

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO 2
ORIENTADORA: PROF^a. DR^a PRISCILA VAZ DE ARRUDA

ANA CLARA OZELHIERI DE ALMEIDA
INGRID FERNANDA SILVANO PACHECO CORRÊA FURTADO

**AVALIAÇÃO DE MATERIAIS ORIUNDOS DA AGROINDÚSTRIA
COMO MEIO DE CULTIVO VISANDO À OBTENÇÃO DE CELULOSE
BACTERIANA**

Toledo – PR
2020

ANA CLARA OZELHIERI DE ALMEIDA
INGRID FERNANDA SILVANO PACHECO CORRÊA FURTADO

**AVALIAÇÃO DE MATERIAIS ORIUNDOS DA AGROINDÚSTRIA
COMO MEIO DE CULTIVO VISANDO À OBTENÇÃO DE CELULOSE
BACTERIANA**

Trabalho de conclusão de curso 2
apresentado ao curso de Engenharia de
Bioprocessos e Biotecnologia, da
Universidade Tecnológica Federal do
Paraná como requisito parcial à obtenção
de título de Engenheiro de Bioprocessos
e Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a Priscila Vaz de Arruda
Coorientador: Dr. Thiago C. Maniglia

Toledo – PR
2020

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANA CLARA OZELHIERI DE ALMEIDA
INGRID FERNANDA SILVANO PACHECO CORRÊA FURTADO

AVALIAÇÃO DE MATERIAIS ORIUNDOS DA AGROINDÚSTRIA COMO MEIO DE CULTIVO VISANDO À OBTENÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA

Data da aprovação, 10 de outubro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Profº Dr. Cleverson Busso
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

Profª Dra. Gracinda Marina Castelo da Silva
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

Profº Dr. Thiago Cintra Maniglia
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

Profª Dra. Priscila Vaz de Arruda
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

AGRADECIMENTOS

Agradecemos primeiramente a Deus pelo dom da vida, pelas oportunidades que tem nos dado e por ter cruzados nossos caminhos.

Aos nossos pais Vilma, Antonio, Elce e Juarez, por todo amor, carinho e dedicação ofertados ao longo de nossas vidas moldando nosso caráter para sermos pessoas de bem e, também, por todo esforço e suporte que possibilitaram ingressar na universidade.

Aos nossos irmãos Diego, Juarez Jr., Maria Carolina e cunhadas (o) Thaís, Raíssa e Fernando pelo ombro-amigo e por serem nossas inspirações de vida.

Eu Ingrid, agradeço ao meu namorado Lucas Fuhr Rodrigues, pelo companheirismo, amor, dedicação, amizade e paciência durante todos esses anos e, sobretudo, por nunca me deixar desistir, lembrando-me sempre do meu potencial.

A Emilia Harumi Kato por nos aguentar todos os dias, inclusive nos momentos mais difíceis, fazendo caretas de consolo que nos fazem rir.

A todos os professores que passaram por nossas vidas deixando um pouquinho de si mesmos agregando tanto em nossa formação profissional quanto pessoal, em especial a professora Alessandra Novak Sydney, ao Professor Eduardo B. Sydney, a Professora Débora Jacomini, ao Professor Luís Felipe M. Figueiredo, ao Professor Renato Eising, Professor Marcelo Fernandes e ao Professor Ernesto Osvaldo Wrasse.

A nossa orientadora que além de agregar na nossa formação acadêmica, estando sempre disposta a sanar nossas dúvidas, nos ensinou a levar a vida com bom humor e leveza.

Ao co-orientador Thiago C. Maniglia pela colaboração durante a realização do presente projeto, estando sempre disposto a nos ajudar.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Toledo pela disponibilização de recursos financeiros por meio do Edital 1/2019 do PROGRAD/PROREC - Apoio à execução de trabalhos de conclusão de curso (TCC), que possibilitaram aquisição de uma cepa.

A todos os técnicos e funcionários da universidade que contribuíram, direta ou indiretamente, para execução desse projeto.

Ao Aviário localizado em Cafelândia – PR e a Usina de Santa Teresinha – PR.

Muito obrigada!

RESUMO

A celulose bacteriana é um biopolímero semelhante a celulose vegetal, contudo não possui alguns dos polissacarídeos constituintes da parede celular, como a hemicelulose e lignina, sendo essa característica desejável para aplicações industriais, o que vem despertando grande interesse em pesquisas nesta área. Este biopolímero pode ser produzido a partir do cultivo da bactéria *Glucanobacter xylinus*, a qual está presente nas culturas simbióticas de chás fermentados, como a kombucha. No entanto, meios de cultivo para sua produção são geralmente dispendiosos estimulando a busca por obtenção de meios alternativos aos convencionais. Nesse sentido, meios de cultivo constituídos por resíduos agroindustriais e/ou co-produtos, como pena de frango e melaço de cana-de-açúcar podem ser empregados. O presente trabalho visou produzir biofilme celulósico em meios compostos por hidrolisado de penas de frango e melaço da cana-de-açúcar diluído, em comparação com o meio de cultivo convencional (Meio *Hestrin Schramm* (HS)), a partir de cultura simbiótica de kombucha. Visou-se também, após o estabelecimento das melhores condições de produção de celulose bacteriana, caracterizar o biofilme produzido por avaliações de espessura; teor de umidade; intumescimento e solubilidade em água. Os melhores resultados para os meios alternativos foram obtidos mediante a utilização de melaço de cana-de-açúcar, com cultivo estático por 21 dias. Para essa condição, obteve-se espessura ($0,67 \pm 0,29$ mm), teor de umidade ($96,86 \pm 0,56\%$), intumescimento ($2,31 \times 10^{-3} \pm 1,49 \times 10^{-3}\%$) e solubilidade em água ($98,95 \pm 0,16\%$). A partir de tais resultados percebe-se o potencial de produção de celulose bacteriana utilizando-se como meio de cultivo um coproduto.

Palavras-chave: Celulose bacteriana. Biofilme. Melaço de cana-de-açúcar. Pena de frango, Kombucha.

ABSTRACT

Bacterial cellulose is a biopolymer similar to vegetable cellulose, however it doesn't contain lignin and hemicellulose which are some of the polysaccharides of cell wall. This characteristic is desirable for industrial applications, which has awakened the interest of research in this area. This biopolymer can be produced from the cultivation of the bacterium *Glucanobacter xylinus*, which is present in symbiotic cultures of fermented teas, such as kombucha. However, the means of cultivation for their production are generally expensive, stimulating the research for alternative means to conventional ones. In this sense, cultivation media are based on agro-industrial residues and/or co-products, such as chicken feather and sugarcane molasses could be used. The present work aimed to produce cellulosic biofilm in media composed with chicken feathers and diluted sugar cane molasses hydrolyzates and compared these media with the conventional culture medium (Medium *Hestrin Schramm* (HS)) during symbiotic culture of kombucha. It was also aimed, after the establishment of the best conditions for the production of bacterial cellulose, to characterize the biofilm produced by thickness assessments; moisture content; swelling and solubility in water. The best results for the alternative media were obtained using sugarcane molasses, with static cultivation for 21 days. For this condition, getting thickness (0.67 ± 0.29 mm), moisture content ($96.86 \pm 0.56\%$), swelling ($2.31 \times 10^{-3} \pm 1.49 \times 10^{-3}\%$) and solubility in water ($98,95 \pm 0.16\%$). Based on these results, the potential for bacterial cellulose production can be seen using a co-product as a culture medium.

Keywords: Bacterial cellulose. Biofilm. Sugar cane molasses. Chicken feather. Kombucha.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1 Microrganismos produtores de celulose bacteriana	12
3.2 Fisiologia da <i>G. xylinus</i> e biossíntese de celulose	15
3.3 Meios de cultivo para isolamento de microrganismos produtores de celulose bacteriana	17
3.4 Metodologia de identificação molecular	18
3.5 Meios de cultivo alternativos	18
3.6 Características da celulose bacteriana e suas aplicações	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Obtenção do microrganismo e avaliação da formação de biofilme	23
4.1.1 Ensaio a partir do isolamento, identificação e cultivo de microrganismo(s) da cultura de kombucha	23
4.1.2 Ensaio a partir de <i>Gluconacetobacter xylinus</i> (ATCC 23769)	25
4.1.3 Ensaio a partir de cultura mista de kombucha	27
4.2 Obtenção e avaliação da suplementação nutricional dos meios de cultivo a partir de materiais oriundos da agroindústria	28
4.2.1 Obtenção de hidrolisado de pena de frango	28
4.2.2 Obtenção de melaço de cana-de-açúcar	30
4.2.3 Avaliação da suplementação nutricional dos materiais oriundos da agroindústria como meios de cultivo	30
4.3 <i>Screening</i> de parâmetros sobre a formação de celulose bacteriana	32
4.4 Análises físico-químicas	32
4.4.1 Espessura	33
4.4.2 Teor de umidade	33
4.4.3 Intumescimento	33
4.4.4 Solubilidade em água	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35

5.1 Avaliação da produção de biofilme celulósico por microrganismos isolados da cultura de kombucha e cultura pura de <i>Gluconobacter xylinus</i>	35
5.1.1 Isolamento, identificação e cultivo de microrganismo(s) da cultura de kombucha....	35
5.1.2 Cultivos a partir da aquisição de cultura pura de <i>G. xylinus</i> ATCC23769.....	41
5.2 Avaliação da produção de biofilme celulósico por microrganismos a partir da cultura mista de kombucha	44
5.2.1 Hidrólise das penas de frango	45
5.2.2 Caracterização do melaço de cana de açúcar	47
5.3 Produção de celulose bacteriana	48
5.4 Análises físico-química dos filmes celulósicos	56
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXO A – Composição de meios de cultivo utilizados	66
APÊNDICE A – Estimativa do custo de produção de peptona de pena de frango.....	67

1 INTRODUÇÃO

Os meios de cultivos são responsáveis por boa parte dos custos de um bioprocessamento, uma vez que estes devem conter fontes de carboidrato, nitrogênio e sais, a fim de propiciar o bom desempenho dos mesmos. Neste sentido, uma alternativa para redução de custos é a utilização de resíduos agroindustriais e co-produtos como fontes de macro e micronutrientes (TASKIN *et al.*, 2011). Aviários, por exemplo, têm como resíduo as penas de frango que são incineradas para evitar a proliferação de doenças entre as aves, ou ainda, utilizadas para produção de farinha visando sua incorporação em rações animais. No entanto, as penas poderiam ser empregadas como fonte de nutrientes em meio de cultivo, já que contêm elevadas concentrações de peptona e sais (OZDAL e KURBANOGLU, 2018).

Outra fonte em potencial para ser empregado como meio de cultivo alternativo e rico em nutrientes refere-se ao melaço da cana-de-açúcar, devido à sua composição, pois possui além de carboidratos e nitrogênio, alguns sais (FELTRIN *et al.*, 2000).

No estado do Paraná, sobretudo no oeste paranaense, há predominância da atividade agrícola, ou seja, sua economia baseia-se na agricultura, avicultura e pecuária, sendo essa região responsável por aproximadamente 31,92% da produção de frangos de corte de todo país (AGROSAT, 2019). Ademais, este estado é o maior produtor de cana-de-açúcar na região sul, o que representa uma alta eficiência para produção de etanol, açúcar e outros insumos provindos da cana, como o melaço (CONAB, 2019).

Com base nisso, a localização da UTFPR-*campus* Toledo é um ponto estratégico para utilização destes resíduos e co-produtos originários das atividades agroindustriais, uma vez que estão amplamente disponíveis podendo ser empregados como meio de cultivo para obtenção de produtos de valor agregado como a celulose bacteriana (CB).

A kombucha, bebida obtida a partir da fermentação estática de chás oriundos de *Camellia sinenses* e associação de bactérias e leveduras originam, além da bebida, uma fina película celulósica, denominada de *Scoby - Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts* (SCHROEDER, 2019). A bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, presente na kombucha e principal responsável pela produção de CB, tem sido amplamente estudada para este fim, uma vez que além de possuir fórmula estrutural equivalente a celulose vegetal, não tem hemicelulose e lignina, que são polissacarídeos protetores da estrutura vegetal, sendo essa uma grande vantagem para sua utilização (SANTOS,

2016 e DOMINI *et al.*, 2010). Neste sentido, o presente trabalho teve como principal objetivo avaliar a obtenção de biofilme celulósico a partir de meios compostos por hidrolisado de penas de frango e melaço da cana-de-açúcar diluído em diferentes condições de cultivo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os hidrolisados de penas de frango e melaço da cana-de-açúcar como meios de cultivo visando a obtenção de biofilme celulósico.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e caracterizar microrganismos produtores de celulose bacteriana a partir de cultura de kombucha;
- Avaliar a suplementação dos hidrolisados de pena de frango e de melaço de cana-de-açúcar como meios de cultivo para a obtenção de celulose bacteriana;
- Avaliar os parâmetros como temperatura e tempo de cultivo nas condições de suplementação que apresentarem a formação de biofilme;
- Analisar a partir de técnicas físico-químicas (espessura, umidade, taxa de intumescimento e solubilidade em água) a qualidade do biofilme na melhor condição de suplementação, temperatura e tempo obtida nos ensaios anteriores.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microrganismos produtores de celulose bacteriana

A kombucha, bebida fermentada a partir da associação de leveduras e bactérias com chás oriundos de *Camellia sinenses*, origina uma bebida doce, gaseificada, com ação antioxidante e têm também em sua composição, vitaminas, ácido glucônico, ácido glucurônico, ácido lático dentre outros micronutrientes advindos da fermentação (SCHROEDER, 2019).

Além disso, durante a fermentação é formado um biofilme celulósico chamado de Scoby (*Scoby - Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*), o qual é produzido por bactérias acéticas presentes no meio (SANTOS, 2016). Vale ressaltar que a celulose bacteriana (CB) possui as mesmas propriedades que a celulose vegetal (mesma estrutura química, cristalinidade, capacidade de absorção de água e biocompatibilidade), diferenciando-se pela presença de lignina e hemicelulose na celulose vegetal, que são polissacarídeos com a função de proteção da parede celular (VIEIRA, 2013).

A cultura mista presente no Scoby e no chá fermentado é constituída por uma enorme variedade de bactérias e leveduras que podem ser diferentes dependendo do manejo e condições aos quais a mesma for submetida. Por essa razão, não existe uma cultura universal, porém as espécies de leveduras mais encontrados são osmotolerantes, fermentativas e produtoras de ácido, tais como: de kombucha são: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Candida kefyr*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulospora delbrueckii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida stellata*; e as bactérias predominantes são: *Acetobacter xylinoides*, *A. pasteurianus*, *A. aceti*, *Bacterium gluconicum*, *Gluconobacter oxydans* e *Gluconobacter xylinus* (SANTOS, 2016).

Essa mesma cultura mista já foi reportada na literatura com o intuito de obter-se celulose bacteriana ou biofilme celulósico. Schroeder (2019) verificou-se a obtenção de celulose bacteriana a partir da utilização de cultura mista de kombucha por meio da fermentação com extrato de acerola verde em substituição ao chá verde, resultando na obtenção de celulose bacteriana com peso seco três vezes superior ao chá verde.

Alkhalifawi (2014) também utilizou cultura mista de kombucha, suplementada com diferentes composições de mel e sacarose, com o objetivo de produzir celulose

bacteriana. Segundo este autor a incorporação de mel não é uma opção viável frente a sacarose para a produção de biofilme celulósico, devido ao seu custo, além da produção de celulose ser noventa e três vezes maior com a utilização da sacarose, sendo o melhor resultado de $6,6 \text{ g.L}^{-1}$ de celulose bacteriana.

Assim, percebe-se que a cultura mista de kombucha pode ser uma opção viável para produção de celulose bacteriana, uma vez que possui os microrganismos responsáveis pela formação do biofilme (SANTOS, 2016).

Segundo Pigossi (2014) a celulose bacteriana pode se tornar um dos produtos biotecnológicos com maior potencial no setor industrial e na saúde, devido à possibilidade de sua obtenção em larga escala, aliada ao baixo custo, por rotas oriundas do metabolismo de bactérias dos gêneros: *Gluconacetobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Sarcina* sp., *Agrobacterium* sp. e *Alcaligenes* sp.

