

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

LISA MARIE FRANZ

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS LÁTICOS POLUENTES NOS SUBSTRATOS PARA
PRODUÇÃO DE NANOCELULOSE BACTERIANA**

DOIS VIZINHOS

2023

LISA MARIE FRANZ

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS LÁCTICOS POLUENTES NOS SUBSTRATOS PARA
PRODUÇÃO DE NANOCELULOSE BACTERIANA**

**USE OF POLLUTANT LACTIC WASTES IN SUBSTRATES FOR THE
PRODUCTION OF BACTERIAL NANOCELLULOSE**

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

Orientador: Prof^a Dr^a Paula Fernandes Montanher.

Coorientador: Prof^a Dr^a Samara Silva de Souza.

DOIS VIZINHOS

2023



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

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



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Ponta Grossa**



LISA MARIE FRANZ

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS LÁTICOS POLUENTES NOS SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE
NANOCELULOSE BACTERIANA**

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

Data de aprovação: 22 de Agosto de 2023

Paula Fernandes Montanher, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Alexandre Carvalho De Moura, Doutorado - Universidade Federal da Fronteira Sul (Uffs)

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

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 24/08/2023.

Dedico este trabalho à minha família e a todas as mulheres
que dedicaram sua vida à ciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por guiar e iluminar minha jornada.

Gratidão à minha orientadora Profa. Dra. Paula Fernandes Montanher pela doçura, seriedade e engajamento que me guiou durante essa trajetória me fazendo seguir firme no caminho.

Agradeço à minha co-orientadora Profa. Dra. Samara Silva de Souza e demais professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia por todo comprometimento, inovação e didática que foram utilizados durante minha passagem pelo programa, vocês são inspiradores.

Aos meus colegas de laboratório pelos aprendizados e por tudo que construímos juntos. A secretaria do curso, pelo atendimento e esclarecimento de dúvidas, aos técnicos e estagiários de laboratório, em especial aos que estão lotados no LABIA por toda atenção e auxílio, muito obrigada.

Agradeço a minha família, em especial ao meu esposo Rafael e minha filha Maria Julia por apoiarem incondicionalmente a realização da minha pesquisa e compreenderem a minha ausência. A todos os que por algum motivo contribuíram para a realização deste trabalho muito obrigada.

Por fim, externalizo a minha gratidão aos professores drs. membros da banca pelas contribuições, à agência de fomento à pesquisa, CAPES código de financiamento 001 e a UTFPR por darem as condições necessárias para que essa pesquisa fosse realizada.

A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria (FREIRE, 1996).

RESUMO

A produção de NCB (nanocelulose bacteriana) depende principalmente da disponibilidade dos componentes nutricionais do meio de produção. Diferentes fontes de carbono e meios de cultivo já foram relatados para produção de NCB, no entanto, o meio Hestrin-Schramm (HS) continua sendo o mais comumente usado. O seu alto custo de produção, devido aos componentes como extrato de levedura e peptona, representa ainda um grande desafio para atender aos requisitos de fabricação comercial. Nesse trabalho foi desenvolvido um meio de cultura modificado a fim de produzir membranas de nanocelulose bacteriana (NCB), barateando seu custo de produção e reutilizando resíduos poluentes. Foi realizado um levantamento bibliográfico sobre NCB, sobre as principais bactérias que produzem o biofilme e quais os nutrientes utilizados nos meios de cultura convencionais. Nesse contexto os resíduos lácticos são uma boa opção para desenvolvimento de um meio modificado, por apresentarem elevadas concentrações de carbono e nitrogênio além de outros nutrientes. A indústria leiteira é uma das principais indústrias do país, se destacando mundialmente pela produção queijeira, contudo dessa produção são gerados dois resíduos importantes, o soro de leite (SL) e a água de filagem (AF). Ambos são efluentes extremamente poluentes e precisam ser tratados antes do seu descarte para a produção de NCB utilizou-se uma condição controle com meio HS (GC) e foram realizadas seis condições para os meios modificados para cada resíduo (SL e AF), sendo a condição A - Resíduo puro; condição B: HS + 20% de resíduo; Condição C: HS + 50% de resíduo; Condição D: HS sem peptona substituída pelo resíduo. Condição E: HS sem extrato de levedura substituído pelo resíduo; e Condição F: HS sem peptona e extrato de levedura substituídos pelo resíduo. Para a realização dos experimentos foi realizada a alteração do pH desses efluentes delimitando como ponto ideal entre 4,5 e 4,7. A média do peso úmido comprovou que utilizando o SL na condição D tem-se uma membrana de NCB com peso superior ao grupo controle (GC), a mesma condição utilizando a AF não foi superior ao GC, mas ficou muito próxima. As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) comprovam que as microfibrilas se arranjam de formas diferentes de acordo com a condição e resíduo estabelecidos. As análises de Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) apontam um padrão nas curvaturas do gráfico, onde todas as condições trabalhadas se assemelham ao GC. Os resultados obtidos indicam que a bactéria *Komagataebacter xylinus* produziu NCB em meio modificado com ajustes de pH nas condições propostas. Dessa forma tanto o SL quanto a AF apresentam a possibilidade de aplicações em meios de cultura para a produção de NCB sendo utilizados dessa forma de maneira sustentáveis, destacando-se a AF, que conforme levantamento bibliográfico apresenta poucos registros de reutilização.

Palavras-chave: nanocelulose bacteriana; resíduos lácticos; biofilme; meio modificado.

ABSTRACT

The production of NCB (bacterial nanocellulose) depends mainly on the availability of the nutritional components of the production medium. Different carbon sources and cultivation media have been reported for NCB production, however, Hestrin-Schramm (HS) medium remains the most commonly used. Its high production cost, due to components such as yeast extract and peptone, still represents a major challenge in meeting commercial manufacturing requirements. In this work, a modified culture medium was developed in order to produce bacterial nanocellulose membranes (NCB), lowering their production cost and reusing polluting waste. A bibliographical survey was carried out on NCB, the main bacteria that produce biofilm and the nutrients used in conventional culture media. In this context, dairy waste is a good option for developing a modified medium, as it has high concentrations of carbon and nitrogen, as well as other nutrients. The dairy industry is one of the main industries in the country, and stands out worldwide for its cheese production. However, two important wastes are generated from this production: whey (SL) and filtering water (AF). Both are extremely polluting effluents and need to be treated before being disposed of. For the production of NCB, a control condition was used with HS medium (GC) and six conditions were carried out for the media modified for each waste (SL and AF), with Condition A - Pure waste; Condition B: HS + 20% waste; Condition C: HS + 50% waste; Condition D: HS without peptone replaced by waste. Condition E: HS without yeast extract replaced by the residue; and Condition F: HS without peptone and yeast extract replaced by the residue. To carry out the experiments, the pH of these effluents was altered to between 4.5 and 4.7. The average wet weight showed that using SL in condition D resulted in an NCB membrane weighing more than the control group (CG), while the same condition using AF was not superior to the CG, but was very close. Scanning electron microscopy (SEM) analysis shows that the microfibrils are arranged differently depending on the condition and residue used. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analysis shows a pattern in the curvatures of the graph, where all the conditions worked on are similar to the GC. The results obtained indicate that the bacterium *Komagataebacter xylinus* produced NCB in modified medium with pH adjustments under the proposed conditions. In this way, both SL and AF can be used in culture media to produce NCB in a sustainable way, especially AF, which, according to a literature survey, has few records of reuse.

Keywords: bacterial nanocellulose; lactic acid waste; biofilm; modified medium.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Produção de leite inspecionado em 2020 e 2021 em bilhões de litros	17
Figura 2 – Tanque de armazenamento de leite	19
Figura 3 – Ciclo da manufatura de queijo	20
Figura 4 - Aplicações da nanocelulose bacteriana	26
Figura 5 - Mecanismo de biossíntese de celulose em <i>Komagataeibacter xylinus</i> .	30
Figura 6 - Produção de NCB com HS	32
Figura 7 - Representação ilustrativa da formação do biofilme	33
Figura 7.1- Os cinco estágios do biofilme	34
Figura 8 - Reativação de inóculo e aumento em placas de 24 poços	37
Figura 9 - Exemplo de produção das membranas em placas de 24 poços	38
Figura 10 - Micrografia da superfície de NCB, (I) Controle, (II) AF-B, (III) AF-C, (IV) AF-D, (V) AF-E (VI) AF-F, as Imagens (A) representam o lado menos poroso da membrana de cada condição no aumento de 2.500x, (B) 5.000x e (C) 10.000x, A imagem D representa o lado mais denso no aumento de 2.500x.	45
Figura 11 - Micrografia da superfície de NCB, (I) SL-A, (II) SL-B, (III) SL-C, (IV) SL-D, (V) SL-E (VI) SL-F, as Imagens (A) representam o lado menos poroso da membrana de cada condição no aumento de 2.500x, (B) 5.000x e (C) 10.000x, A imagem D representa o lado mais denso no aumento de 2.500x.	47
Figura 12 - Espectros de Infravermelho das membranas de NCB produzidas em meio de cultura modificado com soro de leite	50
Figura 13 - Espectros de Infravermelho das membranas de NCB produzidas em meio de cultura modificado com água de filagem	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do soro de leite por L	22
Tabela 2 - Composição do meio HS	31
Tabela 3 - Volumes do meio HS, HS modificado com resíduo e inóculo para síntese das membranas	37
Tabela 4 - Caracterização dos resíduos	41
Tabela 5 - Média do peso úmido e espessura das membranas em meio modificado com SL	42
Tabela 6 - Média do peso úmido e espessura das membranas em meio modificado com AF	43
Tabela 7 - Custo médio de produção do meio de cultura HS (Hestrin e Schramm 1954)	52
Tabela 8 - Custo médio de produção do meio de cultura utilizando a modificação D	52
Tabela 9 - Custo médio de produção do meio de cultura com a modificação E	52
Tabela 10 - Custo médio de produção do meio de cultura com a modificação F	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Água de filagem
BAA	Bactérias do ácido acético
DBO	Demanda biológica de oxigênio
HS	Hestrin Scharamm
IC	Carbono inorgânico
Fig.	Figura
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NC	Nitrogênio total
NCB	Nanocelulose bacteriana
NCV	Nanocelulose vegetal
RL	Resíduos lácticos
SL	Soro de leite
TC	Carbono total

LISTA DE SÍMBOLOS

C	Carbono
Ca	Cálcio
Fe	Ferro
H	Hidrogênio
K	Potássio
Mg	Magnésio
N	Nitrogênio
O	Oxigênio
P	Fósforo
S	Enxofre
Y	Meio de cultura Yamanaka
Z	Meio de cultura Zhou

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 A indústria leiteira no Brasil	17
3.2 Resíduos lácteos	18
3.2.1 Caracterização do soro de leite	22
3.2.2 Caracterização da água de filagem	23
3.3 Nanocelulose bacteriana	24
3.3.1 Principais bactérias utilizadas na produção de celulose bacteriana	28
3.4 Meios de cultura	30
3.5 Biofilme	33
3.6 Desenvolvimento de embalagens como possibilidade	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Obtenção dos resíduos	36
4.2 Produção dos meios de cultura	36
4.3 Cultivo de microrganismos e preparação do inóculo	37
4.4 Produção, purificação e secagem das membranas de nanocelulose bacteriana	36
4.5 Caracterização dos biofilmes	39
4.5.1 Caracterização dos resíduos utilizados	39
4.5.2 Peso úmido e espessura das membranas	39
4.5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	39
4.5.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	39
4.5.5 Análise de viabilidade econômica	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
5.1 Caracterização dos resíduos	42
5.2 Peso úmido e espessura das membranas	42
5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	44
5.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	49
5.5 Análise geral de viabilidade econômica	51
6 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

O tema sustentabilidade tem sido cada vez mais debatida no ramo industrial, isso devido a utilização irresponsável dos recursos ambientais disponíveis. Outro problema de parte da Indústria, diz respeito aos resíduos altamente tóxicos gerados e descartados de forma incorreta no ambiente (WISSMANN *et al.*, 2012; ZANDONA; BLAŽIĆ; REŽEK JAMBRAK, 2021).

