copper Oxide Nanoparticles for Effective Chemical and Biological Properties. **Desalination and Water Treatment**, v. 197, p. 182–190, 2020.
- ARIS, F. A. F. et al. Interaction of Silver Sulfadiazine with Bacterial Cellulose via ex-situ Modification Method as an Alternative Diabetic Wound Healing. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnolog**, v. 21, n. August, p. 4–10, 2019.
- ARORA, M. Cell Culture Media: A Review. **Materials and Methods**, v. 3, p. 1–29, 2013.
- AZEREDO, H. M. et al. Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 3, n. February, 2019.
- BANDYOPADHYAY, S.; SAHA, N.; SAHA, P. Characterization of Bacterial Cellulose Produced using Media Containing Waste Apple Juice. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 649–657, 2018.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: the FRAP Assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.
- BEVERLY, M.; GUIRARD. *Microbial Nutrition*1., p. 247–278, 1958.
- BEZERRA, J. E. F.; LIRA-JUNIOR, J. S.; SILVA-JUNIOR, J. F. Eugenia Uniflora – Pitanga. *In*: CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial – Plantas para o Futuro – Região Nordeste**. 1311 p. 2018a

BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; SILVA, J. F.; FRAZON, R. C.; SILVA, J. A. S.; CAMPOS, L. Z. O.; PROENÇA, C. E. B. *Psidium* spp. Araçá. *In*: CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial – Plantas para o Futuro – Região Nordeste**. 296 p. 2018b.

BILGI, E. et al. E. Bacterial Cellulose Based Facial Mask with Antioxidant Property and High Moisturizing Capacity. **Cellulose**, v. 28, n. 16, p. 10399–10414, 2021.

BIOMATERIALS for Tissue engineering and regenerative medicine. *In*: **ENCYCLOPEDIA of Biomedical Engineering**. Oxford: Elsevier, 2019, v. 1, p. 462-482.

BIORENDER. Disponível em:

<https://app.biorender.com/illustrations/632c65af35c743d469ea7a5f>. Acesso em: 22 de setembro de 2022.

BLANC, J. G. L. Introductory chapter: vitamin C. *In*: BLANC, J. G. L. **Vitamin C: - an Update on Current Uses and Functions**. IntechOpen. 2019. cap 1, p. 1-3.

BLANCO, A.; MIRANDA, R.; MONTE, M. C. Extending the Limits of Paper Recycling: Improvements Along the Paper Value Chain. **Forest Systems**, v. 22, n. 3, p. 471–483, 2013.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199–1200, 1958.

BOUHLOULI, M. et al. Applications of Bacterial Cellulose as a Natural Polymer in Tissue Engineering. **ASAIJ Journal**, p. 709–720, 2021.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.-E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRANDES, R. et al. Preparation and Characterization of Bacterial Cellulose/Tio₂ Hydrogel Nanocomposite. **Journal of Nano Research**, v. 43, p. 73–80, 2016.

BRIDSON, E. Y.; BRECKER, A. Design and formulation of microbial culture media. *In*: NORRIS, J.R; RIBBONS, D.W. **Methods in Microbiology**, Academic Press. 1970, v. 3, cap 3, p. 229–295.

BRODEUR, G. et al. Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A review. **Enzyme Research**, v. 2011, n. 1, 2011.

BROWN, A. J. XLIII.—On an Acetic Ferment which Forms Cellulose. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 49, n. 0, p. 432–439, 1886.

CACICEDO, M. L. et al. Progress in Bacterial Cellulose Matrices for Biotechnological Applications. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 172–180, 2016.

CALDERÓN-TOLEDO, S. et al. Isolation and Partial Characterization of *Komagataeibacter* sp. SU12 and Optimization of Bacterial Cellulose Production Using *Mangifera Indica* extracts. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 97, n. 6, p. 1482–1493, 2022.

- CAMPANO, C. et al. In situ Production of Bacterial Cellulose to Economically Improve Recycled Paper Properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1532–1541, 2018.
- CANALE-PAROLA, E.; WOLFE, R. S. Synthesis of cellulose by *Sarcina ventriculi*. In: NILSON, L.; RICHARDSON, R.; SUZUKI, T. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 1964. v. 82, n. 2, p. 403–405.
- CANVAS. Disponível em: <https://www.canva.com/>. Acesso em: 22 de setembro de 2022.
- CAO, Y.; LU, S.; YANG, Y. Production of Bacterial Cellulose from Byproduct of Citrus Juice Processing (citrus pulp) by *Gluconacetobacter hansenii*. **Cellulose**, v. 25, n. 12, p. 6977–6988, 2018.
- CAZÓN, P.; VÁZQUEZ, M. Improving Bacterial Cellulose Films by ex-situ and in-situ Modifications: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 113, n. December 2020, 2021.
- CHAN, E. C. S. Microbial nutrition and basic metabolism. In: MARA, D.; HORAN, N. **Handbook of Water and Wastewater Microbiology**. London: Academic Press, 2003, cap. 1, p. 3–33.
- CHAWLA, P. R. et al. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107–124, 2009.
- CHENG, K. C.; CATCHMARK, J. M.; DEMIRCI, A. Effect of Different Additives on Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* and Analysis of Material Property. **Cellulose**, v. 16, n. 6, p. 1033–1045, 2009.
- CHENG, Z. et al. **Preparation Method of Edible Bacterial Cellulose/dietary Fiber**. Titular: Univ Tianjin Science & Tech. 2013008768. Depósito: 12 oct. 2018. Publicação: 25 jan. 2019.
- CHEN, L. et al. Biotransformation of Wheat Straw to Bacterial Cellulose and its Mechanism. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 464–468, 2013.
- CHEN, S. et al. **Method Producing Edible Colorful Bacterial Cellulose with Abandoned Fruit Juice or Pomace**. Titular: ShangHai YiFang Rural Technology Holdings Co.,Ltd. Donghua University. CN101805765A. Depositado: 01 abr. 2010. Concedido: 30 oct. 2013.
- CHEN, Y. et al. Bacterial Cellulose/gelatin Composites: In situ Preparation and Glutaraldehyde Treatment. **Cellulose**, v. 21, n. 4, p. 2679–2693, 2014.
- CIELECKA, I. et al. Highly stretchable bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter hansenii* S11. **Polymers**, v. 13, n. 24, p. 4455, 2021.
- CORADIN, L.; SIMININSKI A.; REIS A. et al. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial: Plantas para o Futuro - Região Sul**. Brasília, 2011. 934 p.
- CZAJA, W.; ROMANOVICZ, D.; BROWN, R. M. Structural Investigations of Microbial Cellulose Produced in Stationary and Agitated Culture. **Cellulose**, v. 11, n. 3/4, p. 403–411, 2004.