Todavia a bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, que é conhecida também como *Acetobacter xylinum*, vem despertando interesse por produzir quantidades consideráveis de celulose na forma de película sob condições estáticas, uma vez que esta espécie é reportada por ser mais eficiente, além de apresentar capacidade de assimilar diferentes fontes de carbono, conforme pode ser observado na Tabela 1. Atualmente, essa bactéria foi reclassificada como *Komagataeibacter hansenii* (OLIVEIRA; CARMINATTI, 2016).

Pode se verificar na Tabela 1 que a utilização de vinhaça como fonte de carbono proporcionou melhor resultado em relação às demais fontes de carbono apresentadas. Zhao *et al.* (2018) utilizaram vinhaça como fonte de carbono e obtiveram como melhor resultado a produção de 30 g de celulose úmida a cada 75 mL de vinhaça, correspondente a um rendimento de 400 g/L de CB úmida. Por sua vez, Jozala *et al.* (2015) empregaram frutas podres e soro de leite, combinados ou não e obtiveram como melhor resultado a utilização apenas de frutas podres com cultivo de 3 dias atingindo-se rendimento de 60 g/L.

Altos rendimentos também foram encontrados quando da utilização de suco de sisal, uma vez que o mesmo apresentou resultados três vezes maiores em comparação ao meio sintético convencional (HS) (LIMA *et al.*, 2017).

Ademais, pode-se destacar a maior produção promovida pelo microrganismo *A. xylinum* BCR 5 (15,30 g/L) em 2 dias de cultivo, seguido por *Acetobacter* sp. A6 (15,20 g/L) em 8 dias de cultivo.

Tabela 1 - Revisão de alguns microrganismos utilizados para a produção de celulose bacteriana, assim como sua respectiva fonte de carbono, suplementação, tempo de cultivo e rendimento obtido para cada autor nas condições otimizadas de processo.

Microrganismo	Fonte de carbono	Suplementação	Tempo de cultura	Rendimento	Literatura
<i>Glucoacetobacter xylinum</i> BC-11	Vinhaça	Fontes de nitrogênio e/ou minerais	5-7 dias	400 g/L*	Zhao <i>et al.</i> (2018)
<i>Glucoacetobacter xylinum</i> ATCC 53582	Frutas podres e soro de leite	Com e sem meio Hestrin-Schramm (HS)	3 – 4 dias	60 g/L**	Jozala <i>et al.</i> (2015)
<i>Glucoacetobacter xylinum</i> ATCC 53582	Glicerol, Glicose	Sais	2-4 dias	5,97 g/L** e 4,97 g/L**	Zhong <i>et al.</i> (2013)
<i>A. xylinum</i> BRC 5	Glicose	Etanol e oxigênio	2 dias	15,4 g/L**	Son <i>et al.</i> (2001)
<i>Acetobacter</i> sp. A9	Glicose	Etanol	8 dias	15,2 g/L**	Hwang <i>et al.</i> (1999)
<i>G. hansenii</i> PJK (KCTC 10505 BP)	Glicose	Oxigênio	2 dias	1,72 g/L**	Jung <i>et al.</i> (2005)
<i>Komagataeibacter hansenii</i> ATCC 23769	Suco de sisal	Fonte de nitrogênio	10 dias	3,38 g/L**	Lima <i>et al.</i> (2017)

Fonte: Autores.

* referência em base úmida.

** referência em base seca.

Esses dados, apresentados na Tabela 1, demonstram a diversidade de bactérias produtoras, assim como os diferentes tipos de resíduos que podem ser empregados para o crescimento desses microrganismos, de modo a salientar a importância de pesquisas acerca do desenvolvimento de meios de cultura formulados a partir de materiais alternativos, como resíduos agroindustriais e co-produtos, a fim de maximizar a produção de celulose bacteriana.

3.2 Fisiologia da *G. xylinus* e biossíntese de celulose

De acordo com Chawla *et al.* (2009) e Fijałkowski *et al.* (2016), a *G. xylinus* é uma bactéria gram-negativa, pertencente à família *Acetobacteriaceae*, sendo aeróbica estrita, que se desenvolve na forma de bastonetes e possui a capacidade de excretar celulose. Seu *habitat* natural são frutos e vegetais em processo de decomposição, mas também pode ser encontrada em chás fermentados, como na kombucha (DONINI *et al.*, 2010).

A excreção da celulose funciona como um mecanismo de flotação, uma vez que o microrganismo é capaz de se manter na interface ar/líquido a fim de obter oxigênio para o seu desenvolvimento (DONINI *et al.*, 2010).

Rangaswamy *et al.* (2015) relataram que no cultivo em placa da bactéria *G. xylinus* produziu colônias arredondas, elevadas, com coloração rosa, consistência/aparência mucoide, possuindo opacidade translúcida e quando visualizada em microscópio apresentou motilidade. Ademais, não foi relatado pelos autores a formação de esporos por essa bactéria.

Para a produção de celulose, o microrganismo possui uma regulação enzimática complexa, dirigida por diferentes enzimas, as quais ainda não tem seus mecanismos totalmente elucidados com relação a polimerização (CHAWLA *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2014). De acordo com Donini *et al.* (2010), a biossíntese pode ser dividida em três etapas, sendo a primeira correspondente a polimerização dos resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4) glucana. Já na segunda etapa, ocorre a excreção das cadeias lineares e na terceira há organização e cristalização das cadeias de glucanas, por meio de ligações de hidrogênio intercaladas, resultando em uma estrutura tridimensional resistente denominada de microfibrila (ROSS *et al.*, 1991).

Para a biossíntese de celulose existem duas vias metabólicas muito importantes, sendo elas a via das pentoses fosfato e do ciclo de Krebs, uma vez que essas são responsáveis por fornecer energia para o metabolismo. A primeira participa da oxidação dos carboidratos e a segunda realiza a oxidação de ácidos orgânicos (ROSS *et al.*, 1991).

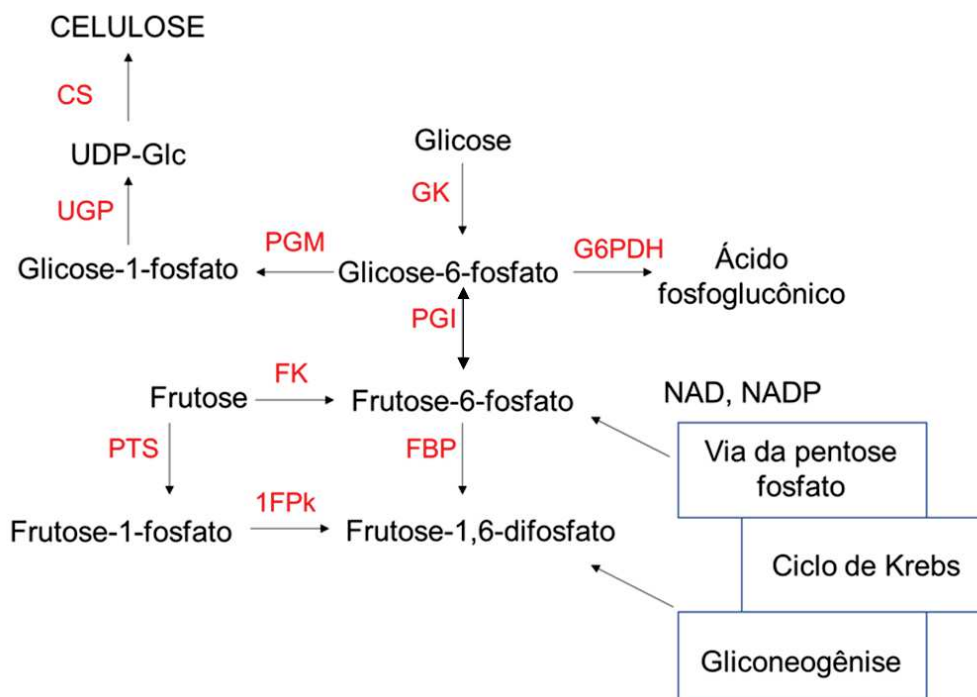
Vale ressaltar que a *G. xylinus* na ausência de oxigênio não consegue metabolizar glicose para produção de celulose, pois a enzima fosfofrutoquinase-1 (FBP), responsável por catalisar a reação de fosforilação da frutose-6-fosfato a frutose-1,6-difosfato, não tem função, o que inviabiliza a glicólise.

Dessa forma, a síntese de celulose é resultante pela assimilação de hexoses exógenas de modo direto e pelas vias metabólicas das Pentoses Fosfato e da Gliconeogênese de modo indireto (ROSS *et al.*, 1991).

A síntese de celulose, portanto, pode ocorrer a partir de fontes exógenas (glicólise) ou por fontes endógenas (gliconeogênese). De maneira geral, por meio de fontes exógenas, a glicose é transportada para o citoplasma da bactéria e catalisada por quatro enzimas, sendo elas: a glicoquinase (GK), responsável pela fosforilação do carbono 6 da glicose; a fosfoglicomutase (PGM), catalisadora da reação de isomerização da glicose-6-fosfato a glicose-1-fosfato; a pirofosforilase (UGP) que sintetiza a UDP-glicose e a celulose sintase (CS) responsável por produzir celulose a partir de UDP-glicose (ROSS *et al.*, 1991 e CHAWLA *et al.*, 2009). Um esquema simplificador do processo é ilustrado na Figura 1.

Já a síntese por fontes endógenas ocorre por meio do oxalacetato, pela via do Piruvato a partir de um mecanismo de regulação enzimático que converte o piruvato a fosfoenolpiruvato (DONINI *et al.*, 2010; ROSS *et al.*, 1991).

Figura 1 - Via simplificada de biossíntese da celulose.



Legenda: Partindo da glicose como fonte de carbono, parte do metabolismo é desviado para produção de celulose por meio das enzimas GK (glicoquinase), PGM (fosfoglicomutase), UGP (pirofosforilase), CS (celulose sintase) e a outra parte é desviada para manutenção do metabolismo, por meio de enzimas como a G6PDH (glicose-6-fosfato desidrogenase) responsável por obter intermediário usado na via das Pentoses Fosfato; PGI (glicose-6-fosfato isomerase) e FBP (frutose-1,6-bifosfato-fosfatase). Partindo da frutose as enzimas FK (frutoquinase), PTS (sistema de

fosfotransferases), 1FPk (frutose-1-fosfato quinase) são ativadas. NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) são derivados da oxidação de moléculas para obtenção de energia.

Fonte: Adaptado de Chawla *et al.* (2009).

De acordo com Donini *et al.* (2010) a síntese de celulose bacteriana é um processo que consome cerca de 10% da energia gerada para o metabolismo bacteriano e por isso a celulose é preferencialmente produzida por metabolismo aeróbico.

3.3 Meios de cultivo para isolamento de microrganismos produtores de celulose bacteriana

Como explanado anteriormente, um dos locais com possível presença de bactérias produtoras de celulose são os chás fermentados de cultura simbiótica de kombucha, podendo-se obter o(s) microrganismo(s) de interesse a partir da mesma. De acordo com Shade (2011), o isolamento de microrganismos provenientes do chá de kombucha pode ser feito a partir de meio de cultivo específico sob crescimento em placas contendo carbonato de cálcio a 30°C, que ajuda na identificação dos ácidos por meio da formação de halos, visto que as bactérias produtoras de celulose presentes na kombucha são acéticas.

Há relatos na literatura de utilização de meios de cultivo diferentes Hestrin-Schramm (HS) acrescido de cicloheximida, *malt extract agar* (MEA), *yeast extract-peptone-dextrose* (YPD) acrescido de tetraciclina e *glucose yeast CaCO₃* (GYC), sob condições aeróbicas a 25-28°C, com o intuito de isolar bactérias e leveduras da kombucha e verificar se as mesmas produziram o filme celulósico (SANTOS, 2016).

Foi reportado por Liu *et al.* (2018), Zhong *et al.* (2013), Florea *et al.* (2016), Chandrasekaran *et al.* (2017) e Jozala *et al.* (2015) o meio HS como meio seletivo para *G. xylinus*.

Fijałkowski *et al.* (2016) mencionaram que a eficiência de produção de celulose pode ser otimizada por meio de mudanças das características do meio (temperatura, tempo de cultivo, substratos), no entanto são poucos trabalhos reportados na literatura que descrevem essas mudanças.

3.4 Metodologia de identificação molecular

Além da identificação de microrganismos através de meios de isolamento, também temos a identificação a nível molecular, a qual baseia-se em reações de amplificação de regiões específicas do DNA (ácido desoxirribonucléico) pela técnica de PCR (em português: Reação em Cadeia de Polimerase) e pela utilização de sequências iniciadoras (*primers*), sendo necessária a extração prévia do DNA do microrganismo de interesse por meio de kits de extração, que têm por função romper a membrana celular e segregar o DNA dos demais componentes celulares, (SANTOS, 2016).

A PCR, simplificada, consiste em três etapas: desnaturação da sequência de DNA (ácido desoxirribonucléico), obtida do microrganismo de interesse; que tem por função romper as pontes de hidrogênio que compõe o DNA por meio do aquecimento a 94-95°C; seguidamente, em uma temperatura mais amena ocorre o anelamento dos *primers* às sequências de DNA desnaturadas que serão posteriormente amplificadas pela ação da enzima DNA polimerase, obtendo-se várias cópias do DNA de interesse (PLOBET *et al.*, 2000).

O DNA amplificado é analisado por eletroforese em gel de agarose, a fim de identificar se houve amplificação e, posteriormente, realiza-se a técnica de sequenciamento automático, que tem por função identificar os nucleotídeos presentes na fita de DNA, bem como sua ordem, possibilitando a obtenção de uma sequência nucleotídica, a qual é comparada com banco de dados com o intuito de identificar o microrganismo (PLOBET *et al.*, 2000).

O que diferencia a identificação de bactérias e leveduras é a utilização dos *primers*, uma vez que as sequências de leveduras geralmente são do DNA ribossomal, que apresenta regiões conservadas separadas por domínios ou espaçadores, denominados *ITS (internal transcribed spacers)*, sendo esse utilizado como *primers* já que antecede a região conversada do DNA de interesse. Por outro lado, para bactérias utiliza-se o *primer* 16S rDNA que antecede as regiões de interesse (SANTOS, 2016).

3.5 Meios de cultivo alternativos

O Brasil é um país essencialmente agropecuário devido a sua localização, clima e território disponível, possuindo destaque na produção de grãos em geral, bem com

proteína animal. Segundo o departamento de agricultura dos Estados Unidos (USDA), o Brasil é o terceiro maior produtor de cortes de frango do mundo, tendo uma produção de 13.690 mil toneladas no ano de 2019 e é o maior exportador de carne dessa categoria no mundo.

De acordo com a Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro (AGROSAT, 2019), o estado do Paraná é o maior produtor e exportador do Brasil, produzindo cerca de 4.313 mil toneladas de frango de corte, o que corresponde a 31,92% da produção total do país, no ano de 2019.

Os frangos de corte são criados em galpões bem ventilados, com boa drenagem hídrica e disposto de maneira vertical no sentido leste-oeste para evitar incidência de luz no período mais quente do dia, ajudando no controle de temperatura, estes ainda permanecem no referido local durante o período de engorda. Após, eles são insensibilizados, degolados, escaldados, depenados e seguem para processos industrial de cortes (ESPÍNDOLA, 2008).

Considerando as etapas anteriormente citadas há uma geração elevada de resíduos, principalmente em relação as penas de frango. Em um processo de depenagem de 1000 frangos são recuperadas, em média, 250 kg de pena. Desse modo, estas ganham um destaque especial, pela quantidade produzida e potencial a ser utilizado devido principalmente às características de sua composição. O processo tradicional empregado nos aviários para destino final das penas é a incineração ou produção de farinha para emprego em rações animais, o que possui como entrave o alto grau de processamento para que os nutrientes estejam disponíveis para absorção animal (MINUTTI, 2018).

Outra atividade de destaque no Brasil é a produção de açúcar e etanol que têm como matéria prima a cana-de-açúcar. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2019), a estimativa para colheita da safra 2019/2020 será de 615,98 milhões de toneladas de cana, tendo uma perspectiva para produção de açúcar de 31.796,6 mil toneladas e de etanol igual a 30,31 bilhões de litros. Um dos co-produtos gerados pela produção de açúcar é o melaço provindo da etapa final de fabricação, sendo este um líquido viscoso, denso, de cor escura e com 72% (m/v), em média, de constituintes orgânicos, na maioria açúcares, além de compostos inorgânicos.