Existem indústrias de grande importância alimentar e econômica, de acordo com a EMBRAPA (2023) a indústria leiteira no Brasil se sobressai produzindo em média 35,30 bilhões de litros de leite anualmente. Partindo da produção leiteira são desenvolvidos vários produtos, sendo que no Brasil os principais são: Leite condensado, creme de leite e queijo.

Produzido nos laticínios, o queijo é um dos produtos mais exportados pelo Brasil e o aumento na venda desse produto vem subindo ano a ano (EMBRAPA, 2019). Embora essas indústrias aumentem anualmente suas produções gerando vantagem econômica, os resíduos que são produzidos também aumentam. No processo de fabricação do queijo, o Soro de Leite (SL) representa em média 90% do volume total da peça, ou seja, para que se produza 1 kg de queijo são necessários 10 litros de leite o que gera como resíduo 9 litros de soro (LEITE; BARROZO; RIBEIRO, 2012). Mesmo apresentando um alto valor nutricional, aproximadamente metade de todo volume de soro produzido ainda é descartado de forma inadequada, poluindo a biosfera (COSTA *et al.*, 2022).

Dos resíduos poluentes que advém da produção de queijos, destacam-se também a água de filagem (AF), que juntamente com o soro de leite (SL), possuem elevada quantidade de gorduras e ácidos presentes, precisando assim serem tratados antes de serem descartados. A grande carga orgânica desses efluentes líquidos faz com que eles sejam considerados uma das principais fontes de poluição dessa indústria (VOURCH *et al.* 2008).

O soro de leite tem diversas aplicações, contudo ainda assim a quantidade produzida de soro é extremamente elevada e parte dessa produção é considerada resíduo e deve passar por tratamento (ROHFLES, 2014). A água de filagem por outro lado, praticamente não é reutilizada (MENDES *et al.*, 2015; GONÇALVES; CARDARELLI, 2021). Além das gorduras e ácidos presentes nesses resíduos, existe uma grande quantidade de nutrientes interessantes que podem ser aproveitados em processos biotecnológicos para cultura e desenvolvimento de microrganismos em condições e meios diferentes.

Sabendo da riqueza nutricional dos resíduos e pensando no desenvolvimento e culturas diferenciadas utilizando microrganismos, a nanocelulose bacteriana (NCB) tem ganhado

destaque sendo um biomaterial com grandes variedades de aplicação em vários setores da indústria (ZHU *et al.*, 2014; SEOL *et al.*, 2018, XIE *et al.*, 2018, LIN; DUFRESNE, 2014, CHU *et al.*, 2018, DE AMORIM *et al.*, 2020).

A NCB apresenta estruturas químicas semelhantes a celulose vegetal, mas seu grande diferencial é a alta cristalinidade, retenção de água e estrutura tridimensional fibrilar (ROL *et al.*, 2019; RAISZADEH-JAHROMI *et al.*, 2020). Ela pode ser produzida por diferentes bactérias Gram-negativas, como por exemplo as do gênero *Rhizobium*, *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e também por espécies bacterianas Gram-positivas, como a *Komagataebacter* (THONGSOMBOON *et al.*, 2018; ŻYWICKA *et al.*, 2018; RAISZADEH-JAHROMI *et al.*, 2020; GREGORY *et al.*, 2021).

Para o desenvolvimento da NCB é necessário um meio de cultura rico em carbono e nitrogênio, a partir disso ela desenvolve o biofilme sobrenadante (GREGORY, 2021). A fácil manipulação e manutenção da NCB faz com que ela tenha sido objeto de muitos estudos recentes (THONGSOMBOON *et al.*, 2018; AZEREDO *et al.*, 2019; SPEROTTO *et al.*, 2021).

A NCB apresenta uma vasta área de aplicabilidade e é um biomaterial promissor, manipulando a bactéria *Komagataeibacter xylinus* é possível produzir o biofilme, porém o meio de cultura mais comum e utilizado para o seu desenvolvimento é o Hestrin-Schramm (HS). O HS é composto por glicose, peptona, extrato de levedura, fosfato de sódio e ácido cítrico (HESTRIN, SCHARAMM, 1954) e é considerado um meio de alto valor econômico, pois principalmente a peptona e o extrato de levedura são caros para a compra, interferindo diretamente na produção da NCB (SOUZA *et al.*, 2019; SPEROTTO *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2022).

Dessa forma, o objetivo dessa pesquisa foi desenvolver um novo meio de cultura, reutilizando resíduos lácticos como fonte de nutrientes para a bactéria, reduzindo o custo de produção da NCB, possibilitando economia à indústria e mitigando potenciais problemas ambientais ocasionados por descartes indevidos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial do soro de leite e água de filagem, resíduos lácteos altamente poluentes na biossíntese de nanocelulose bacteriana visando novas aplicações e redução de custo.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o soro de leite e a água de filagem quanto a quantidade carbono total, pH e nitrogênio total.
- Avaliar as diferenças de produção nas distintas concentrações de soro de leite líquido e água de filagem para modificação do meio de cultura padrão;
- Produzir biofilme de NCB a partir das modificações do meio de cultura;
- Caracterizar os biofilmes de NCB puro e modificados por MEV, FTIR, peso úmido e espessura.
- Avaliar a viabilidade econômica da produção de NCB a partir do uso desses resíduos lácteos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

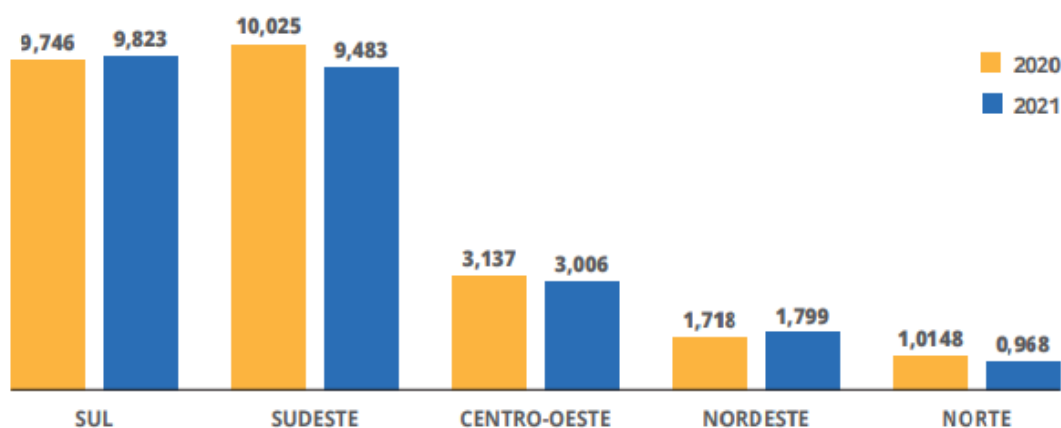
3.1 A indústria leiteira no Brasil

A agroindústria desempenha um papel econômico significativo em todo o planeta. Os resíduos dos processos agroindustriais podem ser utilizados como fonte energia, em geral apresentam baixo custo financeiro e podem ser aplicados em ações sustentáveis (HUSSAIN *et al.*, 2019). De acordo com a EMBRAPA (2023) o Brasil é o terceiro maior produtor de leite do mundo apresentando taxas anuais de crescimento. Os estados que ocupam o ranking de maior produção referente ao ano de 2022 são respectivamente Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul (EMBRAPA, 2023)

O investimento da indústria leiteira para a produção de queijos e demais derivados remete a um problema ambiental muito sério, que são os resíduos ou também chamados subprodutos que no caso de soro de leite apresenta grande valor nutricional (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012). Graças a presença de sais minerais, alta taxa de gordura, proteínas e a própria lactose faz com que o esse sub-produto tenha uma demanda biológica altamente contaminante (SABIONI, 2018; LAPP *et al.*, 2019; ZANELA *et al.*, 2021).

Essa produção se divide entre grandes produtores rurais e pequenos agricultores que utilizam o leite e seus derivados para subsistência. Para a indústria leiteira, são desenvolvidas estratégias tecnológicas para inovação dos produtos lácticos evitando a contaminação do leite e preservação do ambiente (THOMAZ *et al.*, 2019). Na figura 1 observa-se a produção de leite inspecionado nas regiões brasileiras nos anos de 2020 e 2021.

Figura 1 – Produção de leite inspecionado em 2020 e 2021 em bilhões de litros



Fonte: EMBRAPA GADO DE LEITE, 2022.

No ano de 2020 a região sudeste foi a maior produtora de leite no país, seguida da região sul, contudo no ano de 2021 houve uma queda na produção, e a região sul passou a ocupar o primeiro lugar no ranking. O estado de Minas Gerais é o maior produtor de leite do país, seguido dos estados da região sul (EMBRAPA, 2022).

O clima pode ter influência direta ou indireta na produção de leite bovino. O Brasil é um país com grande extensão territorial e boa parte está situada em regiões tropicais com alterações climáticas constantes, sendo a pecuária leiteira um dos setores mais sensíveis a essas variações (DA SILVA *et al.*, 2010). Quando o gado está em situação de estresse térmico tende a alterar seu metabolismo, comportamento e reduzir a produção de leite (SRIKANDAKUMAR; JOHNSON, 2004). As regiões que mais se destacam na indústria leiteira são as que apresentam menor variação climática.

Essas regiões possuem clima favorável para o bem-estar animal das vacas, o que favorece a produção de pastos e conseqüentemente a produção de um leite de qualidade. Embora exista muita produção no Sul, existe pouca divulgação sobre as ferramentas tecnológicas que os grandes e pequenos produtores rurais utilizam nos laticínios e na fabricação dos queijos (PICOLI *et al.*, 2015). Quanto maior for a produção leiteira e derivados do leite, maior será a geração de resíduos.

3.2 Resíduos lácticos

Quando as empresas trabalham com o leite, seja na produção de queijos ou outros derivados, essa demanda causa impacto significativo ao meio ambiente pois geram resíduos ou coprodutos (DINIKA, 2019; UTAMA, 2019; LAPP *et al.*, 2019). Um dos resíduos lácticos (RL) mais poluentes é o soro de leite, que embora seja reaproveitado de muitas maneiras ainda resta muito resíduo (DINIKA, 2019; UTAMA, 2019; DINIKA *et al.*, 2020).

Esse efluente precisa ser tratado antes de ser descartado ou ser reutilizado. Partindo do pressuposto de reutilização, um ponto positivo seria a utilização desses resíduos como biomateriais, desenvolvendo embalagens biodegradáveis (CHOLLAKUP *et al.*, 2020).

A figura 2 mostra a imagem de dois tanques com capacidade de 10.000 e 5.000 litros respectivamente, onde ficam armazenados o leite proveniente da produção rural regional. A imagem foi registrada em um laticínio colaborador no município de Dois Vizinhos/Pr. Após o processo de produção de queijos, os resíduos são tratados nas lagoas de tratamento.

Figura 2 - Tanque de armazenamento de leite

Fonte: Autoria própria (2022)

O tamanho dos tanques pode variar de acordo com a demanda leiteira na região. Após a chegada do leite ao laticínio, são feitas diversas análises laboratoriais, onde é verificado se aquele leite está propício para o consumo. Após todas as análises esse leite é destinado aos tanques internos e dividido de acordo com a finalidade do produto desejado.

Durante o processo de elaboração de queijos sobram os chamados resíduos lácticos que são altamente poluentes e danosos ao meio ambiente. O tratamento desses resíduos tem alto custo para a indústria leiteira. Os principais resíduos oriundos da indústria leiteira são o soro de leite e a água de filagem (GONÇALVES; CARDARELLI, 2021).