DA SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A Promising and Abundant Carbon Source for Industrial Microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 30–39, 2009.

DA SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de Vinhaça e Impactos nas Propriedades do Solo e Lençol Freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108–114, 2007.

DEINEMA, M. H.; ZEVENHUIZEN, L. P. T. M. Formation of Cellulose Fibrils by Gram-negative Bacteria and their Role in Bacterial Flocculation. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 78, n. 1, p. 42–57, 1971.

DE LIMA FONTES, M. et al. Effect of in situ Modification of Bacterial Cellulose with Carboxymethylcellulose on its Nano/microstructure and Methotrexate Release Properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, p. 126–134, 2018.

DE SOUZA, S. S. et al. Nanocellulose Biosynthesis by *Komagataeibacter hansenii* in a Defined Minimal Culture Medium. **Cellulose**, v. 26, n. 3, p. 1641–1655, 2019.

DHAR, P.; ETULA, J.; BANKAR, S. B. In Situ Bioprocessing of Bacterial Cellulose with Graphene: Percolation Network Formation, Kinetic Analysis with Physicochemical and Structural Properties Assessment. **ACS Applied BioMaterials**, v. 2, n. 9, p. 4052–4066, 2019.

DING, Z.; LIU, X.; LIU, Y.; ZHANG, L. Enhancing the Compatibility, Hydrophilicity and Mechanical Properties of Polysulfone Ultrafiltration Membranes with Lignocellulose Nanofibrils. **Polymers**, v. 8, n. 10, 2016.

DIOTALLEVI, F. **The Physics of Cellulose Biosynthesis: Polymerization and Self-Organization, from Plants to Bacteria**. 2007. 136 f. Thesis (Graduate Experimental Plant Sciences). Wageningen University and Research, 2007.

DO NASCIMENTO, Helenise Almeida. **Produção de Biopolímero de Celulose Bacteriana Aditivado com Antioxidante Natural**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, p. 115. 2022.

DOLT, M. L. Simple Synthetic Media for the Growth of *B. coli* and for its Isolation from Water. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n. 5, p. 616-626, 1908.

DONGMEI, L.; HUI, W.; SHUJUAN, Y. **Method for fermented-producing bacteria cellulose with pineapple peel juice by two-step method**. Titular: South China University of Technology SCUT. CN101671708A. Depositado: 19 oct. 2009. Concedido: 09 mai. 2012.

DONINI, Í. A. N. et al. Biossíntese e Recentes Avanços na Produção de Celulose Bacteriana. **Journal of Infectious Diseases**, v. 35, n. 4, p. 165- 178, 2010.

DUARTE, E. B. et al. **Celulose Bacteriana: Propriedades, Meios Fermentativos e Aplicações**. Embrapa Agroindústria Tropical-Documentos (INFOTECA-E), 2019. Documento 186, p. 1-37.

EDWIGES, T. et al. Influence of Chemical Composition on Biochemical Methane Potential of Fruit and Vegetable Waste. **Waste Management**, v. 71, p. 618–625, 2018.

- EL-SAIED, H.; BASTA, A. H.; GOBRAN, R. H. Research Progress in Friendly Environmental Technology for the Production of Cellulose Products (Bacterial Cellulose and its Application). **Polymer - Plastics Technology and Engineering**, v. 43, n. 3, p. 797–820, 2004.
- KIZILTAS, E. E.; KIZILTAS, A.; GARDNER, D. J. Synthesis of Bacterial Cellulose Using hot Water Extracted Wood Sugars. **Carbohydrate Polymers**, v. 124, p. 131–138, 2015.
- KIZILTAS, E. E. et al. Electrically Conductive Nano Graphite-filled Bacterial Cellulose Composites. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 1144–1151, 2016.
- EUZÉBY, J. P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet., **LPSN**. 1997. Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/species/gluconacetobacter-xylinus>. Acesso em: 21 jul. 2022.
- FAN, X. et al. Production of Nanobacterial Cellulose from Beverage Industrial Waste of Citrus Peel and Pomace Using *Komagataeibacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 1068–1072, 2016.
- FAOSTAT. Disponível em: https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities_by_country_imports. Acesso em: 08 de janeiro de 2022.
- FENG, X. et al. Characterization of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 10, p. E2217–E2227, 2015.
- FERNANDES, I. de A. A. et al. Hybrid Bacterial Cellulose-collagen Membranes Production in Culture Media Enriched with Antioxidant Compounds from Plant Extracts. **Polymer Engineering and Science**, v. 60, n. 11, p. 2814–2826, 2020.
- FERNANDES, M. et al. Development of Novel Bacterial Cellulose Composites for the Textile and Shoe Industry. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 650–661, 2019.
- FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; OTONI, W. C.; JOSHI, C. P. Structure, Organization, and Functions of Cellulose Synthase Complexes in Higher Plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2007.
- FIALLOS-CÁRDENAS, M. et al. Bacterial Nanocellulose Derived from Banana Leaf Extract: Yield and Variation Factors. **Resources**, v. 10, n. 12, p. 121, 2021.
- FIERASCU, R. C. et al. Fruits By-Products – A Source of Valuable Active Principles. A Short Review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. April, p. 1–8, 2020.
- FIJALKOWSKI, K. et al. Survival of Probiotic Lactic acid Bacteria Immobilized in Different forms of Bacterial Cellulose in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution. **Lwt**, v. 68, p. 322–328, 2016.
- FONTANA, J. D. et al. New insights on bacterial cellulose. In: GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M. **Food Biosynthesis**. Elsevier, 2017, cap. 7, p. 213–249.