Devido ao desenvolvimento tecnológico, grande parte das indústrias de açúcar são acopladas a usinas de etanol, sendo o melaço destinado para fermentação com

finalidade de produzir combustível (VILELA, 2016). Por se tratar de um substrato rico em açúcares e de baixo custo, este tem despertando interesse nas pesquisas, sendo empregado como fonte de nutrientes alternativa em processos fermentativos, como na produção de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* (FELTRIN *et al.*, 2000), ou na produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis* (Ernandes, 2009).

3.6 Características da celulose bacteriana e suas aplicações

A celulose, formada por β -D-glicopiranoses unidas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4), é um polímero abundante no mundo com larga produção e encontrada em diversas formas de vida, dentre elas, plantas, fungos, protozoários e procariontes (DONINI *et al.*, 2010).

Esse polímero pode ser classificado em celulose complexa e celulose pura. A primeira, geralmente, provém da parede celular de plantas contendo impurezas como hemicelulose, lignina e pectina, sendo conhecida como celulose vegetal. Por sua vez, na segunda classificação enquadra-se a celulose bacteriana (DONINI *et al.*, 2010). A diferença é que a celulose bacteriana é livre de outros constituintes como a hemicelulose, a lignina, além de possuir nanoestrutura fibrilar única conferindo-lhe propriedades distintas da celulose vegetal (JOZALA *et al.*, 2011).

Algumas características da celulose bacteriana são: flexibilidade, atoxicidade, presença de hidroxilas facilitando ligações com diferentes grupos funcionais, resistência mecânica, porosidade reduzida e, apesar de ser insolúvel em água, possui afinidade por esse solvente (COIMBRA, 2016).

Segundo Costa e Biz (2017), em razão de suas características, a celulose bacteriana possui uma ampla gama de aplicações que se estende desde áreas alimentícias, cosméticas, indústria têxtil, eletrônica até utilizações mais complexas, como nas áreas biomédicas.

A celulose bacteriana começou a ser incorporada como alimento nas Filipinas por meio da nata de coco. Depois, passou a ser mais utilizada, devido sua textura e alto teor de fibras, e também na produção de chás fermentados (kombucha), a fim de promover melhorias a saúde. Além disso, ela pode ser aplicada como estabilizante e espessante alimentício (CHAWLA *et al.*, 2009).

De acordo com o estudo de Almeida (2010), a celulose bacteriana juntamente a fécula de batata pode ser empregada como biofilme na proteção de morangos

melhorando a estabilidade física, química e microbiológica da fruta por meio de método combinado (refrigeração e biofilme).

Também existem aplicações voltadas para a preservação do meio ambiente, que é exemplificado no trabalho de Tonetto (2018). Segundo este autor, a celulose bacteriana foi utilizada como adsorvente para remoção do corante Indigo Carmine, empregado na indústria têxtil nas etapas de tingimento. Esse corante é constituinte de água residuária da indústria têxtil, que por sua vez é altamente poluente, pois turvam a água impedindo a penetração dos raios solares afetando negativamente os seres vivos presentes.

Outra perspectiva é a utilização desse biopolímero na área eletrônica. A celulose produzida por *G. xylinus* foi empregada para preparação de derivados celulósicos e posterior confecção de dispositivos flexíveis de emissão de luz (FOLED) obtendo resultados satisfatórios com possíveis aplicações para confecção de e-paper e e-book (OLIVEIRA, 2013).

Devido a sua biocompatibilidade, possibilidade de ser moldada e hidrofiliçidade, entre outras características já citadas, a celulose bacteriana é uma matriz ideal para dispositivos médicos na cura de lesões dérmicas, regeneração celular, engenharia de tecidos, enxertos, substituto temporário de pele, curativos para queimaduras, lesões e úlceras protegendo contra infecções, além de acelerar o processo de cicatrização (JOZALA *et al.*, 2011).

Pigossi (2014) estudou a utilização de uma matriz de hidrogel de celulose bacteriana acrescida de hidroxiapatita, com um osteocondutor e dois tipos de peptídeos de crescimento osteogênico (OGP), que podem possuir propriedade osteoindutora. Nesse sentido, o trabalho citado buscou avaliar a utilização dessas matrizes em diferentes combinações para regeneração de defeitos críticos na calvária de camundongos, obtendo como resultado um potencial de reparação ósseo com formação de novos tecidos ósseos nos camundongos nos locais aplicados.

Zanotti (2017) desenvolveu uma cobertura com celulose bacteriana juntamente a um medicamento anti-inflamatório (Ibuprofeno) para aplicação em áreas da pele lesadas ou queimadas. Os testes foram realizados em pacientes com feridas crônicas vasculogênicas de membros inferiores totalizando 17 feridas tratadas. De acordo com o autor, houve redução da área ferida e da dor em 10 feridas, cicatrização total em três e aumento da área em cinco, que pode ter ocorrido devido a etapa de debridamento do processo cicatricial (processo de preparação para cicatrização). Apesar disso, a

cobertura desenvolvida apresentou característica ideal que pode favorecer a cicatrização.

Dessa maneira, pode-se perceber que existem inúmeras aplicações relacionadas a celulose bacteriana e, em contrapartida, ainda existe muito a ser esclarecido e estudado em relação ao biopolímero, visto que a maior parte das aplicações ainda se encontram em fase de bancada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do microrganismo e avaliação da formação de biofilme

4.1.1 Ensaio a partir do isolamento, identificação e cultivo de microrganismo(s) da cultura de kombucha

Para o isolamento, identificação dos microrganismos oriundos da cultura de kombucha foram realizados três experimentos empregando-se diferentes meios de cultivo, conforme é reportado abaixo.

A) Meio de cultivo tradicional – HS (Hestrin-Schramm)

A fim de isolar microrganismo(s) produtor(es) de celulose bacteriana, coletou-se uma amostra do chá fermentado de kombucha de origem doméstica da cidade de Toledo-PR, conforme ilustra a Figura 2. Nesta, além do chá fermentado, pode-se observar o *Scoby* presente durante a amostragem.

Figura 2 - Representação da amostra de bebida fermentada (kombucha) em chá verde com hibisco (A); Película formada no cultivo – *Scoby* (B).



Fonte: Autores.

O chá fermentado cedido para o presente trabalho foi composto por (g/L): chá verde (14), hibisco (3) e açúcar cristal (67). Homogeneizou-se a bebida e aguardou-se até que a solução atingisse temperatura de 30°C. Paralelamente, foram higienizados, com água quente, sabão e álcool, um frasco de vidro e peneira. Após a solução atingir 30°C, as folhas dos chás verde e hibisco foram peneiradas a fim de serem retiradas da solução. Assim, o meio obtido foi transferido para um frasco de vidro no qual se adicionou um *Scooby* e 10% (v/v) de chá fermentado, obtido previamente. O meio foi incubado a 30°C por 15 dias.

Posteriormente, retirou-se uma alíquota do meio e realizou-se uma diluição prévia de 10^{-1} em solução salina 0,9% (p/v) em um frasco Erlenmeyer estéril. A amostra foi mantida a 30°C em incubadora com agitação orbital a 150 rpm por 30 minutos, com o intuito de homogeneizar a amostra e propiciar um meio isotônico (COIMBRA, 2016).

Depois, realizou-se diluição seriada, com solução salina 0,9% (p/v), até 10^{-5} . Então, inoculou-se em placas de Petri com meio HS sólido, 100 µL das diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} na tentativa em se isolar microrganismos produtores de celulose (COIMBRA, 2016). Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo que a composição do meio HS está disponível no Anexo A deste trabalho.

Seguidamente, avaliou-se as colônias obtidas e escolheu-se as mais semelhantes visualmente com os microrganismos produtores de celulose encontrados na kombucha, segundo referencial teórico. Estriou-se essas colônias em novas placas de Petri com meio HS sólido.

Após obtenção de colônias isoladas, visualizou-se em microscópio óptico com o intuito de verificar a presença ou não de contaminantes, bem como observar a morfologia dos microrganismos isolados.

Desse modo, inoculou-se os microrganismos isolados com características semelhantes à literatura em meio HS líquido, sob as seguintes condições: 30 °C por 15 dias em BOD, com o intuito de avaliar se haveria ou não produção de biofilme celulósico (JOZALA *et al.*, 2015). Também realizou-se coloração de gram de acordo com metodologia proposta por Rangaswamy *et al.* (2015).

Com base nos resultados obtidos nas etapas anteriores, realizou-se a extração do DNA dos microrganismos isolados por kit comercial Promega (2019), segundo metodologia recomendada pelo fabricante.

Para tal, realizou-se reação de PCR, eletroforese e purificação seguiu-se metodologias de acordo com Herrera e Elizabeth (2018), a fim de identificar a região

16S da bactéria, purificá-la e sequenciá-la. No entanto, não foi possível isolar bactérias e sim leveduras, utilizando-se por tanto o primer ITS para extração do DNA.

Após a identificação do(s) microrganismo(s) obtidos a partir do isolamento do chá fermentado de kombucha, confrontou-se os resultados com os resultados encontrados na literatura.

B) Meios de cultivos secundários

Após a realização da etapa anterior, dois novos ensaios foram necessários, uma vez que os microrganismos identificados não corresponderam aos resultados esperados. Neste sentido, meios de cultivo alternativos de isolamento foram empregados, conforme descrito abaixo.

Primeiramente realizou-se a tentativa de isolamento em meio HS contendo antifúngico, tendo em vista que Santos (2016) reportou sucesso ao isolar microrganismo produtor de celulose bacteriana através do cultivo em meio HS contendo 0,015% (m/v) de cicloheximida (antifúngico que atua como inibidor do crescimento de leveduras). Desse modo, empregou-se 0,01% (m/v) de Fluconazol[®] comercial para isolamento de microrganismo produtor de celulose, uma vez que não havia cicloheximida disponível para uso no laboratório da UTFPR-TD. Sendo assim, optou-se pela utilização de Fluconazol[®], posto que este também inibe a ação de fungos e leveduras, garantindo a preferência para crescimento de bactérias. A concentração utilizada de Fluconazol[®] foi calculada conforme especificação do Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica segundo Anvisa (2002).

Paralelamente, executou-se tentativa de isolamento em meio constituído por carbonato de cálcio e etanol, o qual tem sua composição em Anexo A, tendo em vista que estes constituintes, em conjunto, auxiliam na identificação da produção de ácidos pela formação de halos, uma vez que as bactérias produtoras de celulose são acéticas (SHADE, 2011).

4.1.2 Ensaios a partir de *Gluconacetobacter xylinus* (ATCC 23769)

Após a avaliação dos meios descritos no item 4.1.1, verificou-se a necessidade em se adquirir da Fundação André Tosello (FAT) a bactéria liofilizada

Gluconacetobacter xylinus 6424 da linhagem ATCC 23769. Posto que este microrganismo possui mesmo ATCC utilizado por LIMA *et al.* (2017) em seu estudo sobre a produção de celulose bacteriana a partir de suco de sisal como nutriente. Além disso, o próprio site da Fundação descreve tal cepa como produtora de celulose, conforme informações dispostas na Tabela 2.

Tabela 2 – Informações do CCT N°6417 (FAT, 2020).

Nº CCT: 6417
Histórico: ATCC 23769 =NCIB 8246 < J. Senez < M. Ascher; =BCRC 10589, BU 336, CCM 1808, CCRC 10589, CCTM 1670, CDBB 539, DSM 46602, FIRDI 589, IFO 14816, IMET 10313, LMG 1524, NBRC 14816, NCIM 2529, NCIMB 8246, RIA 813, Senez, TCC 23769, VTT E-92101
Crescimento: <u>Manitol Agar</u> ; 28°C
Taxonomia: Proteobacteria, Subdivision C1(Alpha Subclass). Bastonete Gram negativo
Bibliografia: 528 (Swings, J., 1992. The genera Acetobacter and Gluconobacter. In.: Balows, A; Trüper, H. G.; Dworkin, M.; Harder, W. & Schleifer, K-H. (eds) The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. 2nd ed., vol. III, p. 2268-2286. Springer, New York.).
Isolamento: Local Vinegar (Jerusalem, Israel).
Sinônimo: HOMOTYPIC SYNONYM: <i>Gluconacetobacter hansenii</i> (Gossele et al.) Yamada et al.; <i>Acetobacter hansenii</i> ; <i>Komagatabacter hansenii</i> ; <i>Komagatabacter kombuchae</i> ; <i>Komagataeibacter hansenii</i> . . HETEROTYPIC SYNONYM: <i>Gluconacetobacter kombuchae</i> ; <i>Komagataeibacter kombuchae</i> .
Cepa Tipo: Sim
Nome Alternativo: Deposited as: <i>Acetobacter xylinus</i> Yamada.
Informações: Nível de Biossegurança: 1. Production of cellulose (U.S. Pat. 4,942,128). Nucleotide (GenBank): M96060 <i>Acetobacter xylinum</i> cellulose synthase (bcsA) gene, partial cds, CMCax and CcpAx genes, complete cds. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/M96060). Nucleotide (GenBank): M98777 <i>Acetobacter xylinum</i> insertion sequence IS1030C encoding a putative transposase (ORF834), complete cds. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/M98777). Nucleotide (GenBank): M98778 <i>Acetobacter xylinum</i> insertion sequence IS1031D encoding a putative transposase (ORF834), complete cds. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/M98778). 16S rDNA (http://www.nbrc.nite.go.jp/NBRC2/SequencSearchServlet?ID=NBRC&CAT=00014816&DNA=2).

Fonte: Adaptado de Fundação Andre Tosello (2020).

Após o recebimento da cepa, procedeu-se a abertura da ampola, por meio de choque térmico em ambiente estéril, segundo as especificações contidas em documento enviado pela FAT. Da mesma forma, reidratou-se o liofilizado com 0,2 mL de água destilada estéril por 15 minutos, conforme especificações da mesma.

Seguidamente, transferiu-se o conteúdo da ampola para tubo de vidro contendo 5 mL de caldo Manitol estéril, o qual a composição está descrita em Anexo A e manteve-se o caldo com inóculo a 28°C em agitador orbital a 150 rpm por 24 horas, tempo no qual observou-se turvação do meio. Então, estriamento em ágar Manitol (segundo especificações do documento de reativação de cepas) foi realizado e a cultura transferida para *Erlenmeyer* de 125 mL contendo caldo Manitol estéril. Incubou-se a 28°C, a fim de propagar o cultivo.

Depois da reativação e propagação do microrganismo, iniciou-se as tentativas de produção de película a partir da cepa. Primeiramente, coletou-se uma colônia da placa previamente cultivada na etapa de reativação com o auxílio da alça de platina, inoculou-se em 50 mL de meio HS líquido e incubou-se em BOD a 28°C por 15 dias, conforme reportado por Donini (2011), o qual fez uso desta mesma cepa para produção de película celulósica. De forma similar Coimbra (2016) também empregou microrganismo semelhante (*Gluconacetobacter xylinus* - ATCC 23767) na produção de CB.

Não observando a formação de película pela metodologia descrita anteriormente, optou-se por utilizar meio contendo etanol, uma vez que a presença dessa substância poderia induzir a produção do polímero, conforme reportado na literatura por Shade (2011). Dessa forma, utilizou-se meio constituído por carbonato de cálcio e etanol (composição descrita no Anexo A) e inoculou-se 10% (v/v) de cultura líquida, mantendo-se o cultivo em BOD por 15 dias a 28°C.

4.1.3 Ensaios a partir de cultura mista de kombucha

Novos ensaios foram realizados frente ao não sucesso da formação de película pelo microrganismo adquirido da FAT, conforme metodologia descrita no item 4.1.2. Neste sentido, utilizou-se a cultura mista, isto é, chá fermentado oriundo da kombucha, o qual foi novamente cedido à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, conforme já descrito no item 4.1.1 A, para a produção de celulose. Para isso, preparou-se meio de cultivo HS, previamente estéril, adicionou-se 10% (v/v) de chá fermentado e incubou-se a 30°C por 15 dias.

Ademais, foram avaliados meios de cultivos alternativos, contendo melão de cana de açúcar e peptona de pena de frango, para produção de celulose, os quais estão descritos nos itens a seguir.