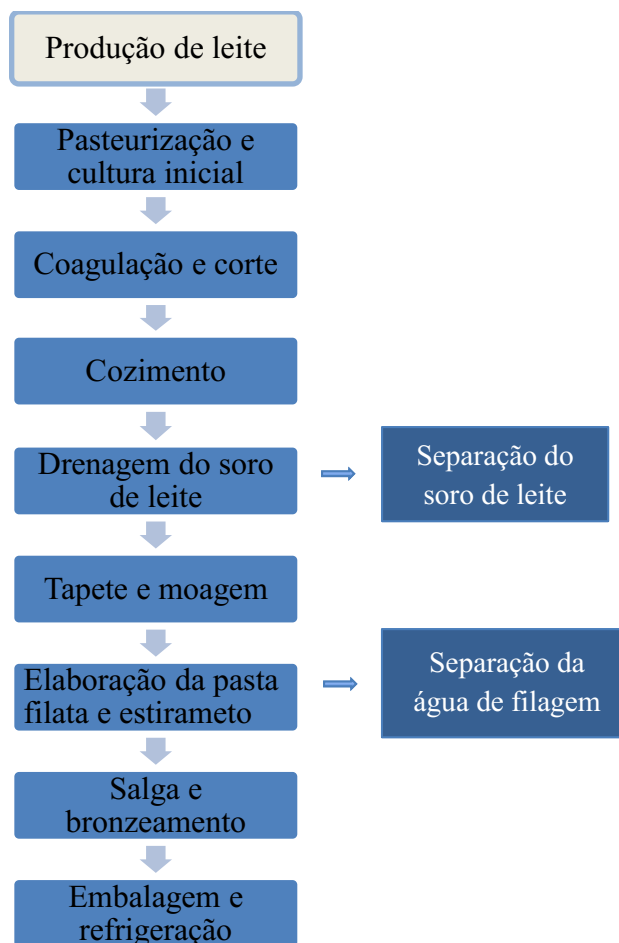
O tratamento dos resíduos lácticos varia de acordo com a sua composição, como já mencionado a maior parte deles é rica em gorduras, ácidos, matéria orgânica e nutrientes e existem diferentes tipos de tratamento. Nas estações de tratamento, também chamadas de lagoas é feito o tratamento primário, secundário e terciário (BRASIL, 2002; RODRIGUES, 2004; ANDRADE, 2011; SILVA, 2013).

No tratamento primário acontece o processo de remoção de resíduos sólidos, também chamados de sólidos grosseiros, óleos e gorduras também são retidos nessa etapa. No tratamento secundário, o objetivo é remover a matéria orgânica e os nutrientes restantes, para isso é utilizado lodo ativado, onde microrganismos aeróbios vão se alimentar dessa fonte nutritiva e transformá-la em CO_2 e H_2O . O tratamento terciário trabalha na remoção dos poluentes tóxicos e compostos não biodegradáveis (RODRIGUES, 2004; ANDRADE, 2011; SILVA, 2013). Todo esse processo aumenta a demanda biológica de oxigênio, fazendo com que os microrganismos envolvidos gastem mais energia (JUSTINA *et al.*, 2017).

O soro de leite justamente por ser rico em nutrientes (REVIN, 2018) pode ser aplicado em outros setores industriais. O soro é desidratado para obtenção do soro em pó, o mesmo apresenta granulometria fina e tende a absorver a umidade do ar, a cor estará relacionada diretamente ao aquecimento e desidratação do resíduo (CHOLLAKUP *et al.*, 2020). Ademais, ele pode ser reutilizado em diferentes formatos, como: Enriquecimento de bebidas lácticas (REGHELIM, 2018; BOSI *et al.*, 2013), suplementos alimentares (KOLESOVS, 2021), medicamentos (BOZA *et al.*, 2011), desenvolvimento de embalagens sustentáveis (REVIN *et al.*, 2018; ARIADNE *et al.*, 2020; KOLESOVS, 2021). Uma alternativa viável para o soro de leite seria reutilizar esse material, na elaboração de biofilmes e embalagens biodegradáveis (REVIN *et al.*, 2018).

As medidas volumétricas do soro de leite variam de acordo com a demanda dos laticínios, a cada 1 quilo de queijo, por exemplo, são gerados 8 litros de SL, o que resulta em uma produção anual gigantesca desse resíduo em território brasileiro (REGHELIM, 2018). De acordo com a EMBRAPA (2019) boa parte desses efluentes não são devidamente tratados, o que pode gerar grandes problemas ambientais devido a contaminação do solo e da água, na fig. 3 observa-se o ciclo da manufatura queijeira nos laticínios e as etapas em que acontecem a separação do soro de leite e formação da água de filagem. Esse é o processo que dá origem aos resíduos.

Figura 3 – Ciclo da manufatura de queijo



Fonte: Autoria própria (2023)

Primeiramente acontece a produção leiteira, que é feita das propriedades rurais e encaminhada para os laticínios com os caminhões isotérmicos. Assim que o leite chega é aferida a temperatura do leite, a temperatura deve compreender um intervalo de 7°C a 10°C, no máximo (BRASIL, 2002). Após, com a mangueira sanitária o leite é transferido para os tanques de armazenamento do laticínio a uma temperatura de 4°C a 5°C, conforme estabelecido na Instrução Normativa de número 51 (BRASIL, 2002).

Ainda seguindo a Normativa nº 51, é realizado o processo de pasteurização que pode se dar de duas formas:

- a) Pasteurização lenta → LTH (low temperature holding): O leite é aquecido à temperatura de 62°C a 65°C por 30 minutos.
- b) Pasteurização de curta duração (rápida) → HTST (high temperature short time). Nesse processo o leite é aquecido em uma temperatura de 72°C a 75°C durante 15 a 20 segundos.

A coagulação e o corte vêm logo após o resfriamento do leite pasteurizado, em seguida a massa é cozida e é realizada a drenagem que separa o soro de leite da massa, originando assim

o primeiro resíduo. Posteriormente, é feito a moagem, elaboração da pasta filata e estiramento, no momento do estiramento a massa formada é lavada por água fervente, a água que sobra dessa lavagem é o segundo resíduo, chamada de água de filagem ou água de estiramento, como já mencionado essa água é rica em ácidos e gorduras. Por fim, é realizada a salga, o queijo é embalado e resfriado para que não haja proliferação de microrganismos.

3.2.1 Caracterização do soro de leite

O soro de leite é a parte líquida amarelo esverdeada resultante da produção do queijo, e é o subproduto mais abundante nos laticínios (GONZÁLEZ SISO, 1996; DINIKA *et al.*, 2020). Em média, contém 55% dos nutrientes presentes no leite e é responsável por aproximadamente 80 a 90% do volume total (DINIKA *et al.*, 2020; MOHAMMADI *et al.*, 2020; ZANDONA; BLAŽIĆ; REŽEK JAMBRAK, 2021). Na tabela 1 pode-se observar a composição do soro de leite em porcentagem.

Tabela 1 - Composição do soro de leite

Parâmetros	Concentração(%)
Lactose	70%
Proteínas	14%
Minerais	9%
Gorduras	4%
Ácido láctico	3%

Fonte: Adaptado de Dinika et al. (2020)

A geração desse subproduto é considerada um poluente em potencial, sendo 100 vezes mais poluentes que o esgoto doméstico devido à grande demanda biológica de oxigênio (DBO) (POPPI *et al.*, 2010; LAPPÀ *et al.*, 2019). Esse efluente precisa ser tratado antes de ser descartado no ambiente. Em virtude da alta produção e grande demanda leiteira no Brasil é necessária que seja implementado a utilização sustentável do SL a fim de minimizar os impactos ambientais desse subproduto (ZANDONA; BLAŽIĆ; REŽEK JAMBRAK, 2021).

Imunoglobulinas, albuminas, α -lactalbumina, β -lactoglobulina são consideradas as principais proteínas do soro de leite. Filmes e revestimentos desenvolvidos com essas proteínas têm excelentes propriedades de barreira a gases (LIU *et al.*, 2013; POPPI *et al.*, 2010) devido às propriedades de resistência mecânica que bloqueiam a passagem de oxigênio, lipídeos e aromas (ANDRADE *et al.*, 2018). A lactoferrina também está presente no SL, e é considerada uma proteína bioativa com atividades antimicrobianas, tanto para bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, por essa razão quando utilizada de forma fracionada pode ser uma alternativa valiosa na produção de embalagens, pois retarda a proliferação dos microrganismos

(DINIKA *et al.*, 2020). Considerado um biomaterial promissor, o soro de leite pode ser utilizada para a elaboração de embalagens ativas, comestíveis e biodegradáveis (YOSHIDA; ANTUNES, 2009; ARIADNE *et al.*, 2020).

O fato desse resíduo ser rico em peptídeos, composto por moléculas de aminoácidos benéficos ao organismo e sua estrutura apresentar um efeito anti-hipertensivo, ao invés de ser reaproveitado em forma líquida, é interessante que o mesmo seja utilizado em pó, assim pode ser estabelecido um parâmetro para análise de metabólitos (RIBEIRO-SANTOS *et al.*, 2017; DINIKA *et al.*, 2020).

Além de suplementar a alimentação de animais (ARIADNE *et al.*, 2020) quando coletado em laticínios que produzem grande quantidade de SL, o mesmo pode ser processado em bioetanol, por outro lado, quando o resíduo é produzido em pequenas quantidades é viável a produção de bebidas fermentadas (ZANDONA; BLAŽIĆ; REŽEK JAMBRAK, 2021).

A lactose é um dissacarídeo higroscópico e é o principal hidrato de carbono encontrado no leite, ela é formada por glicose mais galactose (BATISTA *et al.*, 2018). As bactérias que desenvolvem a NCB precisam de uma fonte de carbono e nitrogênio (BRASÃO, 2017; HUSSAIN *et al.*, 2019), apesar das bactérias utilizarem a glicose como fonte primária de energia, um grupo de bactérias é capaz de metabolizar a lactose e utilizar no seu processo metabólico (ZANDONA; BLAŽIĆ; REŽEK JAMBRAK, 2021) pressupõe-se que as bactérias fariam seu ciclo metabólico completo com um meio de cultura que houvesse lactose, podendo o soro de leite ser um componente para um novo meio de cultura formando o substrato.

3.2.2 Caracterização da água de filagem

No Brasil, os laticínios que fabricam queijo muçarela, optam por utilizar o leite de vaca ou de búfala. Contudo, há um grande problema no gerenciamento dos efluentes que são produzidos no decorrer do processo de produção de queijos, a gordura e ácidos liberados na água de filagem são altamente poluentes e precisam ser tratados pela indústria antes de serem descartados no ambiente. Quanto mais gorduras e ácidos estiverem presentes nessa água, maior será o custo de tratamento (MENDES *et al.*, 2015).

A água de filagem é uma água quente onde o queijo é filado, no momento que o queijo entra em contato com essa água ele forma filamentos e libera gordura e ácidos (SABIONI, 2018; FACCIA *et al.*, 2022; GONÇALVES; CARDARELLI, 2021). Nessa etapa a coalhada é jogada na filadeira e o processo faz com que o produto fique com aspecto de barbante até obter a textura ideal ao final do processo, esse efluente também pode ser chamado de água de

estiramento. A carga orgânica da água de filagem não pode simplesmente ser descartada, pois ultrapassa os limites estabelecidos pela legislação (SABIONI, 2018; FACCIA *et al.*, 2022). Conforme prevê o art. 2º da Portaria N°537, de 24 de fevereiro de 2022 do MAPA a obrigatoriedade da recuperação adequada da AF e SL devido a gordura láctea (DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 2022).