- GALDINO Jr. C. J. S., MAIA, A. D.; MEIRA, H. M., SOUZA, T.C., AMORIM, J. D. P., ALMEIDA, F. C. G., COSTA, A. F. S., SARUBBO, L. A. Use of a Bacterial Cellulose Filter for the Removal of Oil from Wastewater. **Process Biochemistry**, v. 91, p. 288-296, 2020.
- GAO, G. et al. In situ Production of Bacterial Cellulose/xanthan Gum Nanocomposites with Enhanced Productivity and Properties Using *Enterobacter* sp. FY-07. **Carbohydrate Polymers**, v. 248, p. 116788, 2020.
- GARCÍA-SÁNCHEZ, M. E. et al. Production of Bacterial Cellulose by *Komagataeibacter xylinus* Using Mango Waste as Alternative Culture Medium. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 19, n. 2, p. 851–865, 2020.
- GEA, S. et al. Bacterial Cellulose-poly(vinyl alcohol) Nanocomposites Prepared by an in-situ Process. **Materials Letters**, v. 64, n. 8, p. 901–904, 2010.
- GEA, S. et al. Study of bacterial cellulose as scaffold on cartilage tissue engineering. *In: AIP Conference Proceedings*. AIP Publishing LLC, 2018. p. 020061.
- GÖKMEN, V.; SERPEN, A.; FOGLIANO, V. Direct Measurement of the Total Antioxidant Capacity of Foods: the ‘QUENCHER’ approach. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 6, p. 278–288, 2009.
- GOELZER, F. D. E. et al. Production and Characterization of Nanospheres of Bacterial Cellulose from *Acetobacter xylinum* from Processed Rice Bark. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 2, p. 546–551, 2009.
- GORGIEVA, S.; TRČEK, J. Bacterial Cellulose: Production, Modification and Perspectives in Biomedical Applications. **Nanomaterials**, v. 9, n. 10, p. 1–20, 2019.
- GULLO, M. et al. Biotechnological Production of Cellulose by Acetic Acid Bacteria: Current State and Perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 16, p. 6885–6898, 2018.
- GUPTA, K. P. et al. An update on overview of cellulose, its structure and applications. *In: PASCUAL, M. A. R.; EUGENIO, M. E. Cellulose*. Wales: IntechOpen, 2019. cap 1. p. 130.
- GÜRÜ, M. et al. Effects of Sugar Beet Molasses and Molasses-Based Boron Oxide Compound on Bitumen Properties. **Journal of Materials in Civil Engineering**, v. 29, n. 4, p. 04016252, 2017.
- GUZEL, M.; AKPINAR, O. Preparation and Characterization of Bacterial Cellulose Produced From Fruit and Vegetable Peels by *Komagataeibacter hansenii* GA2016. **International Journal of Biological of Macromolecules**, v. 162, p. 1597–1604, 2020.
- HAINAN YEGUO FOODS CO Ltd. **Application of mangos in bio-cellulose fermentation medium**. Titular: HAINAN YEGUO FOODS CO Ltd. CN102925514A. Depositado: 23 nov. 2012. Concedido: 03 ago. 2016.
- HAINAN YEGUO FOODS CO Ltd. **Application of bananas in biocellulose fermentation media**. Titular: HAINAN YEGUO FOODS CO Ltd. CN102911982A. Depositado: 23 nov. 2012. Concedido: 03 ago. 2016.

HASAN, N.; BIAK, D. R. A.; KAMARUDIN, S. Application of Bacterial Cellulose (BC) in Natural Facial Scrub. **International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology**, v. 2, n. 4, p. 272, 2012.

HEO, M.-S.; SON, H.-J. Development of an Optimized, Simple Chemically Defined Medium for Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 41, 2002.

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

HODEL, S. V. K. et al. Active Potential of Bacterial Cellulose-Based Wound Dressing: Analysis of Its Potential for Dermal Lesion Treatment. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 6, p. 1222, 2022.

HONG, F. et al. Bacterial Cellulose Production from Cotton-based Waste Textiles: Enzymatic Saccharification Enhanced by Ionic Liquid Pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 503–508, 2012.

HU, W. et al. Functionalized Bacterial Cellulose Derivatives and Nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 1043–1060, 2014.

HUNGUND, B. et al. Production of Bacterial Cellulose from *Gluconacetobacter Persimmonis* GH-2 Using dual and Cheaper Carbon Sources. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v. 5, n. 2, p. 31–33, 2013.

HUSSAIN, Z.; SAJJAD, W.; KHAN, T.; WAHID, F. Production of Bacterial Cellulose from Industrial Wastes: a review. **Cellulose**, v. 26, n. 5, p. 2895–2911, 2019.

ISLAM, M. et al. Strategies for Cost-effective and Enhanced Production of Bacterial Cellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 1166–1173, 2017.

JACEK, P. et al. Molecular Aspects of Bacterial Nanocellulose Biosynthesis. **Microbial Biotechnology**, 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**, v. 250, p. 922–926, 2018.

JAMSHEERA, C. P.; PRADEEP, B. V. Production of Bacterial Cellulose from *Acetobacter* Species and its Applications - A review. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 544–555, 2021.

JAROENNONTHASIT, W.; LAM, N. T.; SUKYAI, P. Evaluation of Carbon Sources from Sugar Industry to Bacterial Nanocellulose Produced by *Komagataeibacter xylinus*. **International journal of biological macromolecules**, v. 191, p. 299–304, nov. 2021.

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

JOZALA, A. F. et al. Bacterial Nanocellulose Production and Application: a 10-year Overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2063–2072, 2016.

KADAM, D. M.; KAUSHIK, P.; KUMAR, R. Evaluation of Guava Products Quality. **International Journal of Food Science and Nutrition Engineering**, v. 2, n. 1, p. 7–11, 2012.

KAČURÁKOVÁ, M. et al. Molecular Interactions in Bacterial Cellulose Composites Studied by 1D FT-IR and Dynamic 2D FT-IR Spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 12, p. 1145–1153, 2002.

KAMARUDDIN, I.; DIRPAN, A.; BASTIAN, F. The Novel Trend of Bacterial Cellulose as Biodegradable and Oxygen Scavenging Films for Food Packaging Application : An integrative review. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 807, n. 2, 2021.

KESHK, S.; SAMESHIMA, K. Influence of Lignosulfonate on Crystal Structure and Productivity of Bacterial Cellulose in a Static Culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 1, p. 4–8, 2006.

KESHK, S. M. A. S. Vitamin C Enhances Bacterial Cellulose Production in *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 98–100, 2014.

KESKIN, Z.; URKMEZ, A. S. ; HAMES, E. E. Novel Keratin Modified Bacterial Cellulose Nanocomposite Production and Characterization for Skin Tissue Engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 75, p. 1144–1153, 2017.