4.2 Obtenção e avaliação da suplementação nutricional dos meios de cultivo a partir de materiais oriundos da agroindústria

4.2.1 Obtenção de hidrolisado de pena de frango

As penas de frango empregadas no presente trabalho foram recolhidas na região oeste do Paraná e acondicionadas nos laboratórios da UTFPR-TD.

Inicialmente foi empregado um pré-tratamento nas penas, conforme metodologia descrita por Kurbanoglu e Kurbanoglu (2004). Esta metodologia baseia-se em lavar as penas com água deionizada, secá-las em estufa à 60°C e, posteriormente, proceder à trituração. Realizou-se essa última etapa com o auxílio de liquidificador para obtenção do pó de penas de frango (PP), o qual foi armazenado em sacos plásticos até o procedimento de hidrólise.

Para a hidrólise do PP utilizou-se metodologia adaptada descrita por Orak *et al.* (2018), na qual foram empregadas cinco etapas de hidrólise utilizando-se um total 95 g de PP, hidróxido de potássio (KOH) 2,5 M e ácido sulfúrico (H₂SO₄) 3 M.

Na primeira etapa utilizou-se 30 g de PP acrescidas de 150 mL de KOH. A mistura foi mantida em estufa a 60°C por 6 h. Após, acrescentou-se 25 g de PP, homogeneizou-se e a mistura foi resubmetida ao processo de hidrólise nas mesmas condições (60°C por 6 h). Passadas as 6 h, adicionou-se mais 25 g de PP a mistura alcalina, homogeneizou-se e manteve-se sob as mesmas condições. Após, novamente mais 15 g de PP foram adicionadas, homogeneizadas e mantidas em estufa por mais 6 h a 60°C. Por fim, resubmeteu-se a mistura, contendo um total de 95 g, em estufa a 120°C por 6 h. A mistura obtida apresentou-se viscosa e depois de 6 h, adicionar-se-á H₂SO₄ até a neutralização. As etapas descritas anteriormente são exemplificadas na Figura 3.

Para obtenção de um pó, secou-se o hidrolisado obtido em estufa a 45°C e triturou-se até a obtenção da peptona da pena de frango (PPF).

A porcentagem de conversão de pena de frango em peptona foi calculada pela Equação 1.

$$\%PF = \frac{P}{P_f} \times 100 \quad (1)$$

No qual:

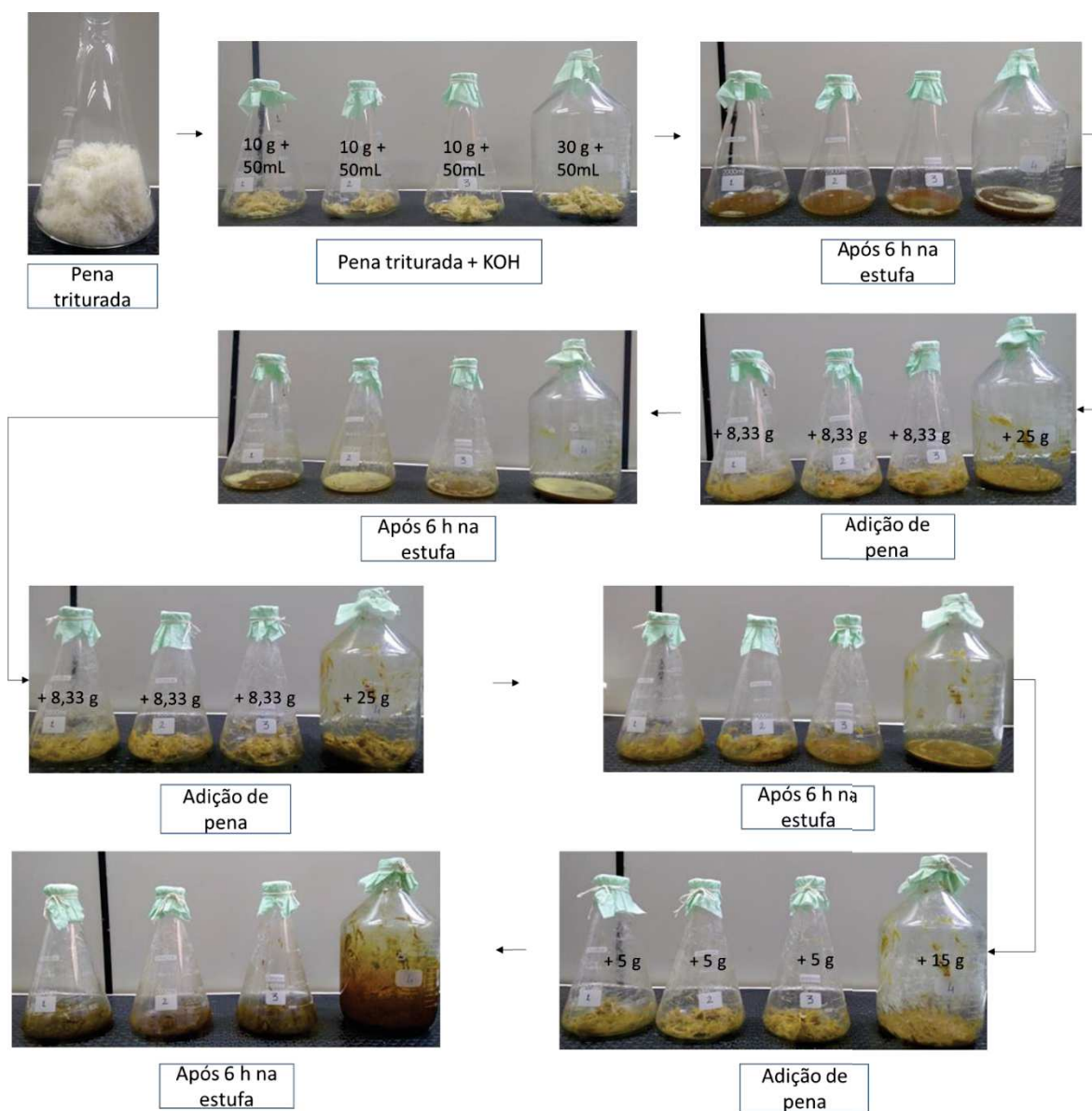
$\%PF$ = porcentagem de pena de frango convertida a peptona (%);

P = quantidade de penas utilizadas na hidrólise (g);

P_f = quantidade de peptona de pena de frango produzidas ao final de hidrólise (g).

Uma amostra do hidrolisado seco foi encaminhada ao Laboratório de Análises Agroambientais PrimorLab a fim de se determinar os teores de nitrogênio, fósforo e potássio.

Figura 3 - Fluxograma das etapas da hidrólise das penas de frango.



Fonte: Autores.

4.2.2 Obtenção de melaço de cana-de-açúcar

O melaço utilizado foi da região oeste do paraná. Diluiu-se o mesmo em água destilada, com o intuito de atingir a concentra o de sólidos totais equivalente ao meio de cultivo convencional (HS). Para tanto, preparou-se uma soluço de glicose na concentra o predita pelo meio de cultivo HS (20 g/L) e aferiu-se o  Brix desta soluço, com refrat metro de bancada. Posteriormente, o melaço foi diluído de modo que atingisse o mesmo  Brix da soluço de glicose. Utilizou-se a mesma propor o de dilui o encontrada na aferi o do  Brix para o preparo dos meios de cultivo que utilizariam melaço.

Uma amostra do melaço foi encaminhada ao Laboratório de Análises Agroambientais PrimorLab a fim de se determinar os teores de nitrogênio, fósforo e potássio.

4.2.3 Avalia o da suplementa o nutricional dos materiais oriundos da agroindústria como meios de cultivo

Com intuito de identificar se a utiliza o de meio de cultivo provindo de resíduo agroindustrial (pena de frango) e/ou co-produto (melaço de cana-de-a o) seria vantajosa na formula o de meio de cultivo, visando a obten o de celulose bacteriana, foram realizados experimentos em diferentes meios conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Formulação dos meios de cultivos para avaliação da produção de CB.

Experimento	Constituição	
	Fonte de carbono	Suplementação
A	HS (controle)	-
B	Melaço	-
C	Melaço	Fosfato dissódico, ácido cítrico e peptona
D	Melaço	Peptona de pena de frango (PPF), fosfato dissódico e ácido cítrico
E	Melaço	Peptona de pena de frango (PPF)
F	-	Peptona de pena de frango (PPF), fosfato dissódico e ácido cítrico
G	-	Peptona de pena de frango (PPF)

Fonte: Autores.

De acordo com a Tabela 3, verifica-se que a maior parte dos experimentos foram constituídos por meio HS ou por melaço e peptona, sendo que para os dois últimos se fez necessário realizar diluição prévia em água destilada, de modo que suas concentrações fossem similares ao meio convencional (HS).

O meio HS foi formulado baseado em Hestrin e Schramm (1953), sendo este constituído por (g/L): glicose (20), peptona de carne (5), extrato de levedura (5), fosfato dissódico (2,7), ácido cítrico (1,15). Os meios alternativos foram formulados, com suplementação ou não de fosfato dissódico (Na_2HPO_4), ácido cítrico e peptona, nas mesmas quantidades referentes ao meio convencional conforme variações especificadas na Tabela 3.

Os cultivos foram mantidos em BOD a 30°C por 15 dias. Após este período, os biofilmes foram tratados com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 N e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 1% (v/v) por uma hora a 80°C, posteriormente lavados com água destilada até obtenção de pH neutro, conforme metodologia reportada por Lima *et al.* (2017), com intuito de purificar as películas de restos celulares e de meio de cultivo.

Para o rendimento de CB considerou-se o peso seco das películas, para tal secou-se os biofilmes em estufa a 60°C até a obtenção de peso constante.

4.3 *Screening* de parâmetros sobre a formação de celulose bacteriana

Após a determinação das condições de cultivo que propiciaram a formação do biofilme, realizou-se um *screening* inicial, com a finalidade de avaliar quais as possíveis condições de cultivo como temperatura (T) e o tempo (t) poderiam influenciar o bioprocessamento em questão. Para tanto, criou-se uma matriz de planejamento experimental baseada no trabalho de Breitreitz, Souza e Poppi (2014), os quais fizeram uso de planejamento experimental similar ao desenvolvido no presente estudo.

A Tabela 4 exemplifica os níveis do planejamento experimental e a Tabela 5 os experimentos realizados.

Tabela 4 - Níveis do planejamento experimental 2^2 de acordo com as variáveis temperatura e tempo.

Variável	Níveis		
	-1	0	+1
T (°C)	30	45	60
t (dias)	7	14	21

Fonte: Autores.

Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental 2^2 com triplicata no ponto central.

Experimentos	T (°C)	t (dias)
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Fonte: Autores.

4.4 Análises físico-químicas

Utilizou-se a condição de cultivo obtida no item 4.3 que propiciou o melhor rendimento de celulose bacteriana para realização de análises físico-químicas como:

espessura, teor de umidade, intumescimento e solubilidade em água, os quais foram realizados conforme metodologias descritas a seguir em triplicata.

4.4.1 Espessura

Mensurou-se a espessura dos filmes celulósicos obtidos, com auxílio de paquímetro, conforme metodologia de Martelli (2005).

4.4.2 Teor de umidade

O teor de umidade foi determinado por método gravimétrico a 65°C por 48 h, segundo metodologia adaptada de Martelli (2005).

4.4.3 Intumescimento

Para determinação do intumescimento seguiu-se metodologia de Coimbra (2016), a qual consiste na obtenção de três amostras de 1 cm² do filme de CB, os quais foram primeiramente pesadas e, posteriormente, colocadas em frascos Erlenmeyers de 50 mL contendo 25 mL de água destilada. Armazenou-se em geladeira a 4°C e pesou-se periodicamente até obter-se peso constante. A taxa de intumescimento foi calculada utilizando-se a Equação 2.

$$TI = \frac{(m_u - m_s)}{m_s \cdot 100} \quad (2)$$

Onde:

TI = taxa de intumescimento (%);

m_s = massa inicial (g);

m_u = massa final (g).

4.4.4 Solubilidade em água

A fim de quantificar a porcentagem de solubilidade da CB em água, utilizou-se a metodologia proposta por Coimbra (2016). Para tal, recortou-se três amostras de 2 cm²

do filme de CB e pesou-se em balança analítica. Seguidamente, as amostras foram colocadas em frascos Erlenmeyers com 50 mL de água destilada por 24 h com agitações periódicas. Posteriormente, retirou-se a água, os filmes foram secos em estufa a 65°C por 24 h e pesados. Por fim, a porcentagem de solubilidade foi calculada pela Equação 3.

$$S = \frac{(m_0 - m_f).100}{m_0} \quad (3)$$

Na qual:

S = solubilidade em água (%);

m_0 = massa inicial (g);

m_f = massa final (g).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da produção de biofilme celulósico por microrganismos isolados da cultura de kombucha e cultura pura de *Gluconobacter xylinus*

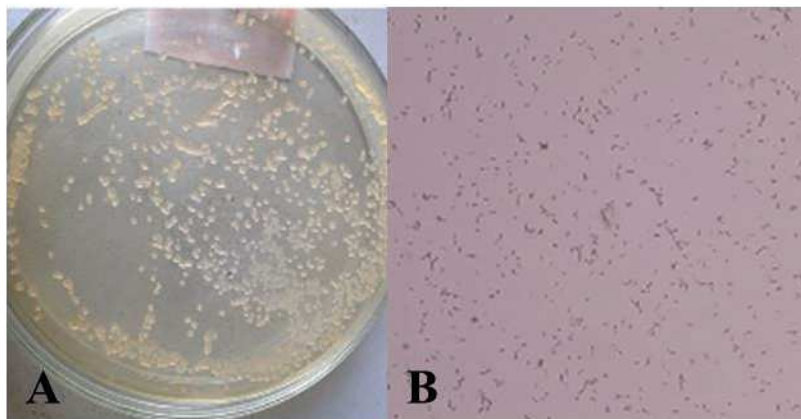
5.1.1 Isolamento, identificação e cultivo de microrganismo(s) da cultura de kombucha

A) Meio de cultivo tradicional – *Hestrin-Schramm* (HS)

Posterior à coleta de amostra da bebida fermentada cultivada em chá de verde com hibisco, conforme descrito na metodologia (item 4.1.1 A), realizou-se diluição seriada da amostra, a qual foi inoculada em meio HS sólido, na tentativa de isolar microrganismo(s) produtor(es) de celulose bacteriana com similaridade aos descritos na literatura. A Figura 4 exemplifica as características visuais almejadas no isolamento de *Gluconacetobacter xylinus*, a qual é reportada como uma das espécies mais estudadas, por ser uma excelente produtora de celulose. Trata-se de uma bactéria com forma bacilar (0,5 µm a 1,0 µm por 2,0 µm a 10,0 µm), Gram-negativa e aeróbia estrita (KADERE et al., 2008; TOMITA e KONDO, 2009). As células podem ser encontradas sozinhas, em pares, em cadeia ou em pequenos aglomerados, quando móveis têm flagelos peritríquios e sintetizam celulose (GARRITY, 2005).

As bactérias dos gêneros *Acetobacter* e *Komagataeibacter* também são reportadas pela produção de celulose bacteriana, sendo as bactérias acéticas as mais encontradas. Estas também podem se apresentar na forma de bastonetes únicos, em pares ou em cadeia, são estritamente aeróbicas bem como gram-negativas, como está representado na Figura 4. O crescimento ótimo destas bactérias, ocorre entre 25-30°C sendo estas responsáveis pela degradação do etanol a ácido acético (GOMES et al., 2017).

Figura 4 - Exemplificação das características morfológicas da bactéria *Gluconacetobacter xylinus* baseadas na literatura.