Ao contrário do SL, que é rico em lactose e proteínas, a água de filagem é pouco valorizada, devido à baixa concentração de compostos, na literatura existem poucos estudos descrevendo sua composição e os dados existentes são conflitantes (GERNIGON; SCHUCK; JEANTET, 2010; GONÇALVES; CARDARELLI, 2021) conforme demonstrado no quadro 1:

Quadro 1 – Componentes da água de filagem

Componentes	Metzger <i>et al.</i> (2000)	Ardisson-Korat and Rizvi (2004)	Schafer and Olson (1974)	Rudan <i>et al.</i> (1999)
Gorduras	Presentes	Presença	Presença	Presença
Proteínas	Ausentes	Presentes	Ausentes	Ausentes
Matéria seca	Ausentes	Presentes	Presentes	Ausentes
Nitrogênio	Presentes	Presentes	Ausentes	Presentes

Fonte: Autoria própria (2023)

Na literatura não existem novas aplicações para esse resíduo, tão pouco alternativas sustentáveis. Diferente do SL, a AF não é utilizada em praticamente nada após o processo de filamentação de queijos, gerando um grande impacto econômico e ambiental.

3.3 Nanocelulose bacteriana

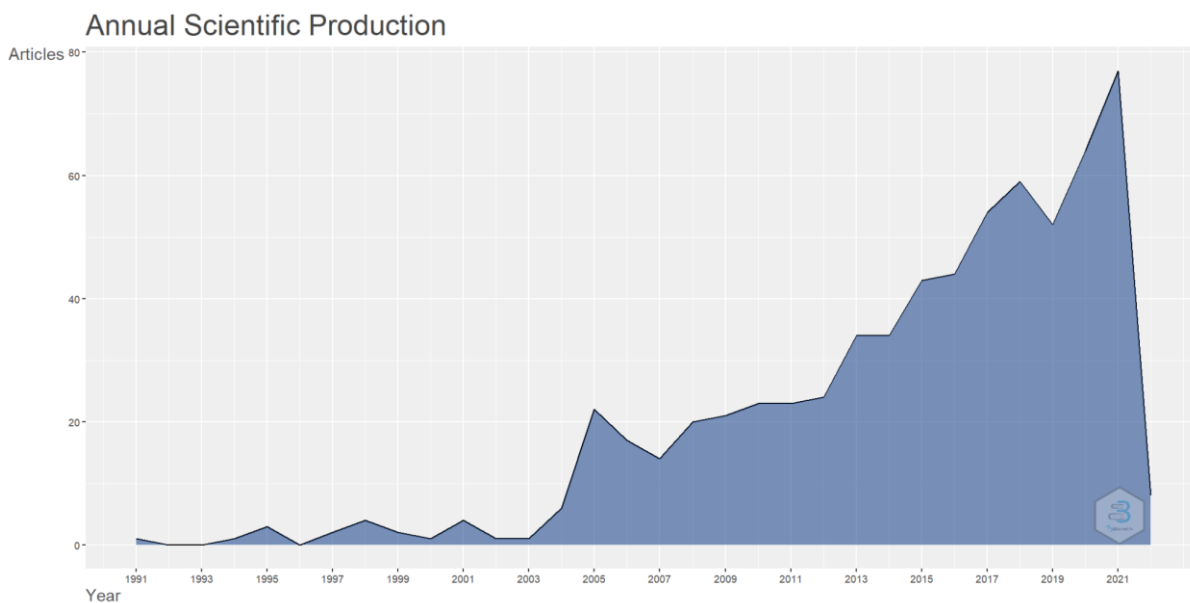
Ao iniciar a presente pesquisa foi realizada uma revisão bibliográfica, com o objetivo de entender como estão as pesquisas e publicações envolvendo a NCB no meio acadêmico, quais são os autores mais citados e aplicações recentes.

Brown (1886) foi o primeiro cientista a descrever a NCB, enquanto desenvolvia sua pesquisa voltada às bactérias ácidas na elaboração de vinagre e com o passar dos dias observou que havia se formado um tipo de película sobrenadante, mais tarde foi constatado que se tratava da celulose bacteriana produzida pela *Gluconacetobacter xylinus*.

Para construção do referencial teórico, as palavras-chave utilizadas para as buscas nas bases de dados foram: celulose bacteriana e biofilme, isso porque a pouco tempo os artigos vem trazendo a nomenclatura de nanocelulose bacteriana. Ao pesquisar na base de dados Web Of Science (WoS) com as palavras-chave: Bacterial cellulose and biofilm, obteve-se 674 resultados ao refinar foram selecionados apenas artigos e artigos de revisão, resultando em 662

trabalhos. Os artigos refinados foram exportados para o software bibliometrix, conforme gráfico:

Gráfico 1 - Produção científica anual



Fonte: Autoria própria (2022).

Nota-se que desde 1991 os cientistas vêm publicando suas pesquisas relacionadas a NCB e biofilme, porém essas pesquisas se intensificaram a partir de 2008 e em 2021 alcançaram o maior número de publicações voltadas a temática. Isso significa que os resultados obtidos nas pesquisas anteriores, bem como, os experimentos realizados, tem servido de base para novas pesquisas e sequência dos estudos sobre NCB voltadas para a produção de biofilme.

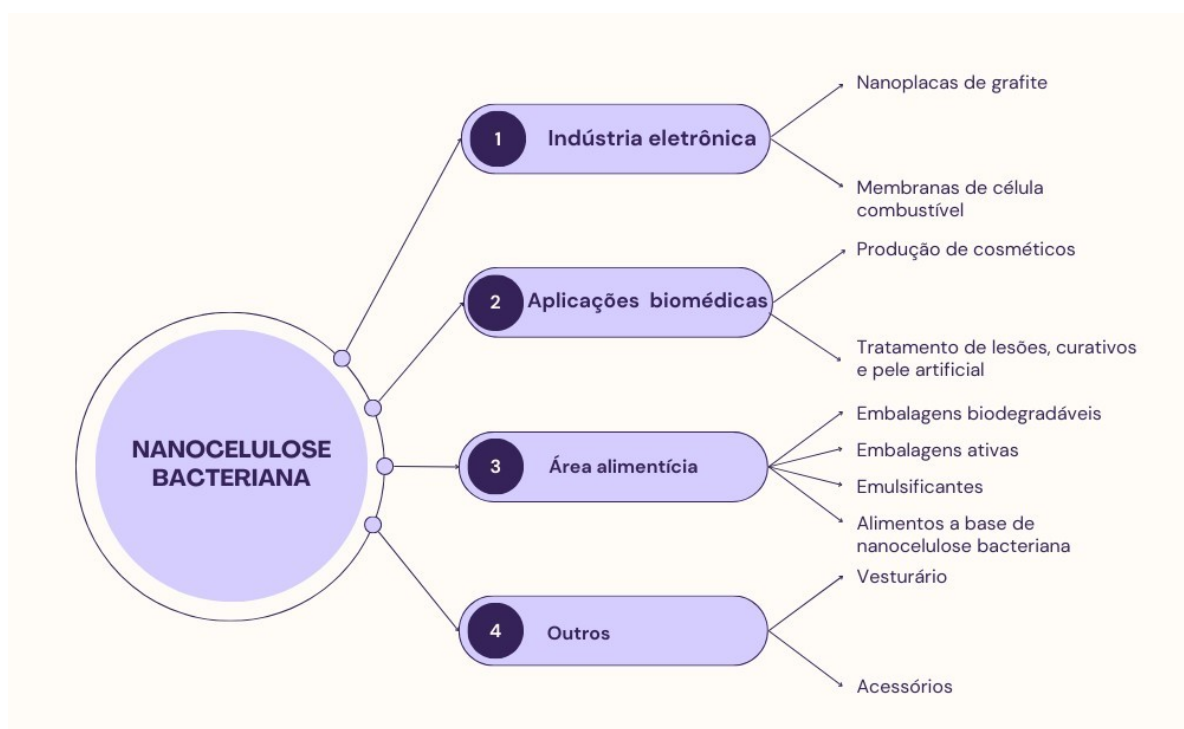
Considerada um biopolímero, tem sido muito promissora pelo fato de apresentar grande capacidade de absorver líquidos, ser biodegradável, estável, linear e não ramificada, em suas diferentes aplicações apresentam resultados positivos, tornando a NCB uma ótima matéria-prima (GOFMAN *et al.*, 2020; SPEROTTO *et al.*, 2021; JAMSHEERA; PRADEEP, 2021).

É inevitável a comparação da NCB com a nanocelulose vegetal (NCV). A NCV compõe a parede celular de todas as plantas, constituindo em média 40% da biomassa desses vegetais e é considerada biopolímero mais abundante do planeta (CHEN *et al.*, 2011) é um polissacarídeo de caráter linear que desempenha grande importância fisiológica e estrutural para as plantas e algas (THONGSOMBOON *et al.*, 2018; ŻYWICKA *et al.*, 2018). Por outro lado, a estrutura molecular da NCB se mostra mais versátil, eis que na maioria das vezes a NCV está propriamente ligada à lignina e hemicelulose (SINGHANIA *et al.*, 2021), já a NCB apresenta uma vantagem estrutural de pureza pela ausência de hemicelulose e lignina (BROWN, 1886). Da mesma forma, a NCB tem uma aplicabilidade sustentável, pode substituir diferentes tipos

de materiais e seu tempo de degradação no ambiente é baixo, isso é uma grande vantagem ambiental (THONGSOMBOON *et al.*, 2018; ŻYWICKA *et al.*, 2018).

Nas últimas décadas, nota-se o aumento no número de pesquisas e experimentos utilizando a NCB, os pedidos de patentes cresceram, chegando a 7.371 no ano de 2020 (GREGORY, 2021). Na fig. 4 estão elencadas as principais aplicações de nanocelulose bacteriana.

Figura 4 - Aplicações de nanocelulose bacteriana



Fonte: Autoria própria (2023).

Por muito tempo, buscou-se fontes para elaborar um material que fosse transparente, flexível e tivesse resistência para implementar na indústria eletrônica, substituindo assim o vidro (DE AMORIM *et al.*, 2020). A NCB se destacou, pois, além de apresentar as características de transparência e flexibilidade, pode ser utilizada em aparelhos eletrônicos, em nanogeradores triboelétricos, antenas, microchips e transistores de filme fino (ZHU *et al.*, 2014; SEOL *et al.*, 2018). Apresentou também boa condutibilidade de íons e elétrons (XIE *et al.*, 2018).

Conforme observado na figura 3, a NCB pode ser utilizada em aplicações médicas, por apresentarem estruturas semelhantes aos tecidos (LIN; DUFRESNE, 2014), podem ser utilizadas no tratamento de queimaduras (CHU *et al.*, 2018). Durante o desenvolvimento das membranas, pode haver a incorporação de agentes cicatrizantes, o que é muito importante para

curativos multifuncionais e favorece o uso da NCB para regeneração da pele e utilização em tratamentos cosméticos (CHU *et al.*, 2018).

Na área alimentícia a celulose bacteriana tem um papel muito importante. De Amorim *et al.*, (2020) descreveu que uma das primeiras aplicações da NCB voltada aos alimentos, foi como aditivo alimentar, porém o curso dessa incorporação era muito alto tornando a comercialização do produto inviável.