KHAN, H. et al. Valorization of Fruit Processing Waste to Produce High Value-Added Bacterial Nanocellulose by a Novel Strain *Komagataeibacter xylinus* IITR DKH20. **Carbohydrate Polymers**, v. 260, p. 117807, 2021.

KHAN, S. et al. Synthesis and Characterization of a Novel Bacterial Cellulose–poly(3,4-ethylenedioxythiophene)–Poly(styrene sulfonate) Composite for use in Biomedical Applications. **Cellulose**, v. 22, n. 4, p. 2141–2148, 2015.

KHAN, S. et al. Engineered Regenerated Bacterial Cellulose Scaffolds for Application in *in vitro* Tissue Regeneration. **RSC Advances**, v. 5, n. 103, p. 84565–84573, 2015.

KUMAR, V. et al. Efficient and Economic Process for the Production of Bacterial Cellulose from Isolated Strain of *Acetobacter Pasteurianus* of RSV-4 bacterium. **Bioresource Technology**, v. 275, p. 430–433, 2019.

KUMAR, V. et al. Sustainable Process for the Production of Cellulose by an *Acetobacter Pasteurianus* RSV-4 (MTCC 25117) on Whey Medium. **Cellulose**, v. 28, n. 1, p. 103–116, 2021.

KUROSUMI, A. et al. Utilization of Various Fruit Juices as Carbon Source for Production of Bacterial Cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 333–335, 2009.

LACA, A.; LACA, A.; DÍAZ, M. Hydrolysis: from cellulose and hemicellulose to simple sugars. *In*: BASILE, A.; DALENA, F. **Second and third generation of feedstocks: The evolution of biofuels**, Elsevier. 2019. cap 8. p. 213–240.

LAUS, M. C.; BRUSSEL, A. A. V.; KIJNE, J. W. Role of Cellulose Fibrils and Exopolysaccharides of *Rhizobium Leguminosarum* in Attachment to and Infection of *Vicia Sativa* Root Hairs. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, n. 6, p. 533–538, 2005.

LAZARINI, S. C. et al. Production of Sphere-like Bacterial Cellulose in Cultivation Media with Different Carbon Sources: a promising sustained release system of rifampicin. **Cellulose**, p. 1–24, 2022.

LEE, K. Y.; BULDUM, G.; MANTALARIS, A.; BISMARCK, A. More than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Biosynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, n. 1, p. 10–32, 2014.

LENS.ORG. Disponível em: <https://support.lens.org/knowledge-base/patent-legal-status-calculations/#patent-status-calculation>. Acesso em: 21 de setembro de 2022.

LEONETI, A. B.; ARAGÃO-LEONETI, V.; DE OLIVEIRA, S. V. W. B. Glycerol as a By-product of Biodiesel Production in Brazil: Alternatives for the Use of Unrefined Glycerol. **Renewable Energy**, v. 45, p. 138–145, 2012.

LEVINSON, D.; GLONEK, T. (12) United States Patent (10) Patent No .: (45) Date of Patent : " I The city , Ritact lens from Glucon. **Microbial Cellulose Contact Lens**, v. 2, n. 12, 2010.

LI, H. et al. Biodegradable Cu/BCNF Composite Thermoelectric Film for Wearable Energy Harvesting. **Cellulose**, v. 28, n. 17, p. 10707–10714, 2021.

LIN, S. P. et al. Biosynthesis, Production and Applications of Bacterial Cellulose. **Cellulose**, v. 20, n. 5, p. 2191–2219, 2013.

LIN, D. et al. Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter Hansenii* CGMCC 3917 Using Only Waste Beer Yeast as Nutrient Source. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 113–119, 2014.

LING, J. K. U. et al. Thermal Degradation of Antioxidant Compounds: Effects of Parameters, Thermal Degradation Kinetics, and Formulation Strategies. **Food and Bioprocess Technology**, v. 15, n. 9, p. 1919–1935, 2022.

LIU, Y.; WANG, F.; SUN, Y. Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* CGMCC 1.2378 Using Coconut Shell Acid Hydrolysate as Carbon Source. **BioResources**, v. 16, n. 1, p. 1042, 2021.

LU, H. et al. Effect of Organic Acids on Bacterial Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 30–37, 2015.

LU, S. et al. **Method for Producing Bacterial Cellulose by Taking Citrus Pomace as Raw Material**. Titular: Zhejiang Acad Agricultural Sci. CN 102168056A. Depositado: 11 abr. 2011. Concedido: 03 abr. 2013.

- LUSTRI, W. E. et al. Microbial Cellulose - Biosynthesis Mechanisms and Medical Applications. *In*: PASCUAL, M. A. R.; EUGENIO, M. E. **Cellulose**. IntechOpen, 2015. cap 6. p. 134-157.
- MADIGAN, M. T, et al. Ecosistemas microbianos. *In*: MADIGAN, M. T, et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. cap 19, p. 598-628.
- MADIGAN, M. T, et al. Metabolismo microbiano. *In*: MADIGAN, M. T, et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. cap 3, p. 74-102.
- MARCO, A. **Process for the Production of Nanocellulose**. Titular: Knowledge for Business SRL. 2021057986. Depósito: 1 set. 2021 Publicação: 10 mar. 2022.
- MARIA, L. C. S. et al. Preparation and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Impregnated in Bacterial Cellulose. **Polimeros**, v. 20, n. 1, p. 72–77, 2010.
- MARTINI, G. L. **Elaboração e Avaliação da Composição Química , Física e Sensorial de Barras Alimentícias Adicionadas de Proteína do Soro do Leite (Whey Protein)**. 2016. 65 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Nutrição) - Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2016
- MARTINS, D. et al. Bacterial Cellulose-Carboxymethyl Cellulose (BC:CMC) dry Formulation as Stabilizer and Texturizing Agent for Surfactant-free Cosmetic Formulations. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 617, p. 126380, 2021.
- MATTHYSSE, A. G. Role of Bacterial Cellulose Fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* Infection. **Journal of Bacteriology**, v. 154, n. 2, p. 906–915, 1983.
- MEDINA, A. L. et al. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) Fruit Extracts with Antioxidant and Antimicrobial Activities and Antiproliferative Effect on Human Cancer Cells. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 916–922, 2011.
- MERCK. Disponível em: https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/CELLULYSIN-Cellulase-Trichoderma-viride,EMD_BIO-219466#anchor_orderingcomp. Acessado em 01 de setembro de 2022.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Políticas de Saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. **Alimentos regionais brasileiros**. Brasília, ed 1. 2002. Disponível em: <http://189.28.128.100/nutricao/docs/geral/alimentos_regionais_brasileiros.pdf>. Acesso em 29 de maio de 2022.
- MOHAMMADKAZEMI, F.; AZIN, M.; ASHORI, A. Production of Bacterial Cellulose Using Different Carbon Sources and Culture Media. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 518–523, 2015.
- MOUKAMNERD, C.; OUNMUANG, K.; KONBOA, N.; INSOMPHUN, C. Bacterial Cellulose Production by *Komagataeibacter nataicola* TISTR 2661 by Agro-waste as a Carbon Source. **Chiang mai journal of science**, THAILAND, v. 47, n. 1, p. 16–27, 2020.
- 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.