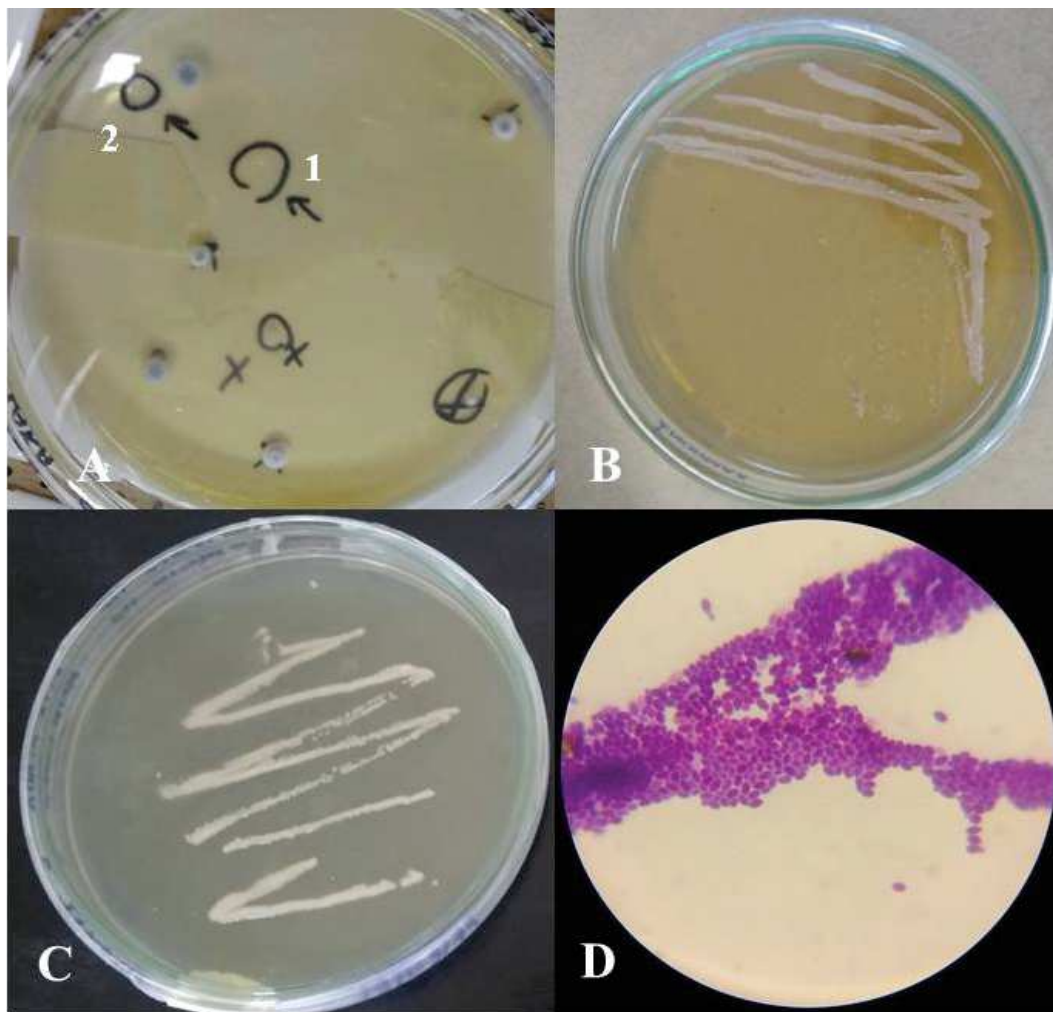
Legenda: A - colônias translúcidas, brilhantes e redondas; B - microscopia da coloração gram-negativa do *G. xylinus* em aumento de 400x.

Fonte: Adaptado Zhang *et al.* (2018).

Segundo Coimbra (2016) o meio HS é seletivo, uma vez que induz a produção de celulose, de modo que as bactérias produtoras do polímero utilizam a fonte de carbono juntamente ao ácido cítrico. De acordo com a literatura a biossíntese de celulose é dependente de duas vias anfibólicas: a via das pentoses e o ciclo de Krebs. Dessa maneira, a glicose presente no meio é um açúcar de rápida e fácil assimilação, sendo oxidado na via das pentoses, enquanto o ácido cítrico (ácido orgânico) é oxidado no ciclo de Krebs, sendo que a produção de celulose só ocorrerá na presença de oxigênio. Tal fato se deve à característica da bactéria só conseguir assimilar glicose aerobicamente devido a carência da enzima fosfofrutoquinase-1, tornando a produção do polímero um mecanismo de flotação que as permitem estar na interface líquido-ar promovendo seu crescimento. Ademais, os outros constituintes são necessários para o metabolismo primário do microrganismo (DONINI, 2010).

Desse modo, após a inoculação da amostra (kombucha) em meio HS, selecionou-se as colônias com similaridade às aquelas mostradas na Figura 4 e realizou-se esgotamento até obtenção de colônia pura, estriamento e coloração de gram, conforme está apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Etapas de obtenção de colônias por meio da diluição seriada da kombucha, esgotamento, estriamento e coloração de gram.



Legenda: A - representa uma das placas de diluição seriada da qual fez-se o estriamento das colônias demarcadas com 1 e 2; B - esgotamento de uma das colônias; C- estriamento de uma das colônia e D coloração gram de um dos microrganismos isolados com aumento de 400x em microscópio óptico.

Fonte: Autores.

A partir das aparências morfológicas representadas na Figura 5, podemos observar que as colônias assinaladas (1 e 2) eram translúcidas, redondas e de aspecto brilhante, conforme reportado na literatura (COIMBRA, 2016). Deste modo, estas foram escolhidas para estriamento, porém, além das colônias apresentadas na Figura 5 foi isolada também uma outra colônia na placa cultivada em duplicata com os mesmos aspectos, sendo essa denominada colônia 3 (Ilustração não apresentada).

De acordo com os resultados, detectou-se que as mesmas eram aglomerados de bastonetes gram-negativos, condizendo com os aspectos esperados, conforme está apresentado na Figura 5-D. Então, prosseguiu-se com teste de produção de película

em meio líquido HS, sendo que os microrganismos isolados, apresentaram aparentemente a formação de uma fina película. Desse modo, iniciou-se a identificação dos mesmos por técnicas de biologia molecular.

Primeiramente, acreditava-se que as colônias obtidas eram bactérias, devido a todas características encontradas até o momento, no entanto, na reação de amplificação do DNA, constatou-se que as mesmas eram leveduras devido ao não pareamento da sequência 16S (específica de bactérias). Dessa maneira, realizou-se amplificação do primer adequado a leveduras (ITS) e, após sequenciamento, alinhamento e edição da sequência utilizando o programa *Bioedit* e comparação com sequências de ITS em bancos de dados de DNA utilizando-se o algoritmo *Blast*, disponível no site do NCBI, identificou-se os microrganismos isolados, conforme ilustra a Tabela 6. Após a identificação dos micro-organismos, um novo plaqueamento foi realizado (Figura 6).

Tabela 6: Microrganismos isolados identificados como 1, 2 e 3.

Microrganismo	Identificação no Banco de dados	Similaridade (%)
A	<i>Pseudozyma aff. pruni</i>	99,72
B	<i>Pseudozyma aff. pruni</i>	99,72
C	<i>Sporidiobolus pararoseus</i> .	100

Fonte: Autores.

Figura 6 - Plaqueamento das amostras após identificação molecular.



Fonte: Autores.

Assim, de acordo com os resultados encontrados, verificou-se que a aparência das colônias, previamente identificadas no início dos experimentos (Figura 5-A) foram

parcialmente preservadas nos plaqueamentos da Figura 6-A e 6-B, diferindo da Figura 6-C, uma vez que esta apresentou coloração alaranjada. Inicialmente a mesma aparentava ser incolor na placa de isolamento, no entanto após esgotamento observou-se colônias alaranjadas.

Ademais, por meio de comparação com o banco de dados, identificou-se que o microrganismo A possuía 99,72 % de semelhança com *Pseudozyma aff. pruni*, que segundo banco de dados *Blast* foi isolada por Ribeiro (2009) em sua tese sobre a diversidade de leveduras no manejo da cana-de-açúcar; e apresentou 86,62 % com a levedura *Kalmanozyma brasiliensis* ou *Pseudozyma brasiliensis* a qual está registrada no banco de dados por diversos autores. É importante ressaltar que a última levedura citada foi o segundo microrganismo mais próximo, em grau de semelhança, com a sequência pesquisada e por essa razão está sendo reportada acima.

De acordo com Liou *et al.* (2009) a *P. pruni* é observada em placa como colônia irregular, enrugada, gelatinosa, alaranjadas ou branca pálidas, com células elipsoidais, cilíndricas ou fusiformes, sendo essas características semelhantes ao microrganismo isolado no presente estudo (Figura 6 - microrganismo A). Já as características reportadas em relação à *P. brasiliensis* referem-se à mesma ser produtora de bioetanol a partir da degradação de xilose, o que a torna bastante interessante no emprego para degradação de materiais lignocelulósicos e produção deste biocombustível, assim como para obtenção de xilanases (enzimas que degradam a xilose) (SANTOS, 2018).

Com relação ao segundo microrganismo isolado (Figura 6 - microrganismo B), verificou-se o mesmo resultado que o microrganismo um (Figura 6 - A), concluindo-se que os dois se tratavam do mesmo.

O terceiro microrganismo (Figura 6 - microrganismo C), apresentou 100% de semelhança com o *Sporidiobolus pararoseus*. Levedura, que segundo Borba *et al.* (2018), possui coloração vermelha, característica detectada na levedura isolada no presente trabalho, e produtora de carotenoides, sendo explorada para produção destes pigmentos em meio de cultivos alternativos como: melão de cana-de-açúcar e resíduos da colheita de milho.

A fim de se verificar novamente a formação do “biofilme”, um novo cultivo foi realizado e verificou-se que a fina camada formada em meio líquido não eram películas de celulose e sim células flotas, visto que ao serem agitadas rapidamente as películas se rompiam e aderiam a parede do Erlenmeyer (Figura 7), o que não ocorreria

se as mesmas fossem filmes celulósicos, já que os mesmos possuem resistência mecânica (COIMBRA, 2016).

Figura 7 - Meio de cultivo HS líquido com formação de células flotadas, as quais ficaram aderidas ao vidro após serem agitadas.



Fonte: Autores.

B) Meios de cultivo secundários

Posteriormente, realizou-se outras duas tentativas de isolamento, sendo a primeira em meio contendo Fluconazol® e a segunda em meio contendo carbonato de cálcio, conforme descrito na metodologia (item 4.1.1 - B). A Figura 8-A e 8-B apresentam os resultados referente a estes cultivos.

Figura 8 - Microrganismo isolado em meio HS e Fluconazol® (A); Microrganismo isolado em meio contendo carbonato de cálcio (B).



Fonte: Autores.

Após o isolamento, ambos microrganismos foram cultivados em meio HS, entretanto, em nenhum dos cultivos foi possível observar a formação de película no

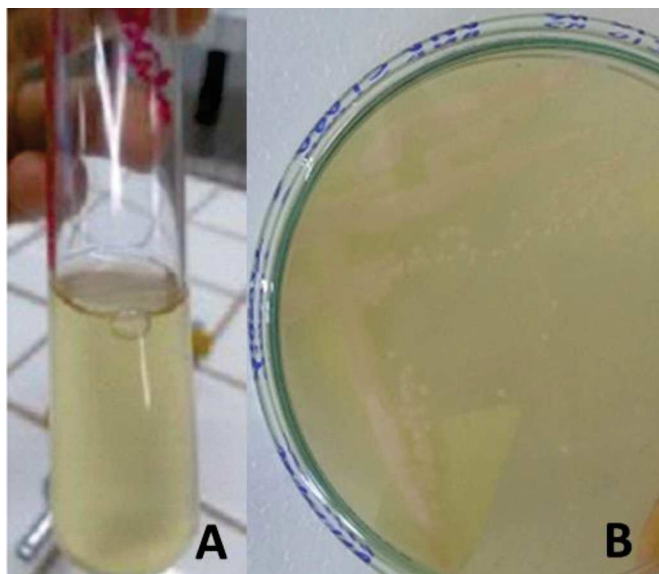
meio líquido. Diante do exposto, verificou-se que a bioprospecção de um microrganismo de interesse é uma atividade complexa, posto que a microbiota presente na kombucha é extremamente diversa possuindo não só bactérias, como leveduras, sendo os gêneros de levedura predominantes: *Saccharomyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Torulospora*, *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torula*, *Torulopsis*, *Mycotorulae* *Mycoderma*; e bactérias majoritariamente acéticas: *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter*, bem como já foram reportadas a presença de *A. xylinoides*, *A. pasteurianus*, *A. aceti*, *Bacterium gluconicum* *Gluconobacter oxydans* (SANTOS, 2016), tornando a possibilidade de isolamento estaticamente dificultada, conforme foi observado no presente trabalho.

Então, como não foi possível isolar o microrganismo da cultura de kombucha frente aos resultados anteriormente apresentados, optou-se por adquirir a bactéria *Gluconacetobacter xylinus* 6417, cujo a linhagem é ATCC 23769 e que é reportada na literatura como excelente produtora de biofilme, conforme descrito em trabalho de Donini (2011) e Coimbra (2016), esta último empregou microrganismo semelhante porém com ATCC diferente (*Gluconacetobacter xylinus* - ATCC 23767).

5.1.2 Cultivos a partir da aquisição de cultura pura de *G. xylinus* ATCC23769

Procedeu-se as orientações para reativação de cepa liofilizada, conforme disposto no item 4.1.2 e protocolos do Instituto para reativação de cepas. A Figura 9 apresenta a propagação do microrganismo em questão, sendo possível verificar uma leve turvação do meio (Figura 9-A). Em seguida, realizou-se a propagação deste para cultura sólida, na forma de estriamento, ilustrado na Figura 9-B, com o objetivo de verificar o crescimento da bactéria.

Figura 9 - Crescimento de *Gluconacetobacter xylinus* - ATCC 23767 em caldo Manitol (A) e ágar em Manitol (B).



Fonte: Autores.

Após a reativação do microrganismo descrito anteriormente, iniciou-se a tentativa de produção de película a partir da cultura recém repicada, uma vez que o meio de propagado não apresentou formação de película, conforme ilustrado em Figura 10.

Figura 10 - *Gluconacetobacter xylinus* - ATCC 23767 em caldo Manitol (propagação) após 15 dias de cultivo em BOD.



Fonte: Autores.

Novos cultivos foram realizados em meio HS na tentativa de observar a formação de biofilme, o que não foi notado, conforme ilustra a Figura 11.

Figura 11 - *Gluconacetobacter xylinus* - ATCC 23767 em meio HS após 15 dias de cultivo em BOD.



Fonte: Autores.

Uma última tentativa foi realizada com meio contendo etanol, conforme descrito na metodologia e reportado na literatura por Shade (2011). De acordo com os resultados, verificou-se, ao final do cultivo que, mais uma vez, não foi possível observar a formação de biofilme celulósico (Figura 12).

Figura 12 - *Gluconacetobacter xylinus* - ATCC 23767 em meio com etanol após 15 dias de cultivo em BOD.



Fonte: Autores.

Desta forma, verificou-se que apesar das inúmeras tentativas de meios de cultivo empregados no presente trabalho para que o microrganismo adquirido do Instituto André Tosello apresentasse a formação de biofilme celulósico, este comportamento não foi observado. Uma possibilidade é que o microrganismo não esteja expressando o gene de produção de celulose, apesar da literatura mencionar habilidade da bactéria em fazê-lo, isto provavelmente ocorreu devido a algum problema da própria cepa.

Neste sentido, realizou-se como um teste controle de produção de celulose a partir de cultura mista da kombucha em meio HS, o qual é reportado como meio ideal para produção de celulose (COIMBRA,2018) e foi possível observar a formação de película, conforme ilustra a Figura 13.

Figura 13 - Cultura mista de kombucha em meio HS após 15 dias de cultivo em BOD.



Fonte: Autores.

Portanto, é possível notar que não se trata de meio de cultivo com problema e sim da cepa adquirida do FAT. No entanto, reporta-se que a instituição foi notificada quanto às inúmeras tentativas realizadas e não se conseguiu uma resposta para tal comportamento, uma vez que um lote da mesma cepa apresentou formação de biofilme nos laboratórios da FAT, conforme informações recebidas pela orientadora do presente trabalho (dados não apresentados, informações pessoais).

Devido a mais este inconveniente com o microrganismo adquirido da FAT, os próximos experimentos do presente trabalho foram realizados a partir dos cultivos empregando-se a cultura mista de kombucha obtida no início dos experimentos, uma vez que todas as alternativas possíveis em se empregar uma cultura pura de microrganismo foram esgotadas.