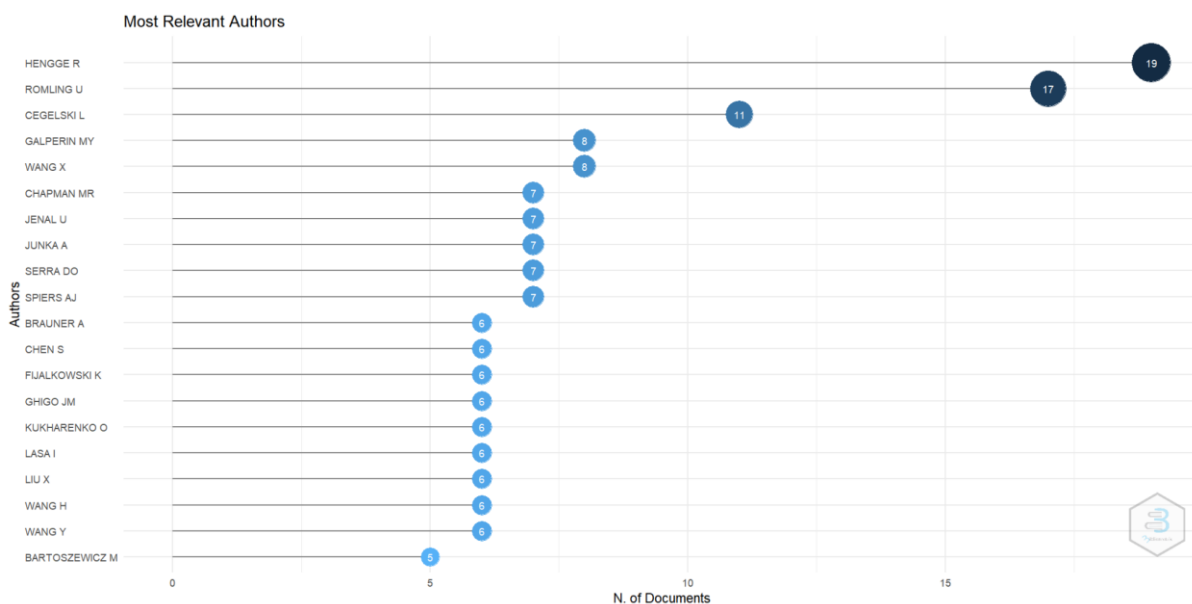
Com o passar dos anos e aumento no número de estudos, observou-se que poderiam ser desenvolvidas embalagens a partir da NCB, uma vez que ela possui uma estrutura química com propriedades de barreira capaz de preservar o alimento embalado, evitando a contaminação cruzada (BIDEAU; LORANGER; DANEULT, 2018; AZEREDO *et al.*, 2019).

Devido ao arranjo das nanofibrilas e a facilidade de manipulação, os numerosos grupos funcionais hidroxil permitem a mesma seja funcionalizada, possibilitando seu emprego no desenvolvimento de compósitos poliméricos (ROL *et al.*, 2019; RAISZADEH-JAHROMI *et al.*, 2020).

A NCB apresenta uma estrutura 100 vezes mais fina que a NCV construindo uma rede entrecruzada de microfibrilas, o que aumenta a área de superfície favorecendo as interações que a circundam. As microfibrilas formam essa teia de unidades monoméricas ligadas por β -1,4 ligação glicosídica, por isso apresenta alto grau de polimerização, resistência mecânica e capacidade de retenção de água (RAISZADEH-JAHROMI *et al.*, 2020; GREGORY *et al.*, 2021).

No gráfico 2, pode-se observar os pesquisadores de maior relevância e que mais publicaram nas últimas três décadas e no gráfico 3 os países onde essas publicações ocorreram.

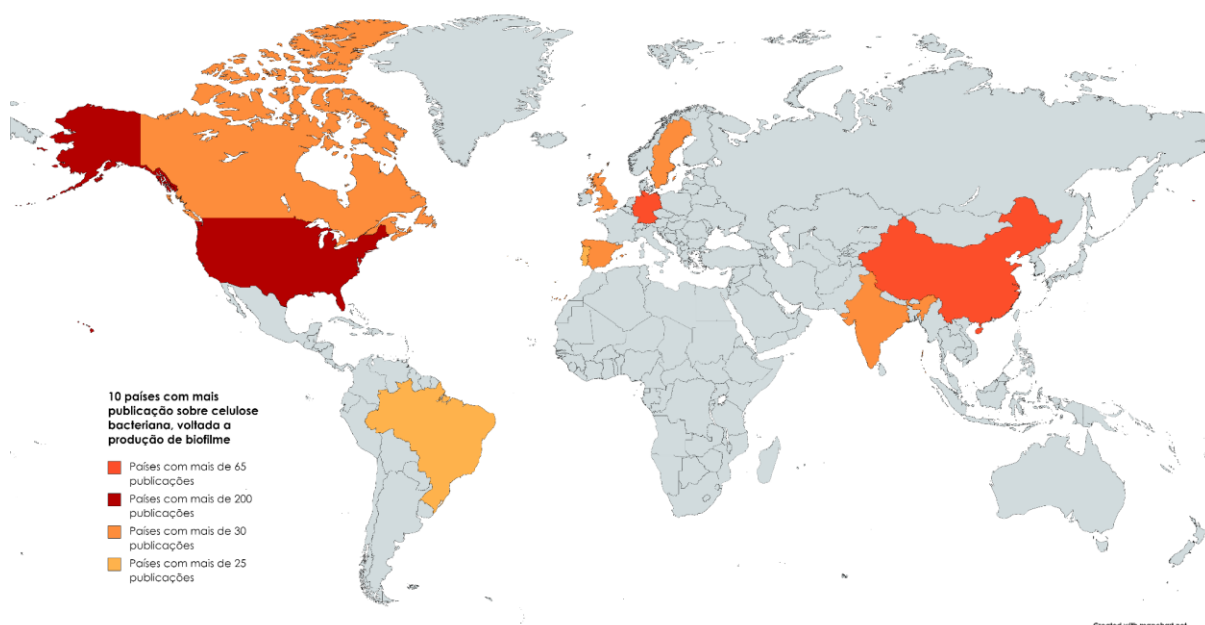
Gráfico 2 - Autores de maior relevância



Fonte: Autoria própria (2022)

Nota-se que os países desenvolvidos apresentam maior número de pesquisas sobre NCB voltada ao desenvolvimento de biofilmes. Estados Unidos da América, se destaca com 205 publicações, Alemanha e China 69, Espanha 38, Suécia 36, Canadá 34. Inglaterra 33, França 29 e Brasil 26. Outros países apresentaram publicações, porém em menores quantidades.

Gráfico 3 - Países com maior número de publicações



Fonte: Autoria própria (2022)

Cada pesquisador define a cepa que será utilizada e qual meio de cultivo será apropriado de acordo com o objetivo final do trabalho.

Sharma *et al.* (2019), aponta algumas desvantagens sobre aplicações da NCB, como por exemplo a dificuldade de fixação interfacial, grande capacidade de retenção de água, que em algumas aplicações é vantajosa e em outra nem tanto e uma das maiores desvantagens é o alto custo do meio de cultivo. Para melhorar esses aspectos, tem sido estudado e produzidas membranas em meios modificados, com alterações no meio de cultivo substituindo alguns reagentes por resíduos, sendo esses naturais ou industriais (ROCHA *et al.*, 2014; FERNANDES *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016; DE AMORIM *et al.*, 2020).

3.3.1 Principais bactérias utilizadas na produção de nanocelulose bacteriana

Diversas espécies bacterianas podem ser utilizadas na produção de nanocelulose bacteriana (NCB). Ela é produzida principalmente por espécies de bactérias não patogênicas, ou seja, que não colocam a saúde em risco, geralmente Gram-negativas de vida livre (JAMSHEERA; PRADEEP, 2021).

Alguns exemplos de gêneros bacterianos mais utilizadas são as: *Acetobacter*, *Salmonella*, *Rhizobium*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium* e *Pseudomona* que são Gram-negativas e por *Sarcina ventriculi*, que são Gram-positivas (GORGIEVA; TRČEK, 2019). O *Komagataeibacter* é considerado um dos gêneros mais eficazes na produção de NCB, antigamente eram classificados como *Acetobacter sp* (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

O gênero *Komagataeibacter* pertence ao grupo das BAA (Bactérias do ácido acético) e é capaz de metabolizar uma grande quantidade de fontes de carbono para produzir NBC, organismos que pertencem a esse gênero são aeróbicos, gram-negativos e se apresentam com formato de bastonete, são positivos para catalase e negativos para oxidase (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; GORGIEVA; TRČEK, 2019; JAMSHEERA; PRADEEP, 2021).

As espécies *Komagataeibacter nataicola*, *Komagataeibacter rhaeticus*, *Komagataeibacter saccharivorans*, *Komagataeibacter oboediens*, *Komagataeibacter hansenii*, *Komagataeibacter medellinensis* e *Komagataeibacter xylinus* são conhecidas por serem super produtoras de NCB (SKRABAN *et al.*, 2018; GORGIEVA; TRČEK, 2019). No quadro 2 observa-se a condição estática e os meios de cultura trazidos por alguns pesquisadores.

Quadro 2 - Principais espécies de bactérias do gênero *Komagataeibacter*

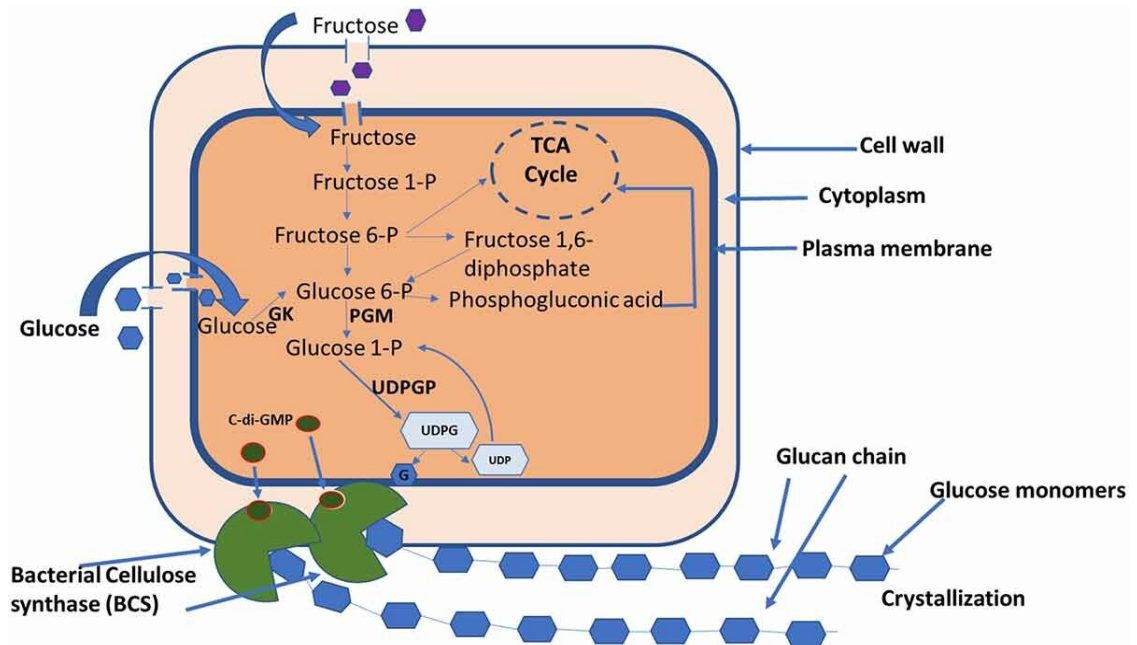
Microrganismo	Condição estática	Meio de cultivo	Autor
<i>K. xylinus</i>	28 a 30°	HS	GORGIEVA; TRČEK (2019)
<i>K. medellinensis</i>	30°	HS	MOHAMEDI (2017)
<i>K. nataicola</i>	30°	Heng Zhang (HZ)	ZHANG <i>et al.</i> (2017)
<i>K. saccharivorans</i>	30°	HS	GOPU; GOVINDAN (2018)
<i>K. oboediens</i>	23°	HS modificado	HITBANYONG <i>et al.</i> (2020)
<i>K. rhaeticus</i>	22°	HS	GOFMAN <i>et al.</i> (2020)
<i>K. hansenii</i>	30°	HS	LIMA <i>et al.</i> (2017)

Fonte: Autoria própria (2023)

Os microrganismos pertencentes a espécie *K. xylinus* são aeróbicos, Gram-negativos na forma de bastonetes, apresentam capacidade de oxidar o ácido acético e etanol e são considerados modelo para biogênese, por essa razão é considerada uma bactéria referência quando se trata de NCB (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; GORGIEVA; TRČEK, 2019; JAMSHEERA; PRADEEP, 2021).