NAOMI, R.; IDRUS, R. B. H.; FAUZI, M. B. Plant-vs. Bacterial-derived Cellulose for Wound Healing: A review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 18, p. 1–25, 2020.

NATURA. Disponível em: <https://www.natura.com.br/>. Acesso em 29 de maio de 2022.

NI, J. et al. A Novel Facile Two-step Method for Producing Glucose from Cellulose. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 106–110, 2013.

OGRIZEK, L. et al. Properties of Bacterial Cellulose Produced Using White and Red Grape Bagasse as a Nutrient Source. **Processes**, v. 9, n. 7, p. 1088, 2021.

OH, S. Y. et al. Crystalline Structure Analysis of Cellulose Treated with Sodium Hydroxide and Carbon Dioxide by Means of X-ray Diffraction and FTIR Spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 15, p. 2376–2391, 2005.

OKAJIMA, K.; MATSUDA, Y.; KAMIDE, K. Study on Change in the Degree of Polymerisation of Bacterial Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum* During its Cultivation. **Polymer International**, v. 25, n. 3, p. 145–151, 1991.

OKINO-DELGADO, C. H.; PRADO, D. Z.; FLEURI, L. F. Brazilian Fruit Processing, Wastes as a Source of Lipase and other Biotechnological Products: A review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 3, p. 2927–2943, 2018.

OYEGOKE, T.; TONGSHUWAR, G. T.; OGUCHE, J. E. Biomass Pretreatment As a Key Process in Bioethanol Productions: a Review. **Journal of Engineering Science**, v. 29, n. 1, p. 130–141, 2022.

PANDEY, M. P.; KIM, C. S. Lignin Depolymerization and Conversion: A Review of Thermochemical Methods. **Chemical Engineering and Technology**, v. 34, n. 1, p. 29–41, 2011.

PARTE, F. G. P. et al. Current Progress on the Production, Modification, and Applications of Bacterial Cellulose. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 40, n. 3, p. 397–414, 2020.

PARK, J. K.; JUNG, J. Y.; KHAN, T. Bacterial cellulose. *In*: PHILIPS, G. O; WILLIAMS, P. A. **Handbook of Hydrocolloids**. 2. ed. **Woodhead Publishing Limited**, 2009. cap 26, p. 724-739.

PATSIOS, S. I. et al. Characterisation of Agricultural Waste Co- and By-Products. **Agocicle Project**, 2016. 243 p.

PENG, S. et al. Polypyrrole/nickel Sulfide/bacterial Cellulose Nanofibrous Composite Membranes for Flexible Supercapacitor Electrodes. **Cellulose**, v. 23, n. 4, p. 2639–2651, 2016.

PEREIRA, J. et al. Production of Medium-chain-length Polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*: Cultivation on Fruit Pulp Waste and Polymer Characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 85–92, 2021.

- PIADOZO, M. E. S. Nata de Coco Industry in the Philippines. *In: Bacterial Nanocellulose: From Biotechnology to Bio-Economy*. Amsterdam: Elsevier, 2016, cap. 13, p. 215–229.
- PINEDA, L. D. C.; MESA, L. A. C. M.; RIASCOS, C. A. M. Técnicas de Fermentación y Aplicaciones de la Celulosa Bacteriana: una Revisión. *Ingeniería y Ciencia*, v. 8, n. 16, p. 307–335, 2012.
- PIRES, E. A.; RIBEIRO, N. M.; QUINTELLA, C. M. Sistemas de Busca de Patentes: Análise Comparativa entre Espacenet, Patentscope, Google Patents, Lens, Derwent Innovation Index e Orbit Intelligence. *Cadernos de Prospecção*, v. 13, n. 1, p. 13, 2020.
- PLAZZOTTA, S.; MANZOCCO, L.; NICOLI, M. C. Fruit and Vegetable Waste Management and the Challenge of Fresh-cut Salad. *Trends in Food Science and Technology*, v. 63, p. 51–59, 2017.
- 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.
- PROVIN, A. P. et al. Textile Industry and Environment: Can the Use of Bacterial Cellulose in the Manufacture of Biotextiles Contribute to the Sector? *Clean Technologies and Environmental Policy*, v. 23, n. 10, p. 2813–2825, 2021. a.
- PROVIN, A. P. et al. Use of Bacterial Cellulose in the Textile Industry and the Wettability Challenge—a review. *Cellulose*, v. 28, n. 13, p. 8255–8274, 2021. b.
- RAGHAVENDRAN, V.; ASARE, E.; ROY, I. Bacterial cellulose: Biosynthesis, production, and applications. In: POOLE, R. K. *Advances in Microbial Physiology*. 1. ed. Elsevier Ltd., 2020, cap. 3, v. 77, p. 89-138.
- RAKITA, S. et al. Soybean Molasses in Animal Nutrition. *Animals*, v. 11, n. 2, p. 1–15, 2021.
- RANGASWAMY, B. E.; VANITHA, K. P.; HUNGUND, B. S. Microbial Cellulose Production from Bacteria Isolated from Rotten Fruit. *International Journal of Polymer Science*, ENGLAND, v. 2015, p. 1687-9422, 2015.
- RANI, M. U.; APPAIAH, K. A. A. Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 Using Coffee Cherry Husk. *Journal of Food Science and Technology*, v. 50, n. 4, p. 755–762, 2013.
- RE, R. et al. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free radical biology and medicine*, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.
- REBELO, A. R. et al. Dehydration of Bacterial Cellulose and the Water Content Effects on its Viscoelastic and Electrochemical Properties. *Science and Technology of Advanced Materials*, v. 19, n. 1, p. 203–211, 2018.
- REBELO, A. M. R. et al. Carbon Nanotube-Reinforced Poly(4-vinylaniline)/Polyaniline Bilayer-Grafted Bacterial Cellulose for Bioelectronic Applications. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, v. 5, n. 5, p. 2160–2172, 2019.