5.2 Avaliação da produção de biofilme celulósico por microrganismos a partir da cultura mista de kombucha

Antes de iniciar-se os cultivos para obtenção de biofilme celulósico, diferentes meios de cultivos foram avaliados, visando o reaproveitamento de resíduo (pena de

frango) e co-produto (melaço de cana-de-açúcar), almejando-se um possível barateamento de meio de cultivo para produção de biofilme, bem como agregar valor aos materiais em estudo. Nesse sentido, foram necessárias diferentes etapas para estes experimentos, as quais consistiram desde o preparo dos meios de cultivos e avaliação de parâmetros como suplementação nutricional, tempo e temperatura de cultivo, conforme está apresentado a seguir.

5.2.1 Hidrólise das penas de frango

Para hidrólise da pena de frango seguiu-se metodologia conforme item 4.2.1. A Figura 14 ilustra o hidrolisado obtido antes e após sua secagem.

Figura 14: (A) Hidrolisado de pena de frango antes da secagem e (B) após este procedimento.



Fonte: Autores.

Após a obtenção do hidrolisado seco, este foi analisado quanto ao teor de nitrogênio, fósforo e potássio pela empresa PrimorLab, tendo como resultado os dados apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados da análise teor de nitrogênio, fósforo e potássio da peptona de pena de frango.

Análise	Resultado (%)
Nitrogênio total	9,63
Fósforo (P)	0,10
Pentóxido de fósforo (P₂O₅)	0,23
Potássio (K)	8,65
Óxido de potássio (K₂O)	10,42

Fonte: Autores.

A partir da equação 1, apresentada no item 4.2.1 pode-se calcular a porcentagem de conversão de penas e peptona, de maneira que a partir de 190 g de penas trituradas obteve-se 107 g de hidrolisado, representando uma conversão de 56,3%.

Por meio dos resultados obtidos podemos fazer um comparativo do hidrolisado com as concentrações de nitrogênio do extrato de levedura e peptona bacteriológica comerciais (os quais são fonte de nitrogênio no meio HS), assim como as respectivas quantidades necessárias para uso em meio HS. Essas comparações são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Comparativo do hidrolisado de pena com extrato de levedura e peptona bacteriológica com relação ao nitrogênio total.

Nutriente	Hidrolisado de pena de frango (Presente trabalho)	Extrato de levedura (REACTEC ®)	Peptona bacteriológica (INLAB ®)
Nitrogênio total (%)	9,63	12,93	15,40
Quantidade necessária para um litro de meio HS (g)	14,70	5,00	5,00

Fonte: Autores.

Por meio da Tabela 8 podemos perceber que considerando o extrato de levedura e a peptona bacteriológica como fontes de nitrogênio no meio HS e calculando a quantidade de nitrogênio total presentes em um litro de meio em razão desses nutrientes, foi possível estimar a quantidade necessária de hidrolisado caso esse fosse substituído no meio tradicional. Ao total seriam necessárias 10 g de fonte de nitrogênio tradicional em contraposição a 14,7 g de hidrolisado de pena, valor este aproximadamente 1,5 vezes maior.

Em contrapartida, o hidrolisado é uma fonte de nitrogênio provinda de um resíduo, o que desperta o interessante em seu uso, de modo que para sua produção depender-se-ia apenas de reagentes, recursos hídricos e elétricos, reduzindo o custo de produção, revenda e, conseqüentemente, do meio de cultura, uma vez que a matéria prima principal (penas de frango) são fornecidas gratuitamente.

Em média seria possível produzir 500 g de hidrolisado, levando em consideração o custo com reagentes, recurso hídrico e eletricidade, com preço de custo igual a R\$ 70,00 (setenta reais) – estimativa de cálculo em Apêndice A, em contraposição ao

custo médio de R\$ 500,00 (quinhentos reais) para a mesma quantidade de extrato de levedura e peptona bacteriológica comerciais (ForLabExpress, 2020).

Dessa forma, verifica-se o potencial para a utilização de penas na obtenção de hidrolisado, como fonte alternativa de nitrogênio, sendo então esta uma técnica promissora, possibilitando agregar valor a um resíduo e reduzir custos com o meio de cultura.

5.2.2 Caracterização do melaço de cana de açúcar

Conforme mencionado na metodologia (item 4.2.2), utilizou-se melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, nitrogênio e sais para a manutenção das atividades biológicas dos microrganismos. Os resultados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados da análise teor de nitrogênio, fósforo e potássio da peptona de pena de frango.

Análise	Resultado (%)
Nitrogênio total	0,11
Fósforo (P)	0,01
Pentóxido de fósforo (P₂O₅)	0,03
Potássio (K)	0,36
Óxido de potássio (K₂O)	0,43

Fonte: Autores.

De acordo com os resultados, verifica-se que o melaço de cana, além de uma fonte rica em carbono tem em sua composição sacarose, açúcar complexo formado por glicose e frutose, além dos elementos macroelementos essenciais (fósforo e potássio) apresentados na Tabela 9. Ao se comparar os resultados obtidos com a Especificação Técnica Brasileira dos Melaços Brasileiros (2019), Tabela 10, verificou-se que os do presente trabalho apresentaram composição inferiores. Tal fato pode ser justificado tendo em vista que a composição do melaço pode variar segundo a região de cultivo, o período da safra em que a cana-de-açúcar foi coletada e o fim para que esse melaço foi designado (NOGUEIRA et al.,2009).

Tabela 10 – Constituição elementar do melaço.

Elemento	Caracterização do melaço (presente trabalho)	Especificação Técnica Brasileira dos Melaços Brasileiros (2019)
Nitrogênio total (N)	0,11%	3,00%*
Potássio total (K)	0,36%	4,00%
Fósforo total (P)	0,01%	0,10%

Legenda: *teor de proteína bruta.

Fonte: Autores.

Apesar dos resultados com valores inferiores para o melaço quantificado no presente trabalho em comparação à especificação técnica (Tabela 10), o mesmo ainda assim se torna uma fonte de nutrientes muito interessante, principalmente devido ao seu valor comparado às fontes de carbono comerciais, como a glicose.

Segundo o canal de vendas MF Rural (2020), o quilograma do melaço da cana-de-açúcar custa cerca de R\$ 3,50 (três e cinquenta reais), enquanto um quilograma de glicose (marca Synth), custa R\$ 38,00, representando um valor quase noventa e duas vezes superior em relação ao melaço de cana-de-açúcar.

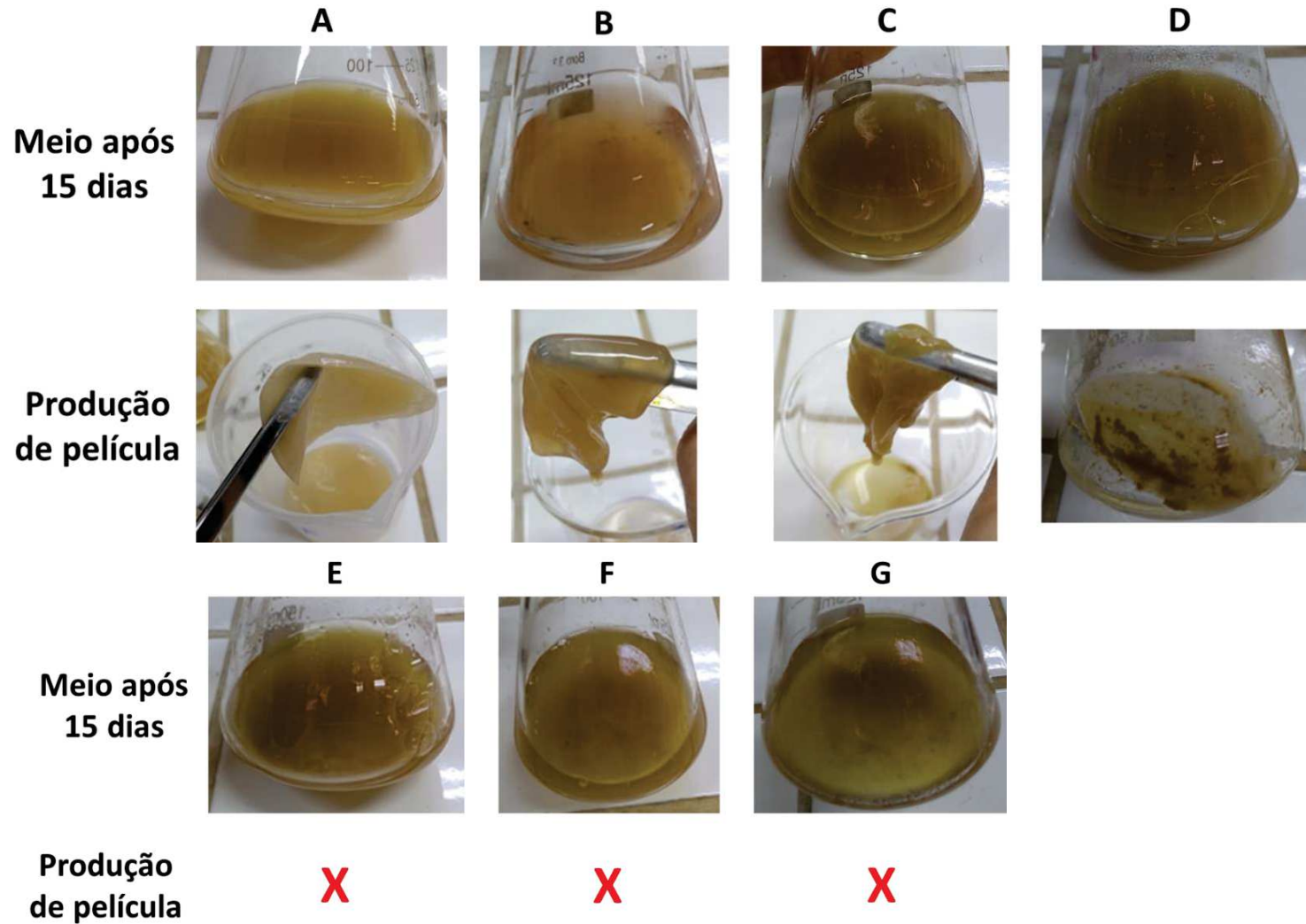
Além disso, a composição de açúcares do melaço também chama a atenção, uma vez que possui um teor de polissacarídeos redutores (glicose e frutose) e não redutores (sacarose) que ao serem adicionados a um meio de cultivo, como fonte de carbono para microrganismo produtor de celulose, não é de difícil assimilação, posto que na preparação caseira de chá fermentado (kombucha) usa-se sacarose (açúcar refinado), de complexidade similar à do melaço.

5.3 Produção de celulose bacteriana

Conforme experimentos descritos no item 4.3 da metodologia, deu-se sequência na realização das diferentes condições propostas (de A até G). Após 15 dias, analisou-se os meios quanto a produção de película celulósica. Os meios que apresentaram produção de película celulósica foram selecionados e as mesmas foram tratadas e secas individualmente a fim de determinar o peso seco.

Na Figura 15 tem-se a representação dos resultados dos meios em que houve ou não a produção de película celulósica e a Figura 16 apresenta como as mesmas ficaram antes e após o procedimento de secagem com o prévio tratamento.

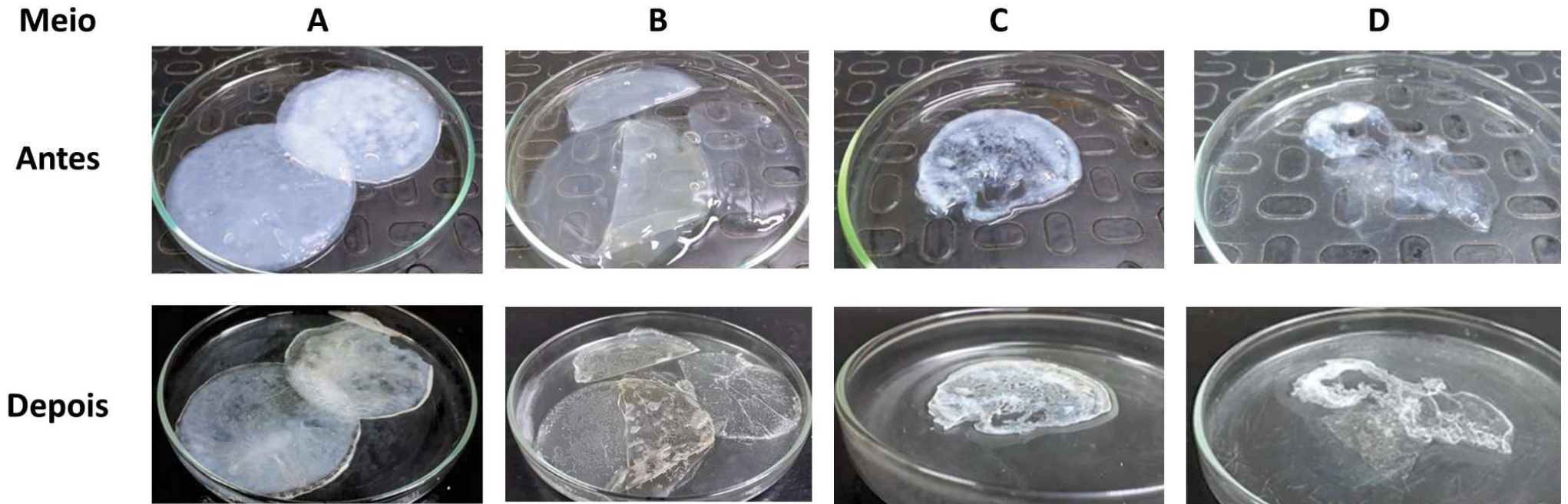
Figura 15 - Meios de cultivos após quinze dias com produção de biofilme ou não.



Legenda - Meio A – HS (controle); Meio B – Melaço sem suplementação; Meio C – Melaço suplementado com fosfato dissódico, ácido cítrico e peptona; Meio D – Melaço suplementado com Peptona da pena de frango (PPF), fosfato dissódico e ácido cítrico; Meio E – Melaço suplementado com PPF; Meio F – PPF, fosfato dissódico e ácido cítrico; Meio G – PPF; X corresponde a não observação de formação de película.

Fonte: Autores.

Figura 16 - Películas antes e após tratamentos obtidas dos diferentes meios de cultivos.



Legenda - Meio A – HS (controle); Meio B – Melaço sem suplementação; Meio C – Melaço suplementado com fosfato dissódico, ácido cítrico e peptona;

Meio D – Melaço suplementado com Peptona da pena de frango (PPF), fosfato dissódico e ácido cítrico;

Fonte: Autores.

A partir desses resultados percebe-se que os meios alternativos que melhores se desenvolveram foram os que tinham a presença de melaço, uma vez que apenas estes apresentaram formação de película celulósica.

Outrossim, uma explicação para o não desenvolvimento dos meios alternativos E, F e G, pode ter ocorrido devido a Reação de Maillard, que são reações nas quais as proteínas e açúcares são reduzidos durante processamentos térmicos (FINOT, 2005). Neste sentido acredita-se que durante a hidrólise das penas de frango pode ter ocorrido esse tipo de reação, tendo em vista que usou-se temperaturas elevadas para a obtenção da peptona (temperatura do último ciclo de hidrólise a 120°C), o que segundo Shibao e Bastos (2011) pode gerar a degradação das estruturas protéicas e formação de compostos tóxicos, como o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), o qual é reportado na literatura como inibidor da ação enzimática celular.

A produção de algum intermediário tóxico provavelmente poderia explicar o não desenvolvimento do biofilme nos meios citados e o desenvolvimento no meio D, isto porque, no meio D havia além de suplementação de melaço, a suplementação de ácido cítrico e fosfato dissódico, fontes de micro e macroelementos essenciais e de fácil absorção para o desenvolvimento microbiano, bem como, produção celulósica.

Atrelado a isso, outro fator inconveniente que pode ter comprometido os meios de cultivo constituídos por peptona da pena de frango foi a não dissolução completa da peptona na solução, afetando negativamente a disponibilidade de nitrogênio e também a concentração de peptona no meio, o que pode ter limitado e ou inibido a capacidade de desenvolvimento dos microrganismos.

Ainda com base nos resultados da formação de biofilme, realizou-se a pesagem das películas visando o cálculo de rendimento das mesmas, conforme descrito no item 4.2.3, sendo o resultado apresentado na Tabela 11.

Tabela 11 - Rendimento em peso seco para as películas produzidas nos meios A, B, C e D.