Na figura 5, tem-se o mecanismo de biossíntese da NCB pela *K. xylinus*, onde a biossíntese da NCB se dá principalmente pela glicose, porém podem ser empregadas diferentes fontes de carbono e nitrogênio (SINGHANIA *et al.*, 2021). Na rota metabólica durante a produção da NCB, o ácido acético é apresenta grande potencial metabólico na geração de ATP e pode aumentar a quantidade de glicose disponível (ZHONG *et al.*, 2013; GULLO *et al.*, 2016; REVIN *et al.*, 2018).

Figura 5 - Mecanismo de biossíntese de celulose em *Komagataeibacter xylinus*



Fonte: SINGHANIA *et al.*, 2021.

Legenda: GK = Glucoquinase, PGM = Fosfoglucomutase, UDP = Uridil difosfato, UDPG = Uridil difosfato glicose, UDPGP = UDPG fosforilase, C-di-GMP = ácido diguanílico cíclico

Apesar da glicose ser indispensável para que rota metabólica da bactéria aconteça, é válido pensar em fontes alternativas de C, observando as várias fontes disponíveis no planeta dentre elas os resíduos, que podem se tornar uma alternativa viável e, com isto, diminuir o impacto ambiental ocasionado pela indústria leiteira.

3.4 Meios de cultura

Para que uma bactéria permaneça viva e produza o biofilme, é necessário que tenha oxigênio e uma fonte de nutriente, geralmente o carbono e o nitrogênio. Para a produção de NCB é preciso ter um meio de cultura que contenha os nutrientes necessários para seu desenvolvimento.

Para sintetizar lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos são utilizados os macronutrientes: hidrogênio (H), oxigênio (O), nitrogênio (N), fósforo (P), enxofre (S) e carbono (C) já o potássio (K), magnésio (Mg), ferro (Fe) e cálcio (Ca) desempenham diversas funções celulares (SPEROTTO *et al.*, 2021).

Os meios de cultura podem ser classificados em categorias diferentes, isso porque alguns são complexos e chamados de não definidos e outros são sintéticos chamados de definidos, cada meio de cultura pode apresentar vantagens e desvantagens (SPEROTTO *et al.*, 2021).

Apesar das bactérias se desenvolverem em diferentes meios de cultura e produzirem a NCB, um dos meios de cultura mais utilizado é o HS. Na tabela 2 está descrita a composição do meio.

Tabela 2 - Composição do meio HS

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

Fonte: Hestrin e Schramm (1954)

Outros meios de cultura utilizados no desenvolvimento da NCB são Yamanaka (Y) e Zhou (Z). O meio Y é composto por glicose, extrato de levedura, fosfato de sódio, fosfato monobásico de potássio e epsomite, já o meio Z é composto por glicose, licor de milho, fosfato de sódio, fosfato monobásico de potássio e epsomite (MOHAMMADKAZEMI; AZIN; ASHORI, 2015). O Manitol também é utilizado como meio de cultura, e é composto por: Dmanitol: 25,0 g/L; bacto-peptona: 3,0 g/L; extrato de levedura: 5,0 g/L; ágar: 15,0 g/L (POSTIGO *et al.*, 2020).

Outro meio de cultura que tem sido uma possibilidade é o meio Mínimo, a intenção desse substrato é que a NCB seja produzida com o mínimo possível de reagentes. Ele foi desenvolvido utilizando como referências o meio Manitol e o meio HS. A NCB produzida com o meio Mínimo apresenta maior absorção de água quando comparada ao Manitol, o que pode se explicar através da maneira como as microfibrilas estão arrançadas nas membranas de NCB (SOUZA *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2022) apresentando alta cristalinidade, elasticidade e grande extensão de alcance das nanofibrilas (SOUZA *et al.*, 2022).

Além do meio de cultura ser essencial para o desenvolvimento da NCB, existem variáveis que podem interferir durante o desenvolvimento das bactérias, sendo eles: a temperatura, estática e agitação, pH e oxigenação. É necessário que haja sincronidade em

todos esses fatores para que se desenvolva uma celulose bacteriana resistente (JAMSHEERA; PRADEEP, 2021).

Embora os meios de cultura desenvolvidos até o momento tenham obtido resultado satisfatório, em suas composições ainda não utilizado reagentes de grande valor econômico, fazendo com que a produção de NCB se torne cara. Diversos resíduos agroindustriais podem ser utilizados para cultivo e crescimento de celulose bacteriana, como por exemplo: suco de frutas, melação de cana, melação de beterraba, água de coco e soro de leite. (GOMES, *et al.* 2013).

Visando baratear o custo de produção da NCB, nessa pesquisa pensou-se em desenvolver um meio modificado utilizando como base o meio HS, descrito na tabela 4. Os experimentos foram realizados em condições estéreis e armazenados em falcons na BOD em condição estática a 28°C por sete dias. Esse experimento foi utilizado como controle no início da pesquisa, conforme observado na fig. 6.

Figura 6 - Produção de NCB com meio HS



Fonte: Autoria própria (2023)

Quando foi pensando em baratear o meio de cultura, foi analisada a possibilidade de utilizar resíduos que fossem ricos em fontes de carbono, nitrogênio e não tivesse potencial bactericida. Conforme descrito, os resíduos oriundos da indústria leiteira são abundantes e preocupantes para o ambiente.

Conforme caracterização dos dois principais resíduos (tópicos 3.3 e 3.4) que se formam principalmente na produção do queijo muçarela, detecta-se a presença de nutrientes que podem ser utilizados na rota metabólica na *K. xylinus*. Assim foram aplicadas as metodologias para testagem e verificação de possíveis modificações.

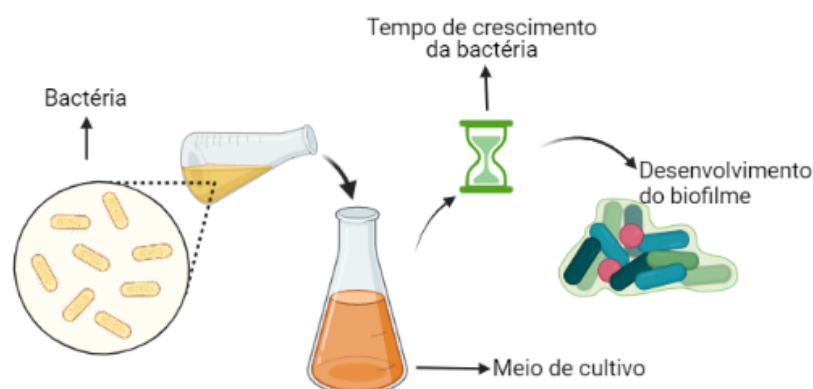
3.5 Biofilme

Um tipo de revestimento que se destaca no quesito sustentabilidade é o biofilme. Esse tipo de revestimento além de fornecer uma barreira física entre o produto e o ambiente pode apresentar funções específicas de acordo com a sua formulação e o produto que será revestido (SANTOS *et al.*, 2021).

Denomina-se biofilme uma comunidade microbiológica de natureza complexa, que se diferencia das demais por apresentar grande capacidade de adesão e compartilham uma matriz extracelular, esses organismos são protegidos pela matriz formada por eles, e geralmente se prendem à superfície do meio (SALDANHA, 2013; WAGNER *et al.*, 2021).

Esses microrganismos se agrupam formando um filme, seu metabolismo se dá através de alguma fonte de carbono presente no meio de cultivo, podem desenvolver os biofilmes com diferentes bactérias e diferentes meios de cultivo (BRASÃO, 2017; SPEROTTO *et al.*, 2021).

Figura 7 - Representação ilustrativa da formação do biofilme

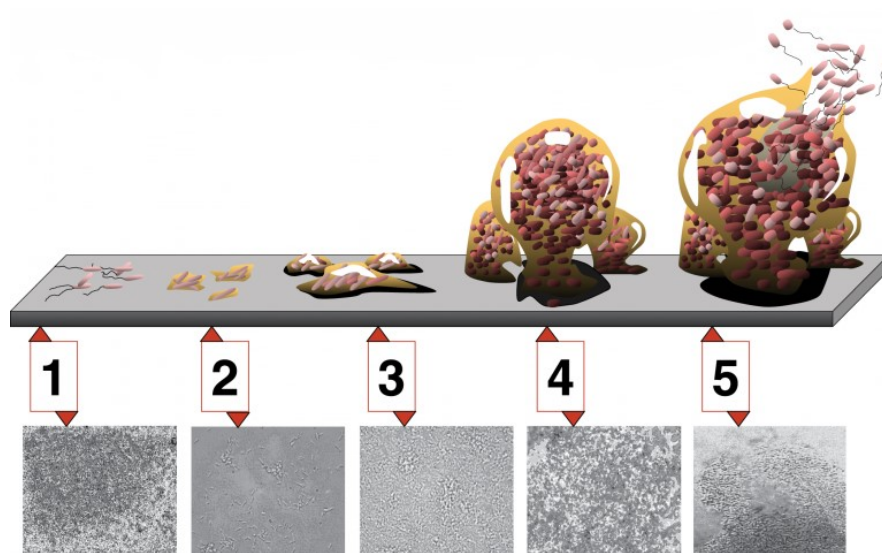


Fonte: Autoria própria (2023)

A formação do biofilme se dá em cinco estágios diferentes, conforme se observa na figura 7.1. A primeira etapa do processo de formação do biofilme é a adesão, nessa etapa acontece o processo de fixação das células na superfície (SERRA; RICHTER; HENGGE, 2013; CAPELLETTI, 2016; WAGNER *et al.*, 2021). A segunda etapa se dá pela fixação

irreversível, ou seja, a partir deste nível não é possível reverter o processo (MONROE, 2007). Na terceira etapa o biofilme começa a ganhar forma e passa pela primeira maturação (MONROE, 2007; CAPELLETTI, 2016). Na quarta etapa o filme fica com sua arquitetura formada passa pela segunda maturação (MONROE, 2007; CAPELLETTI, 2016). Na última etapa do ciclo de vida do biofilme acontece a dispersão, nesse processo as células se dispersam de forma ativa ou passiva e podem dar origem a novos biofilmes (MONROE, 2007, CAPELLETTI 2016; WAGNER, 2020), conforme observado na fig. 7.1.

Figura 7.1 - Os 5 estágios do biofilme



Fonte: Monroe (2007).

Além de serem utilizados como revestimentos, os biofilmes podem servir de moradia para espécies deteriorantes que podem ser transferidas para o alimento e conseqüentemente reduzir a durabilidade e qualidade dos mesmos, os alimentos mais aquosos tendem a deteriorar mais rápido, por isso é necessário saber qual microrganismo utilizar para que não ocorra contaminação (ODEYEMI *et al.*, 2020; WAGNER *et al.*, 2020).

A utilização da NCB tem sido tema de muitas pesquisas na área dos biofilmes. Isso porque tem diversas aplicabilidades e pode ser elaborada a partir de bactérias de espécies diferentes, inclusive não nocivas e também meios de cultivo alternativos, que viabilizem a sua produção.

3.6 Desenvolvimento de embalagens como possibilidade

Partindo do pressuposto da sustentabilidade e da conservação alimentícia surgiram as embalagens ativas (EA). Esse tipo de revestimento foi elaborado para interagir com o produto, conservar as propriedades nutricionais e aumentar o tempo de vida útil (ANDRADE *et al.*, 2018; ANDRADE *et al.*, 2019).

Existem dois tipos de embalagens ativas: A primeira é a embalagem absorvente, que absorve os compostos liberados pelo alimento; A segunda é a embalagem de liberação, esse tipo de EA libera substância das embalagens para o produto (HUNTRAKUL *et al.*, 2020).

A incorporação de ingredientes ativos na embalagem, por exemplo, agentes antioxidantes e antimicrobianos podem estender a vida útil devido à liberação de compostos ativos que compensam as propriedades de baixa barreira (WANGPRASERTKUL; SIRIWATTANAPONG; HARNKARNSUJARIT, 2021).