- ROCHÍN-MEDINA, J. J. et al. Use of Whey as a Culture Medium for *Bacillus clausii* for the Production of Protein Hydrolysates with Antimicrobial and Antioxidant Activity. **Food Science and Technology International**, v. 24, n. 1, p. 35–42, 2018.
- SAJJAD, W. et al. Fabrication of Bacterial Cellulose-Curcumin Nanocomposite as a Novel Dressing for Partial Thickness Skin Burn. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 1–12, 2020.
- SAMUEL, S. O.; ADEFUSIKA, A. M. Influence of Size Classifications on the Structural and Solid-State Characterization of Cellulose Materials. *In*: PASCUAL, A. P; MARTIN, M. E. **Cellulose**, IntechOpen., September, 2019. cap 3, p. 1-16.
- SANTOS, S. M. et al. Use of Bacterial Cellulose in Degraded Paper Restoration. Part I: application on model papers. **Journal of Materials Science**, v. 51, n. 3, p. 1541–1552, 2016.
- SANTOS, L. A. Dos. et al. Methane Generation Potential Through Anaerobic Digestion of Fruit Waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 256, 2020.
- SERPEN, A.; GÖKMEN, V.; FOGLIANO, V. Total Antioxidant Capacities of Raw and Cooked Meats. **Meat Science**, v. 90, n. 1, p. 60–65, 2012.
- SHAO, W. et al. Tetracycline Hydrochloride Loaded Regenerated Cellulose Composite Membranes with Controlled Release and Efficient Antibacterial Performance. **RSC Advances**, v. 6, n. 4, p. 3068–3073, 2016.
- SHANSHAN, W.; LIQUIN, C. **Method for Preparing Bacterial Cellulose by Utilizing Soapberry Fruit Shell**. Titular: Quangang Petrochemical Research Institute of Fujian Normal Univ , Quanzhou Jianneng Environment Protection Tech Co Ltd. CN 111893149 A. Depósito: 05 mai. 2019. Publicado: 06 nov. 2020.
- SHI, Z. et al.. In situ Nano-assembly of Bacterial Cellulose-polyaniline Composites. **RSC Advances**, v. 2, n. 3, p. 1040–1046, 2012.
- SILVA, N. H. C. S. et al. Bacterial Cellulose Membranes as Transdermal Delivery Systems for Diclofenac: In vitro Dissolution and Permeation Studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, n. 1, p. 264–269, 2014.
- SILVA, G. A. et al. Bacterial Cellulose Hydrogel and Calcium Alginate in the Cicatricial Wound Process from Diabetic Foot Implementation. **International Journal of Advances in Medical Biotechnology-IJAMB**, v. 4, n. 2, p. 27-29, 2021.
- SIMPSON, M. G. Diversity and Classification of Flowering Plants: Eudicots. *In*: SIMPSON, M. G. **Plant Systematics**. 2.ed. **Academic Press**, 2010. cap 8, p. 285-466.
- SINGH, R. et al. Effect of Carbon Sources on Physicochemical Properties of Bacterial Cellulose Produced from *Gluconacetobacter xylinus* MTCC 7795. **E-Polymers**, v. 16, n. 4, p. 331–336, 2016.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J.A. (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagent. **American Journal of Enology and Viticulture**, 1965, p. 144-158.

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.

SOUZA, S. S. de. **Biologia sistêmica da produção de celulose bacteriana através da reconstrução metabólica da *Gluconacetobacter hansenii***. 2014. Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

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.

SRIKANDACE, Y. et al. Bacterial Cellulose Production by *Komagataeibacter xylinus* Using Rice-washed Water and Tofu Processing Wastewater with the Addition of Sodium Glutamate. **Fibers and Polymers**, v. 23, n. 5, p. 1190–1196, 2022.

STEFANELLO, M. É. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical Diversity and Biological Properties. **Chemistry and Biodiversity**, v. 8, n. 1, p. 73–94, 2011.

SUN, B. et al. In situ Structural Modification of Bacterial Cellulose by Sodium Fluoride. **Carbohydrate Polymers**, v. 231, p. 115765, 2020.

SUN, Z. et al. The Improved Properties of Carboxymethyl Bacterial Cellulose Films with Thickening and Plasticizing. **Polymers**, v. 14, n. 16, 2022.

SUN, B. et al. In situ structural Modification of Bacterial Cellulose by Sodium Fluoride. **Carbohydrate Polymers**, v. 231, n. December 2019, p. 115765, 2020.

SYRUPS. In: **ENCYCLOPEDIA of Food Sciences and Nutrition**. Academic Press, 2003, p. 5711-5717.

SZITA, G. et al. A Synthetic Culture Medium Evaluated for Detection of Coliform Bacteria in Tomato Paprika. **Food Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 483–486, 2003.

TAKEDA, L. N., et al. *Psidium Guajava* L.: A Systematic Review of the Multifaceted Health Benefits and Economic Importance. **Food Reviews International**, p. 1-31, 2022.

TORGBO, S.; SUKYAI, P. Bacterial Cellulose-based Scaffold Materials For Bone Tissue Engineering. **Applied Materials Today**, v. 11, p. 34–49, 2018.

TORGET, R. W.; KIM, J. S.; LEE, Y. Y. Fundamental Aspects of Dilute Acid Hydrolysis/fractionation Kinetics of Hardwood Carbohydrates. 1. Cellulose Hydrolysis. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 39, n. 8, p. 2817–2825, 2000.

TORRES, F.; COMMEAUX, S.; TRONCOSO, O. Biocompatibility of Bacterial Cellulose Based Biomaterials. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 3, n. 4, p. 864–878, 2012.

TSOUKO, E. et al. Integrated Biorefinery Development for the Extraction of Value-added Components and Bacterial Cellulose Production from Orange Peel Waste Streams. **Renewable Energy**, v. 160, p. 944–954, 2020.