Meios	Rendimento das películas em peso seco (g)
A (controle)	0,0666
B	0,0612
C	0,0149
D	0,0118

Legenda: Meio A – HS (controle); Meio B – Melaço sem suplementação; Meio C – Melaço suplementado com fosfato dissódico, ácido cítrico e peptona; Meio D – Melaço suplementado com Peptona da pena de frango (PPF).

Fonte: Autores.

A partir da Tabela 11, pode-se afirmar que o meio de cultivo alternativo que apresentou melhor resultado foi o meio B, composto apenas por melaço. Vale ressaltar que, além deste meio ter apresentado maior percentual de rendimento, bem como, maior proximidade com o meio controle, esse também foi capaz de prover nutrientes essenciais para o desenvolvimento dos microrganismos produtores de celulose.

Partindo dos resultados anteriores, seguiu-se um *screening*, conforme disposto no item 4.3, com os meios que apresentaram produção de película (A, B, C e D), em condições variando-se a temperatura e tempo de cultivo. Ao final do experimento identificou-se produção de biofilme apenas na condição de 30°C nos períodos de 7 e 21 dias, não havendo crescimento a 45°C por 14 dias, nem a 60°C por 7 e 21 dias. Os resultados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados do *screening* para a produção de película (base seca (g)).

Experimentos	T (°C)		t (dias)		Produção de película (base seca (g))			
	Codificado	Real	Codificado	Real	Meio A	Meio B	Meio C	Meio D
1	-1	30	-1	7	0,38045	0,05580	ND	ND
2	+1	60	-1	7	ND	ND	ND	ND
3	-1	30	+1	21	0,30515	0,08140	0,09855	ND
4	+1	60	+1	21	ND	ND	ND	ND
5	0	45	0	14	ND	ND	ND	ND
6	0	45	0	14	ND	ND	ND	ND
7	0	45	0	14	ND	ND	ND	ND

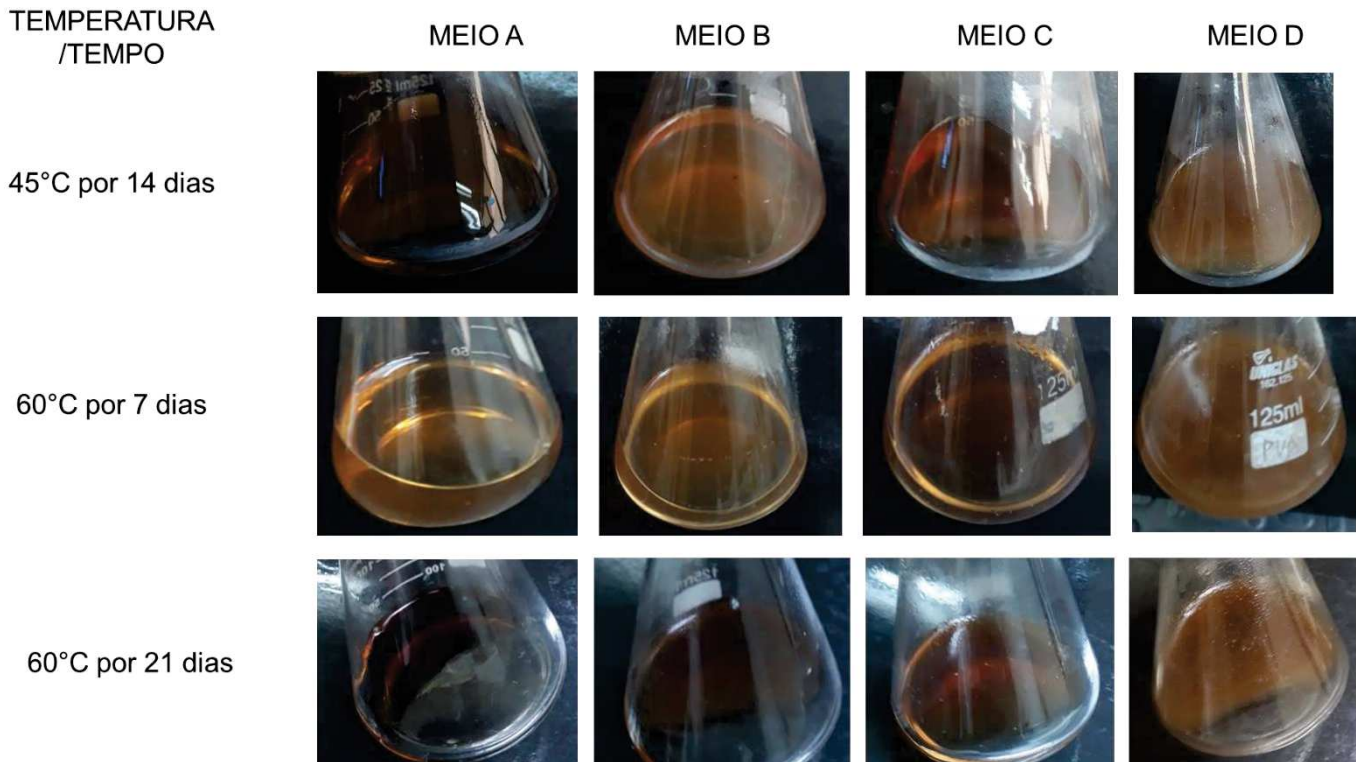
Legenda: Meio A – HS (controle); Meio B – Melaço sem suplementação; Meio C – Melaço suplementado com fosfato dissódico, ácido cítrico e peptona; Meio D – Melaço suplementado com Peptona da pena de frango (PPF) e ND – não detectado a produção de película.

Fonte: Autores (2020).

Segundo A-Kalifawi e Hassan (2014) a formação de biofilme pode ocorrer em uma faixa de temperatura de 20 à 50°C. No entanto, segundo estes autores nas temperaturas de 60, 70 e 80°C não houve turvação do meio, indicando possível morte celular, além de ter sido observado nas duas últimas condições, um escurecimento do meio.

O mesmo comportamento foi observado para fermentação a 60°C no presente trabalho, uma vez que os meios de cultivos nesta temperatura não apresentaram formação de película, bem como se apresentaram escuros (Figura 17).

Figura 17 - Ilustração do escurecimento dos meios de cultivo em função da temperatura e tempo.



Legenda: Meio A – HS (controle); Meio B – Melaço sem suplementação; Meio C – Melaço suplementado com fosfato dissódico, ácido cítrico e peptona e Meio D – Melaço suplementado com Peptona da pena de frango (PPF).

Fonte: Autores.

No entanto, quanto à condição na qual se empregou a temperatura de 45°C, a mesma não apresentou crescimento, diferentemente do observado por A-Kalifawi e Hassan (2014). Tal fato pode ter ocorrido em função da cultura mista utilizada no presente trabalho, provavelmente não possuía resistência a temperaturas mais elevadas. Desse modo, sugere-se trabalhos posteriores para avaliação de crescimento e variações de temperaturas menores entre 20 e 40°C, a fim de identificar se a variação de temperatura dentro desse intervalo provocará diferenças significativas na produção de celulose.

Diante do exposto optou-se por prosseguir os experimentos descritos no item 4.4 utilizando o meio controle (A) e meio com maior crescimento de película no *screening* (C), uma vez que as melhores produções de biofilme celulósico ter sido observada por estes meios.

5.4 Análises físico-química dos filmes celulósicos

Conforme mencionado no item anterior (5.4), realizou-se os testes analíticos com os meios A e C. Dessa forma, os resultados são expressos na Tabela 13.

Tabela 13 – Resultados dos testes físico-químicos.

Análises físico-químicas	Meio A	Meio C
Espessura (mm)	1,33 ± 0,58	0,67 ± 0,29
Teor de umidade (%)	96,90 ± 0,23	96,86 ± 0,56
Intumescimento (%)	1,62x10 ⁻³ ± 9,09x10 ⁻⁵	2,31x10 ⁻³ ±1,49x10 ⁻³
Solubilidade em água (%)	98,98 ± 0,88	98,95 ± 0,16

Fonte: Autores.

A partir dos resultados obtidos e apresentados na Tabela 13, comparando a espessura de ambos os meios, percebe-se que o meio A (controle) tem o dobro da espessura do meio C. Além disso, a película produzida no controle, mostrou-se mais rígida que a produzida no meio alternativo, possivelmente, devido a composição deste. A Figura 18 ilustra o biofilme formado por ambos os meios. Segundo Silva (2012) a alteração das fontes de carbono, bem como o tempo de cultivo resultam na mudança das propriedades mecânicas do biofilme.

Sacramento *et al.*, (2020) obteve como resultado em meio sintético (HS) espessura de 5,06 mm, para um cultivo de 15 dias, enquanto Coimbra (2016) obteve resultados de espessuras variando entre 1,20 a 2,50 mm mediante a utilização de diferentes concentrações de meios compostos por glicerol e manitol. No presente estudo para o meio HS (A) obteve-se 1,33 mm de espessura, valor próximo ao encontrado por Coimbra (2016). Porém, para meio C obteve-se espessura menor ao comparado na literatura, evidenciando que esse parâmetro pode variar de acordo com a absorção de água no filme celulósico, bem como pela quantidade produzida de biofilme pelas bactérias.

Figura 18 – Biofilmes celulósicos oriundos do meio A e meio C.



Fonte: Autores.

Ademais, a análise do teor de umidade em ambas as películas foi muito próxima (96,90% meio A e 96,86% no meio C), demonstrando a disponibilidade de sítios polares no material, ocupados por moléculas de água, o que implica em possíveis aplicações na área farmacêutica para o carregamento de fármacos (SILVA, 2012; COIMBRA, 2016).

Já para o teste de intumescimento, o valor obtido para o meio C ($2,31 \times 10^{-3}\%$) foi 43% superior ao meio A ($1,62 \times 10^{-3}\%$). Esse dado é importante, uma vez que segundo Figueiredo (2008) o intumescimento indica a quantidade de água ou qualquer outro solvente que pode ficar retido na celulose. No caso da água ocorrem interações formando pontes de hidrogênio nas fases amorfas (não cristalinas) da celulose bacteriana conferindo característica higroscópica, fazendo com que ocorra uma expansão transversal na película (FIGUEIREDO, 2008).

As características de ligações com diferentes solventes é o que desperta interesse na prospecção de substâncias que possam ser carregadas pela interação com as cadeias amorfas da película.

Sendo assim, a película produzida pelo meio C apresentou-se um pouco mais higroscópica que a do meio A, o que lhe confere maior afinidade por solventes polares que a convencional, o que pode ser explorado no carregamento de fármacos, por exemplo.

Além disso, Coimbra (2006) em seu estudo sobre variação das fontes de carbono na produção de película celulósica observou intumescimento de $1,0 \times 10^{-3}$ para

meio convencional HS e superior a esse valor para as variações de fonte de carbono, sendo o resultado observado no presente trabalho bastante similar.

Por fim, no teste de solubilidade o meio C (98,95%) apresentou-se praticamente igual ao meio A (98,98%), sendo ambos com solubilidade elevada. No entanto, apesar de celulose apresentar interação com a água por meio de sítios amorfos, ela não é totalmente solúvel na mesma devido à disposição das suas microfibrilas, as quais podem alterar-se conforme as composições dos meios de cultivos. Fato que não foi observado, uma vez que os dois meios reagiram de forma semelhante, destacando-se assim uma possível substituição da glicose comercial por melaço de cana de açúcar sem alterações de solubilidade e umidade, conforme observado nos resultados descritos anteriormente.

Coimbra (2016) obteve como resultado solubilidade de 89%, trabalhando com concentrações diferentes de manitol e glicerol, enquanto que Almeida (2010) encontrou solubilidade de 80% trabalhando com filmes compostos por celulose associada a fécula de batata e glicerol.

Outrossim, Almeida (2010) cita que filmes celulósicos que apresentam maior solubilidade são preferencialmente escolhidos para aplicações na indústria farmacêutica, principalmente para aplicações por via oral, devido a facilidade de digestão via saliva e liberação rápida de compostos carregados.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados apresentados percebeu-se que não foi possível realizar o isolamento do microrganismo almejado (*Gluconacetobacter xylinus*) e apesar de ter-se buscado outras alternativas, ainda assim não houve sucesso. Neste sentido, utilizou-se a cultura mista de kombucha para a produção de celulose, na qual a melhor condição foi observada com os meios: controle (meio HS) e meio alternativo composto por melaço suplementado (suplementação: ácido cítrico, fosfato dissódico, extrato de levedura e peptona bacteriológica). O meio alternativo, por ser um co-produto, mostrou-se viável frente ao meio convencional para a redução dos custos de um bioprocessos.

Outrossim, percebeu-se que não houve produção de película celulósica em meios contendo peptona da pena de frango como meio de cultivo. Sugere-se para trabalhos futuros a utilização de testes microbiológicos de citotoxicidade para avaliar o impacto da peptona da pena de frango, obtida por meio de hidrólise, para o cultivo de outros microrganismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKHALIFAWI, I. Produce bacterial cellulose of kombucha (Khubdat Humza) from honey. **Journal of Genetic and Environmental Resources Conservation**, 2014, 2(1): p. 39-45.

ALMEIDA, D. M. **Biofilme de blenda de fécula de batata e celulose bacteriana na conservação de fruta minimamente processada**. 2010. 284f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos Agroindustriais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

BREITKREITZ, M. C.; SOUZA, A. M. de; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com o-fenantrolina. Um tutorial, parte III. **Química Nova**, v.37, n.3, p. 564-573, 2014.

BRASIL. **Especificações técnicas: Melados**, 2019. Disponível em: <<https://melacos.com.br/especificacoes-tecnicas>>. Acesso em: 04 jun. 2020.

CHANDRASEKARAN, P. T.; BARI, N. K.; SINHA, S. Increased bacterial cellulose production from *Gluconobacter xylinus* using super-optimal broth, **Cellulose**, v. 24, n.10, p. 4367-4381, 2017. Doi: 10.1007 / s10570-017-1419-2.

CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. **Revista Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107-124, 2009.

COIMBRA, C. G. de O. **Produção de celulose bacteriana por *Gluconacetobacter xylinus* e elaboração de filmes comestíveis**. 2016. 139f. Tese (Doutorado em Biotecnologia RENORBIO) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira – Cana de açúcar**. p. 58, 2019.

COSTA, P. Z. R. da; BIZ, Pedro. Cultivando materiais: o uso da celulose bacteriana no design de produtos. In: SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESIGN DA ESCOLA SUPERIOR DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL - SPGD, 2017, Rio de Janeiro, **Anais...** Rio de Janeiro, 2017, p. 1-12.

DONINI, I. A. N.; SALVI, D. T. B. de; FUKUMOTO, F. K.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S.; MARCHETTO, R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **7 Eclet. Quím.** São Paulo, v. 35, n. 4, p. 1-14, 2010. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46702010000400021>.

ERNANDES, F. M. P. G. **Utilização de diferentes substratos para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis***. 2009.167f. Tese (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto.

ESPÍNDOLA, C. J. A cadeia produtiva de frango de corte na América do Sul: considerações preliminares. In: 12º Encontro de Geógrafos da América Latina. **Anais...** Montevideo, 2008, p. 1-18. Disponível em: <<http://observatoriogeograficoamericalatina.org.mx/egal12/Geografiasocioeconomica/Geografiaeconomica/76.pdf>>. Acesso em 20. abril 2019.

Estatísticas do Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro (AGROSAT). **Ranking nacional de frangos de corte**. 2019.

FELTRIN, V. P.; SANT'ANNA, E. S.; PORTO, A. C. S.; TORRES, R. C. O. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melação de cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, 2000.

FIGUEIREDO, A. F. B. **Produção de celulose microcristalina a partir de pasta sulfito ácido**. 2008. 86 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de Aveiro, Portugal, 2008.

FIJAŁKOWSKI, K.; ŻYWICKA, A.; DROZD, R.; KORDAS, M.; RAKOCZY, R. Effect of *Gluconacetobacter xylinus* cultivation conditions on the selected properties of bacterial cellulose. **Polish Journal of Chemical Technology**, v.18, n.4, p. 117–123, 2016. Doi: 10.1515/pjct-2016-0080

FLOREA, M.; HAGEMANN, H.; SANTOSA, G.; ABBOTT, J.; MICKLEM, CN.; SPENCER-MILNES, X.; ELLIS, T. Engineering control of bacterial cellulose production using a genetic toolkit and a new celluloseproducing strain. **Proceedings da Academia Nacional de Ciências**, v.113, n. 24, p. E3431-E3440, 2016. Doi: 10.1073 / pnas.1522985113

FORLABEXPRESS. Extrato de Levedura Frasco 500g Kasvi. 2020. Disponível em: <<https://www.forlabexpress.com.br/extrato-de-levedura-kasvi-frasco-500g->>. Acesso em: 14 jun 2020.