O biofilme desenvolvido com NCB pode ser tornar uma embalagem ativa, para isso são necessários vários testes com extratos e bioativos, mas estima-se que os resultados sejam promissores quanto a incorporação de extratos *ex situ*, ou seja, depois que a membrana de NCB já está formada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos resíduos

O soro de leite (SL) bem como a água de filagem (AF), foram doados por um laticínio na região sudoeste. Foram coletadas aproximadamente 1L de cada amostra no dia 25/11/2021, as amostras foram então fracionadas em pequenos frascos de aproximadamente 100 mL e armazenadas em freezer a -17°C.

4.2 Produção dos meios de cultura

O meio padrão utilizado para produção de NCB é o Hestrin Schramm (HS para o preparo de um litro de meio padrão são utilizados 20 g de glicose, 5,0 g de extrato de levedura, 5,0 g de peptona, 2,7 g de fosfato de sódio (Na₂HPO₄) e 1,15 g de ácido cítrico conforme descrito na tabela 4. Em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave por 20 min a 121°C (HESTRIN SCHRAMM, 1954). O meio foi manuseado apenas dentro do fluxo para evitar contaminação e após foi armazenado na geladeira à temperatura média de 7°C.

Para a produção dos meios modificados, inicialmente as amostras de SL e AF passaram pela padronização do valor de pH para 4,5, utilizando uma solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L, e pelo processo de centrifugação utilizando a centrífuga Nova técnica, modelo NP810.

As amostras foram centrifugadas em tubos falcon de 50 mL a 2.500 RPM por 10 min, após foram centrifugadas novamente por 5 min a 3.000 RPM. Depois do processo de centrifugação o sobrenadante foi coletado e autoclavados por 20 min a 121°C (RAISZADEH-JAHROMI *et al.*, 2020).

As amostras de SL e AF tratadas e autoclavadas foram utilizadas para a produção dos meios modificados a partir da substituição do extrato de levedura e peptona. Além disso, testou-se o uso desses resíduos sem qualquer meio para produção (quadro 3).

Quadro 3 – Modificações do meio de cultura

Modificações	Soro de leite	Água de filagem
Resíduo puro + inóculo	NCB_SL (a)	NCB_AF (a)
80% de HS + 20% de resíduo + inóculo	NCB_SL (b)	NCB_AF (b)
50% de HS + 50% de resíduo + inóculo	NCB_SL (c)	NCB_AF (c)
HS modificado, sem peptona + inóculo	NCB_SL (d)	NCB_AF (d)
HS modificado, sem extrato de levedura + inóculo	NCB_SL (e)	NCB_AF (e)
HS modificado, sem peptona e sem extrato de levedura	NCB_SL (f)	NCB_AF (f)

Fonte: Autoria própria (2022)

Legenda: HS: Hestrin-Schramm; NCB: Nanocelulose bacteriana; SL: Soro de Leite; AF: Água de filagem.

4.3 Cultivo do microrganismo e preparação do inóculo

A bactéria *Komagataeibacter xylinus* (ATCC® 53524™) foi utilizada neste trabalho. Foi necessário a reativação da cepa armazenada em um estoque em ultra-freezer a -80°C . Foi realizado o descongelamento de uma alíquota de 1 mL do estoque e seguidamente adicionado em um tubo com 4 mL de meio HS, e homogeneizado em vortex. Todo este processo foi realizado na cabine de fluxo laminar. Os tubos foram colocados em BOD a 30°C em cultura estática por 7 dias. O cultivo reativado foi aumentado em frasco erlenmeyer, chamado de inóculo. Este inóculo tinha proporção de 10 % (v/v) do cultivo da reativação. Então, para obter inóculo de 50 mL, foi necessário preparar uma solução 45 mL de meio HS e 5 mL do cultivo reativado, e colocado em BOD a 30°C por 7 dias. Este inóculo foi utilizado em experimentos posteriores. A figura 8, demonstra um exemplo do processo de inoculação.

Figura 8 – Reativação de inóculo e aumento em placas de 24 poços



Fonte: Autoria própria (2023).

4.4 Produção, purificação e secagem das membranas de nanocelulose bacteriana

Para a produção das membranas foram realizadas duas condições com o grupo controle (uma para cada resíduos) e seis modificações para cada condição de desenvolvimento da NCB, para os resíduos de SL e AF conforme tabela 3.

Tabela 3 - Volumes do meio HS, HS modificado com resíduo e inóculo para síntese das membranas

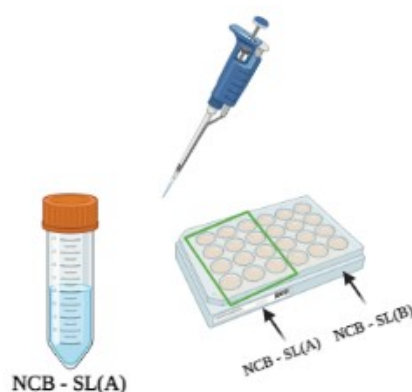
Modificação	Meio HS e HS modificado (mL)	Resíduo (mL)	Inóculo (mL)	Volume total (mL)
GC	HS completo	-	2,4	24
A	Resíduo puro	21,6	2,4	24
B	HS + 20% de resíduo	4,8	2,4	24
C	HS + 50% de resíduo	12	2,4	24

D	HS modificado (sem peptona)	0,5	2,4	24
E	HS modificado (sem extrato de levedura)	0,5	2,4	24
F	HS modificado (sem peptona e extrato de levedura)	1,0	2,4	24

Fonte: Aatoria própria (2023)

Foram utilizadas placas de 24 poços para produção das membranas. Para melhor manuseio e exatidão cada condição foi preparada em tubos falcon (50 mL) e depois utilizando a micropipeta foram pipetados 2 mL das condições em cada poço. Em cada placa foram produzidas 12 membranas de cada condição. Conforme exemplo demonstrado na fig. 9.

Figura 9 – Exemplo de produção das membranas em placas de 24 poços.



Fonte: Aatoria própria, utilizando o software biorender (2023)

Todas as placas com as membranas foram devidamente identificadas e armazenadas na BOD por oito dias a 28° C.

Após o período de incubação as membranas de cada condição estabelecida para o SL e AF, foram purificadas com a utilização de um béquer contendo solução 0,1 mol/L de hidróxido de sódio. O intuito da purificação é que todas as bactérias presentes nas membranas tenham sido removidas das fibras da NCB, para isso os biofilmes foram mantidos na solução alcalina por 24 horas na estufa a 50°C. Em seguida, foi realizada a lavagem dos biofilmes por sete vezes em intervalos de 15 min até o pH atingir a neutralidade, na sétima lavagem, como último processo da purificação as membranas foram autoclavadas por 20 min a 121°C.

Após a purificação parte das membranas produzidas de cada condição para cada resíduo foram liofilizadas. Para esse processo as membranas foram congeladas a -20°C por 24 horas, depois foram liofilizadas por um período de 24 horas. Esses biomateriais foram reservados para análises posteriores.

4.5 Caracterização dos biofilmes

4.5.1 Caracterização dos resíduos utilizados

Foram determinadas a quantidade de Carbono orgânico total e nitrogênio total. Os valores de Carbono Total (TC), Nitrogênio Total (NC), foram determinadas utilizando o Analisador de Carbono Orgânico Total (TOC-LCSH, Shimadzu®). O equipamento realiza uma triplicata das leituras como média e desvio padrão para as amostras de soro de leite e água de filagem. Foi realizado também a determinação do valor inicial de pH de cada resíduo.

4.5.2 Peso úmido e espessura das membranas

Para analisar o peso foi levado em consideração o peso úmido das membranas produzidas nas placas de 24 poços, nas diferentes condições (AF e SL) e modificações por 7 dias a 28°C comparando com as membranas do grupo controle e as espessuras foram medidas com paquímetro analógico.

4.5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Micrografias com aproximações de 5.000x e 10.000x dos biomateriais de NCB foram obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura (Marca Quorum, Modelo SC7620) para avaliação da porosidade e da microestrutura do lado superior e inferior das membranas. As análises foram realizadas no Centro de Caracterização Multiusuário em Pesquisa e Desenvolvimento de Materiais (C₂MMa) UTFPR *campus* Ponta Grossa. Para a análise, as amostras foram cortadas em 3x3 cm e recobertas por ouro.

4.5.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para analisar qualitativamente o efeito da adição dos resíduos na composição das membranas, foi realizada a análise dos espectros de FTIR. Para análise de espectroscopia de infravermelho foi utilizado amostras de 1x1 cm para leitura em uma faixa de 400 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e acumulação de 32 varreduras. A análise foi realizada no Laboratório Multiusuário Central de análise (CA) da UTFPR *campus* Pato Branco/Pr.

4.5.5 Análise de viabilidade econômica

Baseado nos valores médios dos reagentes utilizado para produção do meio HS, foi tabelado o cálculo com base na substituição dos reagentes pelos resíduos, gerando uma média econômica por litro de meio/substrato.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização dos resíduos

Os resíduos foram caracterizados através das amostras de Carbono Total (TC), Nitrogênio Total (NC) e pH, foram descritas na tabela 4.

Tabela 4 – Caracterização dos resíduos

Parâmetro (mg/L)	Soro de Leite	Água de Filagem
Carbono total	42550 ± 212,1	3920 ± 176,8
Nitrogênio total	1050 ± 14,1	74 ± 1,13
pH	6,05±0,07	6,05±0,07

Fonte: Autoria própria (2023)

A determinação do carbono total, nitrogênio total e pH são importantes para observar e analisar a produção do biofilme utilizando os diferentes resíduos e comparar os resultados obtidos após a experimentação.

As fontes de C e N possibilitam que a bactéria desenvolva e forme o biofilme, no caso da *K. xylinus* eles são a principal fonte de energia para que ela consiga se reproduzir e essa fonte de energia deve estar presente no meio de cultura.

O carbono total do SL é consideravelmente maior que o carbono total da AF, o que justifica o fato de a NCB ter formado o biofilme na condição A, apenas com o resíduo puro de SL (tabela 5), diferentemente da AF que não formou o biofilme na condição A (tabela 6).

O nitrogênio total também está concentrado em maior quantidade no SL, conforme descrito por MÜLLER *et al.* (2011) os aspectos mais relevantes para produção de NCB são as fontes de C, N e pH.

O pH inicial não foi satisfatório, tendo em vista que as bactérias da espécie *Komagataebacter xylinus* são microrganismos gram-negativos e ácido acéticos, ou seja, se desenvolvem mais com o pH abaixo de 5 (LIMA, 2017), por essa razão foi realizado o ajuste do pH inicial para 4,5, que foi satisfatório para o desenvolvimento de NCB.

Conforme resultados obtidos através da microscopia eletrônica de varredura constatou-se que os experimentos realizados com condição D, tanto com água de filagem quanto com soro de leite foram os que mais se aproximaram do grupo controle. Foi possível observar que as microfibrilas ficaram muito próximas, deixando a membrana com a densidade adequada para posteriores aplicações e desenvolvimento de biomateriais, comprovando que a peptona pode ser substituída em igual quantidade por qualquer um dos dois resíduos. As outras condições também apresentaram características importantes e abrem espaço para futuras aplicações.

5.2 Peso úmido e espessura das membranas

Para ilustrar o peso úmido e espessura das membranas de NCB foram elaboradas duas tabelas. A tabela 5 descreve a média do peso em miligramas e espessura das membranas em milímetros, todas cultivadas em placas de 24 poços por 7 dias, utilizando como resíduo para o meio modificado do soro de leite.

Tabela 5 – Média e desvio padrão do peso úmido e espessura das membranas em meio modificado com SL

Condições	Média do peso em mg e desvio padrão	Espessura em mm
GC	2,28±0,03	2
A	0,55±0,00	1
B	2,22±0,10	1,5
C	2,00±0,00	1
D	5,02±0,04	2,5
E	2,28±0,04	1,5
F	1,08±0,01	0,8

Fonte: Autoria própria (2023)

Legenda: GC (grupo controle), A (resíduo puro + inóculo), B (HS + 20% de resíduo + inóculo), C (HS + 50% de resíduo + inóculo), D (HS modificado, substituindo a peptona pelo resíduo + inóculo), E (HS modificado, substituindo o extrato de levedura pelo resíduo + inóculo), F (HS modificado, substituindo a peptona e extrato de levedura pelo resíduo + inóculo).