- TURECK, B. C. et al. Obtaining and Characterization of Bacterial Cellulose Synthesized by *Komagataeibacter hansenii* from Alternative Sources of Nitrogen and Carbon. **Revista Materia**, v. 26, n. 4, 2021.
- 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.
- UL-ISLAM, M. et al. Ex situ Synthesis and Characterization of High Strength Multipurpose Bacterial Cellulose-Aloe vera Hydrogels. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, n. February, p. 1–12, 2021.
- ULLAH, H.; SANTOS, H. A.; KHAN, T. Applications of Bacterial Cellulose in Food, Cosmetics and Drug Delivery. **Cellulose**, v. 23, n. 4, p. 2291–2314, 2016.
- URAKI, Y.; KODA, K. Utilization of Wood Cell Wall Components. **Journal of Wood Science**, v. 61, n. 5, p. 447–454, 2015.
- URBINA, L. et al. A Review of Bacterial Cellulose: Sustainable Production from Agricultural Waste and Applications in Various Fields. **Cellulose**, Netherlands, v. 28, n. 13, p. 8229–8253, 2021.
- VEANA, F. et al. Utilization of Molasses and Sugar Cane Bagasse for Production of Fungal Invertase in Solid State Fermentation Using *Aspergillus niger* GH1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 373–377, 2014.
- VUELOPHARMA. Disponível em: <https://www.vuelopharma.com/produto/membracel-membrana-regeneradora-porosa/>. Acesso em: 08 de janeiro de 2022.
- WAHID, F. et al. Bacterial Cellulose and its Potential for Biomedical Applications. **Biotechnology Advances**, v. 53, n. May, p. 107856, 2021. a.
- WAHID, F. et al. Fabrication of Bacterial Cellulose-Based Dressings for Promoting Infected Wound Healing. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 13, n. 28, p. 32716–32728, 2021. b.
- WAN, Y. et al. Preparation and Characterization of Bacterial Cellulose/heparin Hybrid Nanofiber for Potential Vascular Tissue Engineering Scaffolds. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 22, n. 12, p. 2643–2648, 2011.
- WANG, S. S. et al. Insights into Bacterial Cellulose Biosynthesis from Different Carbon Sources and the Associated Biochemical Transformation Pathways in *Komagataeibacter* sp. W1. **Polymers**, v. 10, n. 9, 2018.
- WANG, J.; TAVAKOLI, J.; TANG, Y. Bacterial Cellulose Production, Properties and Applications with Different Culture Methods – A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 219, p. 63–76, 2019.
- WANG, X. et al. Production and Characterization of Bacterial cellulose membranes with hyaluronic acid and silk sericin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 195, n. July, p. 111273, 2020.

WATANABE, K. et al. Structural Features and Properties of Bacterial Cellulose Produced in Agitated Culture. **Cellulose**, v. 5, n.3, p. 187–200, 1998.

WOICIECHOWSKI, A. L. et al. Emprego de resíduos agroindustriais em bioprocessos alimentares. *In*: PASTORE, G. M.; BICAS, J. L.; JUNIOR, M. R. M. **Biotecnologia de Alimentos**, 2013. cap 3. v. 1, p. 143-171.

XAVIER, J. R.; RAMANA, K. V. Development of Slow Melting Dietary Fiber-enriched Ice Cream Formulation Using Bacterial Cellulose and Inulin. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 5, p. 1-8, 2022.

XUECHUAN, W. et al. **Bacterial Cellulose Fermentation Medium made from Apple Pomace and Method for Producing Bacterial Cellulose by Utilizing Medium**. Titular: Univ Shaanxi Science & Tech. CN104031956 A. Depositado: 05 jun. 2014. Concedido: 09 jan. 2016.

YAMADA, Y. et al. Subdivision of the Genus Gluconacetobacter Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: The Proposal of Komagatabacter gen. nov., for Strains Accommodated to the Gluconacetobacter xylinus Group in the α -Proteobacteria. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 849–859, 2012.

YAMAMOTO, H.; HORII, F.; HIRAI, A. In situ Crystallization of Bacterial Cellulose II. Influences of Different Polymeric Additives on the Formation of Celluloses Ia and Ib at the Early Stage of Incubation. **Cellulose**, v. 3, n. 1, p. 229–242, 1996.

YANG, G.; WANG, C. **Method for Preparing Bacterial Cellulose by Using Decayed Fruits as Raw Materials**. Titular: Univ Donghua. 201110369460. Depósito: 18 nov. 2011. Publicação: 28 mar. 2012.

YE, J. et al. Bacterial Cellulose Production by Acetobacter xylinum ATCC 23767 Using Tobacco Waste Extract as Culture Medium. **Bioresource Technology**, v. 274, p. 518–524, 2019.

YONG, P. M.; KON, C. H.; YEONG, L. N. **A Method for Producing Bacterial Cellulose Using juice extraction cake of Citrus Fruits**. Titular: Korea Res Inst Bioscience & Biotechnology, Jadam Co Ltd. 2015005886. Depósito: 27 abr. 2015. Concedido: 9 jan. 2018.

YORDSHAHI, S. et al. Design and Preparation of Antimicrobial Meat Wrapping Nanopaper with Bacterial Cellulose and Postbiotics of Lactic Acid Bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 321, n. December 2019, p. 108561, 2020.

YUNOKI, S.; OSADA, Y.; KONO, H. Role of Ethanol in Improvement of Bacterial Analysis Using ¹³C-Labeled Carbon Sources D20 containing one drop of DMSO-d the Biosynthesized. **Food Science and Technology**, v. 10, n. 3, p. 307–313, 2004.

ZHAO, H. et al. Production of Bacterial Cellulose Using Polysaccharide Fermentation Wastewater as Inexpensive Nutrient Sources. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 32, n. 2, p. 350–356, 2018.

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.

ZAHAN, K. A.; PA'E, N.; MUHAMAD, I. I. An Evaluation of Fermentation Period and Discs Rotation Speed of Rotary Discs Reactor for Bacterial Cellulose Production. **Sains Malaysiana**, v. 45, n. 3, p. 393–400, 2016.