FORLABEXPRESS. Peptona Bacteriológica - frasco 500g Kasvi. 2020. Disponível em: <<https://www.forlabexpress.com.br/extrato-de-levedura-kasvi-frasco-500g->>. Acesso em: 14 jun 2020.

HWANG, J.W.; YANG, Y.K.; HWANG, J.K.; PYUN, Y.R.; KIM, Y.S. Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture, **J. Biosci. Bioeng.**, v. 88, p. 183–188, 1999.

KALIFAWI, E. J. AL-Kalifawi.; HASSAN, I. A. Factors Influence on the yield of Bacterial Cellulose of Kombucha (Khubdat Humza). **Baghdad Science Journal**, v. 11, n. 3, 2014.

JOZALA, A. F.; LOPES, A. M.; NOVAES, L. C. de L.; JUNIOR, A. P. Produção de celulose bacteriana: uma nova tendência. **Microbiologia in Foco**, v. 14, p. 14-17, 2011.

JOZALA, A. F.; PÉRTILE, R. A. N.; SANTOS, C. A. dos; EBINUMA, V. de C. S.; SECKLER, M. M.; GAMA, F. M.; PESSOA Jr. A. Bacterial cellulose production by

Gluconacetobacter xylinus by employing alternative culture media. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, p. 1181–1190, 2015. Doi: 10.1007/s00253-014-6232-3.

JUNG, J. Y.; PARK, J. K.; CHANG, H. N. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* in a stirred culture without non-living cellulose producing cells. **Front Microbiol**, v.37, n.3, p.347-354, 2005. Doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.02.019.

KURBANOGLU, E. B.; KURBANOGLU N. I. Ram horn peptone as a source of citric acid production by *Aspergillus niger*, with a process. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 31, p. 289–294, 2004. Doi: 10.1007/s10295-004-0147-4.

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

LIMA, H. L. S.; NASCIMENTO, E. S.; ANDRADE, F. K.; BRÍGIDA, A. I. S.; BORGES, M. F.; CASSALES, A. R.; MUNIZ, C. R.; SOUZA Filho, M. de S. M.; MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. de F. Produção de Celulose Bacteriana por *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 Uso de Suco de Sisal - Um Resíduo Agroindustrial. **J. Chem. Eng.**, São Paulo, v.34, n.3, p. 671-680. 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20170343s20150514>.

LIU, M., LIU, L., JIA, S., LI, S., ZOU, Y., & ZHONG, C. Complete analysis of the genome of *Gluconacetobacter xylinus* CGMCC 2955 for the elucidation of bacterial cellulose biosynthesis and metabolic regulation. **Scientific reports**, v.8, p.10, 2018. Doi: 10.1038 / s41598-018-24559-w.

MARTELLI, S. M. **Obtenção e caracterização de filmes de queratina de penas de frango**. 2005. 95f. Dissertação (Pós graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

MINUTTI, F. A. A. **Uso de pena de galinha na produção de painéis para construção civil**. 2018. 110f. Dissertação (Mestrado em Arquitetura e Urbanismo) - Faculdade de Arquitetura, Artes e Comunicação, Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2018.

NOGUEIRA, F. S.; FERREIRA, K. S.; Junior CARNEIRO, J. B.; PASSONI, L. C. Minerais em melados e em caldos de cana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n. 4, p. 727-731, out.-dez, 2009. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/cta/v29n4/05.pdf>>. Acesso em: 04 jun. 2020.

OLIVEIRA, M. CARMINATTI, C. A. **Produção de celulose em cultura estática utilizando diferentes fontes de carbono**, Santa Catarina, p.1-16, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/171571/UFSC%20-%20CTJ%20-%20TCC_BCT%20-%20Marielle%20de%20Oliveira.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 12 dez 2018.

OLIVEIRA, R. L. de. **Preparação e caracterização de derivados celulósicos obtidos a partir da celulose bacteriana e obtenção de filmes para aplicações**

óticas. 2013. 176f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

ORAK, T.; CAGLAR O.; ORTUCU, S.; OZKAN, H.; TASKIN, M.; Chicken feather peptone: A new alternative nitrogen source for pigment production by *Monascus purpureus*. **Journal of Biotechnology**, v. 271, n. 10, p. 56-62, Apr. 2010.
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.02.010>

OZDAL, M.; KURBANOGU, E. B. Citric Acid Production by *Aspergillus niger* from Agro-Industrial by-products: Molasses and Chicken Feather Peptone. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-10, 2018. Doi:10.1007/s12649-018-0240-y

PIGOSSI, S. C. **Avaliação de compósitos à base de celulose bacteriana-hidroxiapatita com peptídeo osteogênico para reparação óssea**. 2014. 87f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Área de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2014.

POBLET, M. ROZÈS, Nicolas & Guillamon, JOSE & MAS, Albert. (2000). **Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA**. Letters in Applied Microbiology. v. 31. p. 63 - 67. 2020. Doi: 10.1046/j.1472-765x.2000.00765.x.

PROMEGA. **Wizard genomic DNA purification kit: Instructions for Use of Products**, Madison, p. 1-19, 2019. Disponível em: <<https://ita.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol.pdf>>. Acesso em: 24 maio 2019.

RANGASWAMY, B. E.; VANITHA, K. P.; HUNGUND, B. S. Microbial Cellulose Production from Bacteria Isolated from Rotten Fruit. **International Journal of Polymer Science**, p. 8, 2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/280784>.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria, **MICROBIOLOGICAL REVIEWS**, v. 55, p. 35-58, 1991.

SACRAMENTO, G. C.; HODEL, K. V. S.; NUNES, S. B.; BARBOSA, J. D. V.; MACHADO, B. A. S. **Biossíntese de celulose bacteriana utilizando gluconacetobacter hansenii para utilização como polímero base para membranas ativas**. In: IV Seminário de Avaliação de Pesquisa Científica e Tecnológica (SAPCT) e III Workshop de Integração e Capacitação em Processamento de Alto Desempenho (ICPAD) - ANUÁRIO, 2020. Disponível em: <<https://www.doity.com.br/anais/sapctcimatec-2019/trabalho/90481>>. Acesso em: 02 ago. 2020.

SANTOS, M. J. dos. **Kombucha: Caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração**. 2016. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciências Gastronômicas) - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

SCHROEDER, Jéssica. **KOMBUCHA FERMENTADA A PARTIR DE RESÍDUO DE ACEROLA**. 2019. 47f. Dissertação (Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

SHADE, A. The Kombucha Biofilm: a Model System for Microbial Ecology. **Marine Biological Laboratories**, Woods Hole, MA, 2011.

SHIBAO, J.; BASTOS, D. H. M. Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. **Revista Nutricional**. v.24, n.6, Campinas, Nov./Dec, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732011000600010>. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732011000600010>. Acesso em: 13 jun. 2020.

SCHROEDER, J. **Kombucha fermentada a partir de resíduo de acerola**. 2019. 47f. Monografia (Bacharel em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SON, H.J.; HEO, M.S.; KIM, Y.G.; LEE, S.J. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. **Biotechnol. Appl. Biochem**, v. 33, p. 1–5, 2001.

TASKIN, M.; SISMAN, T.; ERDAL, S.; KURBANOGLU, E. B. Use of waste chicken feathers as peptone for production of carotenoids in submerged culture of *Rhodotorula glutinis* MT-5. **European Food Research and Technology**, v. 233, n. 4, p. 657–665, 2011. Doi:10.1007/s00217-011-1561-2

TONETTO, M. L. **Tratamento de águas residuais da indústria têxtil utilizando celulose bacteriana**. 2018. 43f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Santa Catarina, Araranguá.

United States Department of Agriculture (USDA). **Ranking mundial da produção de frangos de corte**. 2019.

VILELA, Casarin Dayse. **Avaliação da Qualidade Físico-Química de Amostras de Melado**. 2016. 37f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2016.

VIEIRA, Denise Cristina Moretti. **Produção de biofilme (membrana de biocelulose) por *Gluconacetobacter xylinus* em meio de resíduos de frutas e folhas de chá verde**. 2013. Tese (Doutorado em Tecnologia de Fermentações) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. DOI:10.11606/T.9.2013.tde-19062013-185045.

ZANOTI, M. D. U. **Membranas de Celulose Bacteriana com anti-inflamatório Ibuprofeno para o tratamento de feridas crônicas**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química da Universidade Paulista, Araraquara, SP, 2017.

ZHAO, H.; LI, J.; ZHU, K. Bacterial Cellulose Production from Waste products and

Fermentation conditions optimization. **IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering**, v. 394, p. 1-6. 2018. Doi:10.1088/1757-899X/394/2/022041.

ZHONG, C.; LI, F.; LIU, M.; YANG, X. N.; ZHU, H.-X.; JIA, Y.-Y.; PIERGIOVANNI, L. Revealing Differences in Metabolic Flux Distributions between a Mutant Strain and Its Parent Strain *Gluconacetobacter xylinus* CGMCC 2955. **Plos one**, v. 9, n. 6, p. e98772, 2014. Doi: 10.1371 / journal.pone.

ZHONG, C.; ZHANG, G.-C.; LIU, M.; ZHENG, X.-T.; HAN, P.-P.; JIA, S. R. Analysis of the metabolic flux of *Gluconacetobacter xylinus* for the production of bacterial cellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 14, p. 6189-6199, 2013. Doi: 10.1007 / s00253-013-4908-8.

ANEXO A – Composição de meios de cultivo utilizados

Meio de Cultivo	Composição
HS (<i>Hestrin Schramm</i>)	20 g/L glicose; 5 g/L de peptona; 5 g/L de extrato de levedura; 1,15 g/L de ácido cítrico; 2,7 g/L de fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄) 15 g/L de ágar bacteriológico*
Manitol	25 g/L de D-manitol; 3 g/L de peptona; 5 g/L de extrato de levedura 15 g/L de ágar bacteriológico*
Carbonato de cálcio e etanol	30 g/L de glicose; 5 g/L de extrato de levedura; 3g/L de peptona; 10 g/L de carbonato de cálcio; 30 mL/L de etanol 95% (v/v); 15 g/L de ágar bacteriológico*

* adicionou-se ágar bacteriológico somente quando foi necessário que o meio de cultivo estivesse em estado sólido.

APÊNDICE A – Estimativa do custo de produção de peptona de pena de frango.

Inicialmente estimou-se o gasto energético dispendido devido a utilização de liquidificador para trituração das penas e da estufa para secagem das penas, hidrólise das penas e secagem do hidrolisado.

O liquidificador utilizado foi da marca Britânia 2L e 1200W (1,2 kW) de potência. A estufa de secagem utilizada foi da marca SOLAB com espaço interno de 100 L e 1200 W (1,2 kW) de potência.

Ademais, considerando o espaço interno da estufa e o volume ocupado pelas penas podemos acomodar, em média, 9 kg de pena em seu interior, uma vez que é necessário uma correta disposição das mesmas para que ocorra secagem. Sendo assim, para a trituração de 190 g de pena de frango demorou-se, aproximadamente, 45 minutos, logo para trituração de 9 kg seriam necessárias 35,5 h.

Partindo da potência dos equipamentos calculou-se o gasto energético para produção de hidrolisado contabilizando todos os procedimentos que necessitaram de trituração e secagem (secagem das penas, hidrólise das penas e secagem do hidrolisado). A quantidade de horas dispendidas com os equipamentos ligados está disposta na Tabela 14.

Tabela 14 – Quantidade de horas dispendidas com o liquidificador e estufa em funcionamento para realização dos procedimentos.

Procedimento	Quantidade de horas dispendidas
Trituração das penas	35,5 h
Secagem de penas de frango	7 dias = 168 h
Hidrólise	24 h
Secagem do hidrolisado	10 dias = 240 h
Total	467,5 h

Fonte: Autores.

Considerando o total de horas dispendidas com o liquidificador e com a estufa ligada e a potência dos mesmos podemos calcular a quantidade de kWh gastos, conforme Equação 4.

$$kWh = 1,2 kW \times 467,5 h = 561 \quad (4)$$

Segundo a Companhia Paranaense de Energia (COPEL), a tarifa a ser cobrada para utilizações do grupo B3 (industrial), considerando os impostos, é de R\$ 0,79878 por kWh. Desse modo o custo com o funcionamento do liquidificador e estufa será de R\$ 448,12 (R\$ 0,79778 por kWh x 561 kWh).

Também estimou-se o gasto referente a utilização de água potável para higienização das penas. Para a lavagem de 1 kg utiliza-se 20 L, logo para 9 kg são necessários 180 L. Segundo a Sanepar as tributações cobradas pela empresa seguem a Resolução Homologatória N° 006 da AGEPAR (Agência Reguladora do Paraná), a qual tarifa o valor de R\$ 69,80 até 5 m³ (5000 L) de utilização de água.

Além disso, foi necessário contabilizar os gastos referentes aos reagentes utilizados (KOH 2,5 M e H₂SO₄ 3M). Desse modo, para realização da hidrólise de 190 g de penas utilizou-se 0,3 L de KOH 2,5 M equivalente a 14,21 L de KOH 2,5M para hidrólise de 9 kg de pena de frango.

Utilizando a formula da molaridade descrita na Equação 5, a massa molar do KOH (56,1 g.mol⁻¹) e o volume utilizado de solução, podemos calcular a massa requerida da substância o para o preparo da solução (Equação 6).

$$M = \frac{m}{MM.V} \quad (5)$$

Na qual:

M: molaridade da solução (M);

m: massa da substância (g);

MM: massa molar (g.mol⁻¹);

V: volume da solução (L).

$$2,5 M = \frac{m}{56,1 \text{ g.mol}^{-1} \cdot 14,21 L} \quad (6)$$

Sendo assim, a partir da Equação 6 temos que a massa de KOH requerida para preparar a solução é igual a 1.992,9 g, aproximadamente 2 kg. O quilograma de KOH custa R\$ 89,38 reais (METAQUIMICA, 2020), resultando em um custo total de R\$ 178,76 reais com 2 kg de KOH.

De modo similar, partindo da Equação 5 calculou-se a massa necessária de H₂SO₄ para neutralização do hidrolisado, tendo em vista que para 190 g de pena

utilizou-se 0,020L de H₂SO₄ 3 M, logo para hidrólise de 9 kg utilizar-se-á 0,9473 L, aproximadamente 1L. Sabendo que a massa molar da substância é 98,079 g.mol⁻¹, temos a Equação 7.

$$3 M = \frac{m}{98,079 \text{ g.mol}^{-1} \cdot 1 L} \quad (7)$$

Dessa maneira, a massa requerida de ácido sulfúrico equivale a 294,237 g, no entanto o H₂SO₄ encontra-se no estado líquido, sendo necessário converter a quantia em gramas para mL, por meio da Equação 8 e utilizando a densidade do mesmo (1,83 g.ml⁻¹).

$$d = \frac{m}{V} \quad (8)$$

Onde:

d: densidade da substância (g.ml⁻¹);

m: massa da substância (g);

V: volume da substância (mL).

Dessa forma 294,237 g de H₂SO₄ equivalem a 160,78 mL. O litro de H₂SO₄ custa R\$ 49,58 reais (METAQUIMICA, 2020), resultando em um custo parcial R\$ 7,97 reais para o volume de 160,78 mL de ácido.

Portanto, contabilizando todos os gastos dispostos anteriormente, os quais estão descritos na Tabela 15, obter-se-ia um custo de R\$ 704,65 reais para produção de 5 kg de hidrolisado, equivalente a aproximadamente R\$ 70 reais por meio quilograma de peptona de pena de frango.

Tabela 15 – Contabilização dos gastos para fabricação de 5 kg de pena de frango.

Material necessário	Valor (R\$)
Recurso hídrico	69,80
Recurso energético	448,12
KOH	178,76
H ₂ SO ₄	7,97
Total	704,65

Fonte: Autores.