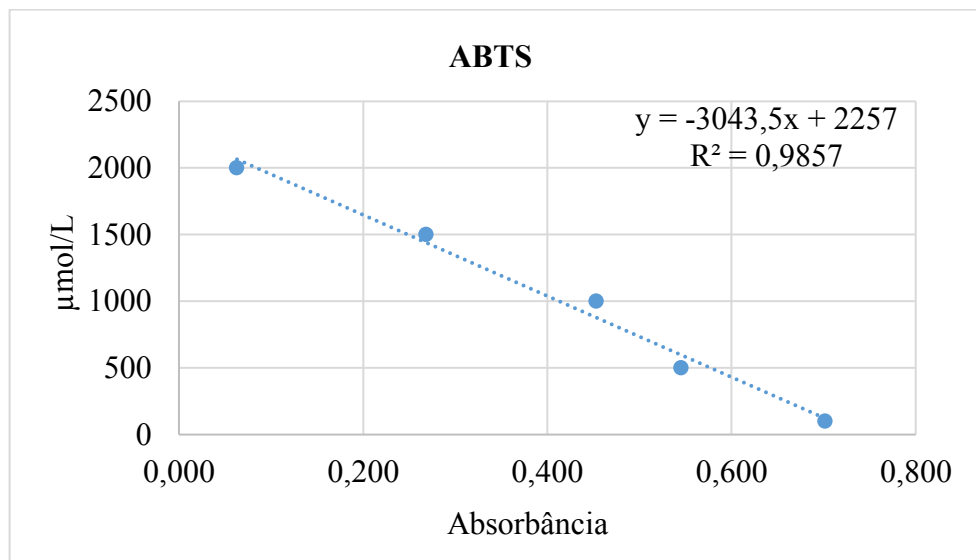
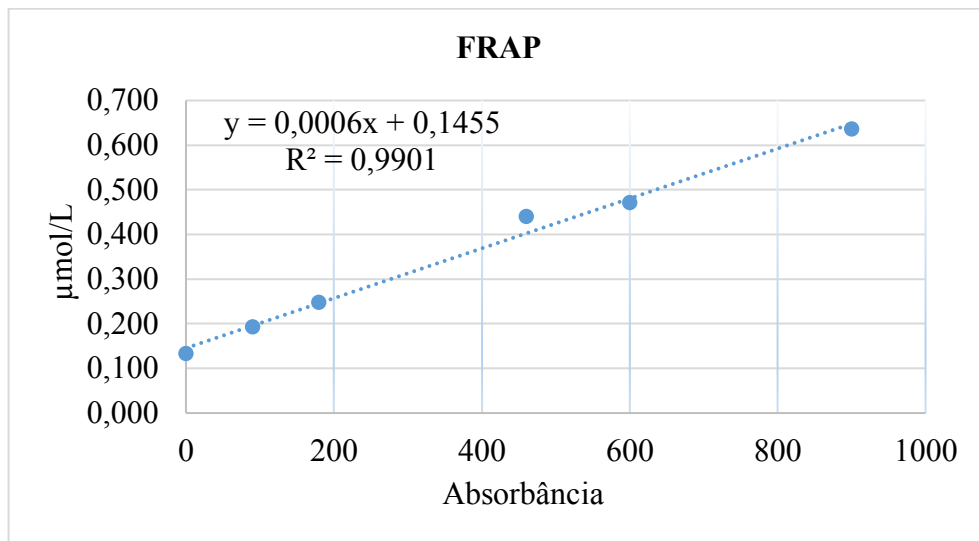
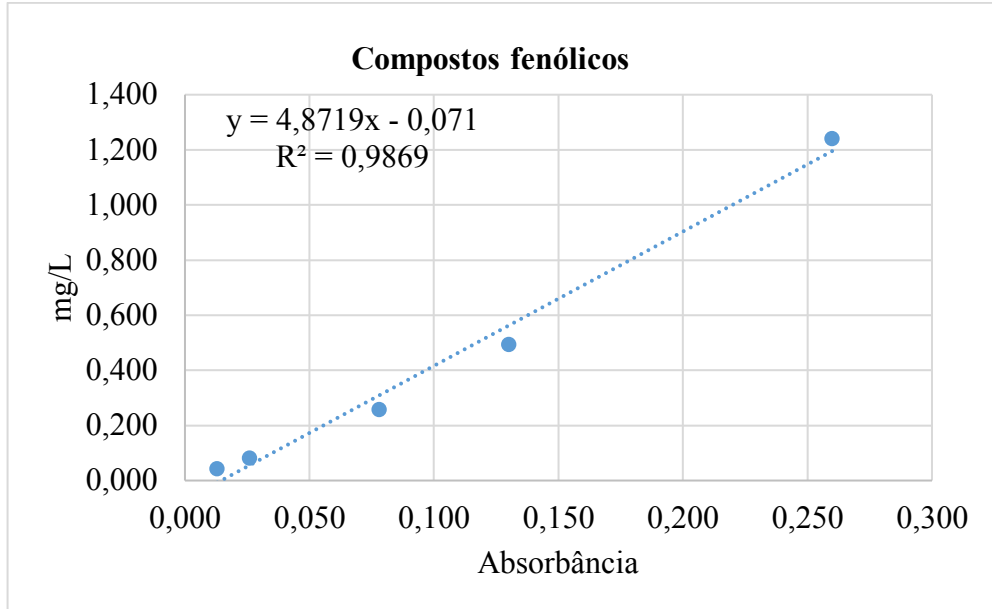
ZAHAN, K. A. et al. Effect of Incubation Temperature on Growth of *Acetobacter xylinum* 0416 and Bacterial Cellulose Production. **Applied Mechanics and Materials**, v. 815, p. 3–8, 2015.

ZANDONA, E.; BLAŽIĆ, M.; JAMBRAK, A. R. Whey Utilisation: Sustainable Uses and Environmental Approach. **Food Technology and Biotechnology**, v. 59, n. 2, p. 147–161, 2021.

ZENG, Y.; HIMMEL, M. E.; DING, S. Y. Visualizing Chemical Functionality in Plant Cell Walls Mike Himmel. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2017.

“UTFPR - DV”. 2022. **Google Maps**. Google. Consultado em <https://www.google.com/maps/place/UTFPR+-+Dois+Vizinhos/@-25.7000673,-53.1002922,1530m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x94f048f00dd26185:0x3965e767d865130a!8m2!3d-25.7046501!4d-53.0976178>

APENDICE A – Curvas de Calibração de atividade antioxidante para meio



APENDICE B – Curvas de Calibração de atividade antioxidante para membranas de NCB