Ao observar a tabela 5, nota-se que o biofilme se desenvolveu em todas as condições propostas, neste caso o grupo controle (GC) é utilizado como um parâmetro para as demais condições. Na condição D, constatou-se a membrana com maior pesagem e espessura, nesse caso a peptona foi substituída pelo soro de leite, alterando assim a fonte de C e N utilizada pela bactéria (HUSSAIN *et al.*, 2019) a alteração da fonte de nutrientes possibilitou que o desenvolvimento do biofilme fosse mais volumoso do que o biofilme desenvolvido no grupo controle.

Por outro lado, na condição F onde não havia presença de peptona e extrato de levedura o volume foi baixo, isso pode ter ocorrido pelo fato de que além de ser uma fonte de N, o extrato de levedura também fornece aminoácidos, isso pode justificar o baixo rendimento nessa condição.

A tabela 5 foi organizada para análise da média e desvio padrão do peso úmido, bem como espessura da NCB utilizando como resíduo o soro de leite, descrevendo o peso em miligramas e espessura das membranas em milímetros, todas cultivadas em placas de 24 poços por 7 dias.

Na análise da caracterização dos resíduos (tabela 4), nota-se o soro de leite apresenta mais C e N que a água de filagem. Na condição A realizada com o SL houve desenvolvimento

de biofilme, porém na mesma condição com a AF não houve formação de membrana, o fato da *K. xylinus* ser uma bactéria ácido acética é um ponto importante pois a água de filagem tem muitas gorduras (FACCIA *et al.*, 2022) o que pode ter interferido no ciclo metabólico bacteriano (REVIN *et al.*, 2018) dificultando o seu desenvolvimento.

Tabela 6 – Média e desvio padrão do peso úmido e espessura das membranas em meio modificado com AF

Condições	Média do peso em mg e desvio padrão	Espessura em mm
GC	4,77±0,10	3,3
A	NF	NF
B	3,50±0,01	2,0
C	2,81±0,10	1,5
D	4,03±0,04	3,0
E	3,61±0,72	2,5
F	2,20±0,18	1,3

Fonte: Autoria própria (2023)

Legenda: NF (Não houve formação de membrana), GC (grupo controle), A (resíduo puro + inóculo), B (HS + 20% de resíduo + inóculo), C (HS + 50% de resíduo + inóculo), D (HS modificado, substituindo a peptona pelo resíduo + inóculo), E (HS modificado, substituindo o extrato de levedura pelo resíduo + inóculo), F (HS modificado, substituindo a peptona e extrato de levedura pelo resíduo + inóculo).

Ao tabelar os resultados obtidos com a AF, nota-se que em relação na média e desvio padrão do peso úmido e espessura, existem diferenças que devem ser analisadas. Na condição B (20%) tem-se um resultado que se aproxima ao grupo controle com o experimento feito com os dois resíduos.

Na condição C (50%) apresentou menos peso úmido e menor espessura, isso pode acontecer pelo fato de que o soro de leite e água de filagem apresentam uma composição rica em lactose, que é um dissacarídeo, conforme observado por Jozala *et al.* (2015) as bactérias do ácido acético metabolizam preferencialmente alimentos ricos em glucose e frutose, que são monossacarídeos, no caso da lactose que é um dissacarídeo é preciso que aconteça a liberação da glucose após a hidrólise das moléculas (CARREIRA *et al.*, 2011).

Na condição D, as amostras com a substituição da peptona apresentaram um rendimento muito próximo ao rendimento do grupo controle, comprovando que a *K. xylinus* é capaz de produzir nanocelulose bacteriana em meio modificado. Porém, se a peptona e extrato de levedura são fontes de N, a condição E faz refletir sobre o porquê o biofilme, embora tenha se desenvolvido nessa condição, produziu membranas menos pesadas e espessas, Revin *et al.* (2018) aponta que o extrato de levedura além de N, também é considerado uma fonte de aminoácidos e sais minerais, podendo interferir diretamente no ciclo metabólico bacteriano, consequentemente produção do biofilme e propriedades físicas, o que pôde ser observado nas análises de MEV.

Na condição F, onde são retirados a peptona e extrato de levedura simultaneamente, a diminuição na produção é nítida, contudo, ainda assim o biofilme se desenvolve e acontece a formação das microfibrilas (Figuras 10 e 11).

A atividade relativamente fraca de protease (BOSSI *et al.* 2006) pode não ser suficiente para permitir que o BAA obtenha todas as substâncias de crescimento necessárias no soro de leite. Essa questão ainda não foi estudada em sua maior parte.

Com base no presente estudo, a forma com que a condição D possibilitou o desenvolvimento da NCB, restou comprovado que em entre as seis condições trabalhadas, a substituição da peptona é a que apresentou melhor custo/benefício tanto para o soro de leite quanto para a água de filagem.

É importante enaltecer a reutilização da AF nas modificações, pois conforme citado na literatura e descrito no decorrer da presente dissertação esse efluente apresenta baixa concentração de compostos (GERNIGON; SCHUCK; JEANTET, 2010; GONÇALVES; CARDARELLI, 2021) por isso não é usado em praticamente nada após filar a coalhada, porém devido ao alto teor de matéria orgânica (FACCIA *et al.*, 2022) não pode ser descartado sem tratamento. Quanto mais rica em gordura, maior será o gasto com tratamento desse efluente, gerando custo elevado aos laticínios e risco biológico.

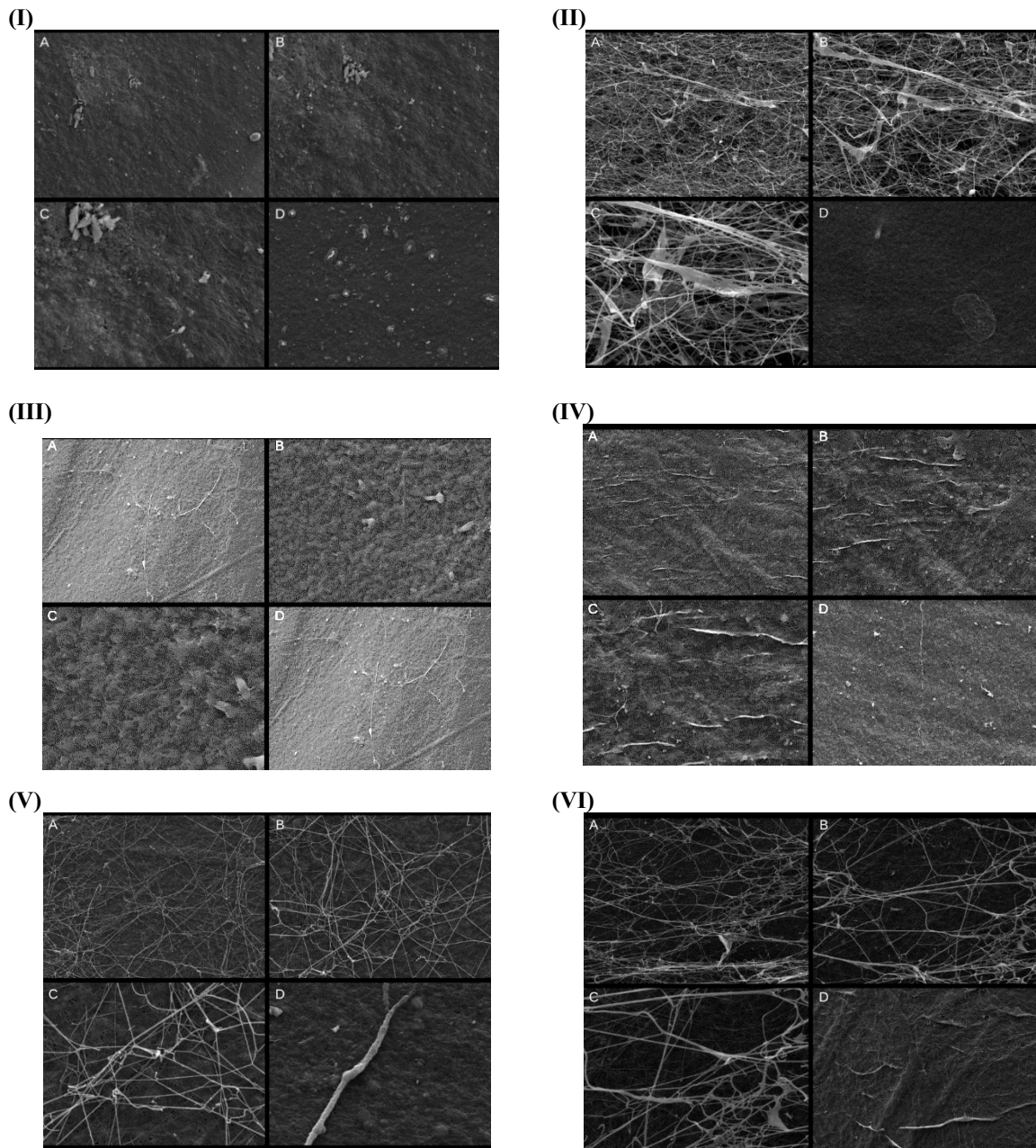
Aliando a AF a *K. xylinus* é evidente a possibilidade de baratear a produção de nanocelulose bacteriana, modificando o meio de cultura reutilizando resíduos altamente poluentes, oriundos da indústria leiteira.

5.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os biofilmes de NCB desenvolvidos com meio HS e NCB desenvolvidas com os meios de cultura modificados foram submetidos a Microscopia Eletrônica de Varredura para análise morfológica das estruturas. Biofilmes de NCB são produzidos no meio de cultura na interface ar/líquido, assim uma das superfícies fica em contato com ar (face superior, ou seja menos porosa), enquanto o outro lado fica em contato com o meio líquido (face inferior, ou seja mais porosa) (BERTI *et al.*, 2013). Foram montadas lado a lado as imagens correspondentes as micrografias com ampliação de 2.500x, (B) 5.000x e (C) 10.000x A imagem D representa o lado mais denso no aumento de 2.500x.

Na figura 10 tem-se a microscopia dos biofilmes desenvolvidos com a água de filagem.

Figura 10. Micrografia da superfície de NCB, (I) Controle, (II) AF-B, (III) AF-C, (IV) AF-D, (V) AF-E (VI) AF-F, as Imagens (A) representam o lado menos poroso da membrana de cada condição no aumento de 2.500x, (B) 5.000x e (C) 10.000x, A imagem D representa o lado mais denso no aumento de 2.500x.



Fonte: Autoria própria (2023)

Legenda: AF-I (grupo controle), AF-II (HS + 20% de resíduo + inóculo), AF-III (HS + 50% de resíduo + inóculo), AF-IV (HS modificado, substituindo a peptona pelo resíduo + inóculo), AF-V (HS modificado, substituindo o extrato de levedura pelo resíduo + inóculo), AF-VI (HS modificado, substituindo a peptona e extrato de levedura pelo resíduo + inóculo). As imagens (A) representam o lado menos poroso da membrana de cada condição no aumento de 2.500x, (B) 5.000x e (C) 10.000x, A imagem D representa o lado mais denso no aumento de 2.500x.

Nas imagens referentes a condição AF-I nota-se que tanto do lado A quanto do lado B há pouca porosidade, apresentado densidade e compactação. Na imagem AF-II, resta evidente a porosidade e arranjo das microfibrilas, sendo possível comparar o lado mais e menos poroso.

As imagens AF-III e AF-IV trazem imagens interessantes e semelhantes a microscopia registrada no grupo controle. Nessa condição há pouca porosidade tanto pela membrana registrada pelo lado A quanto lado B, evidenciando uma boa interação entre as bactérias que formaram o biofilme e o resíduo de água de filagem, gerando aparentemente uma forte adesão microfibrilar.

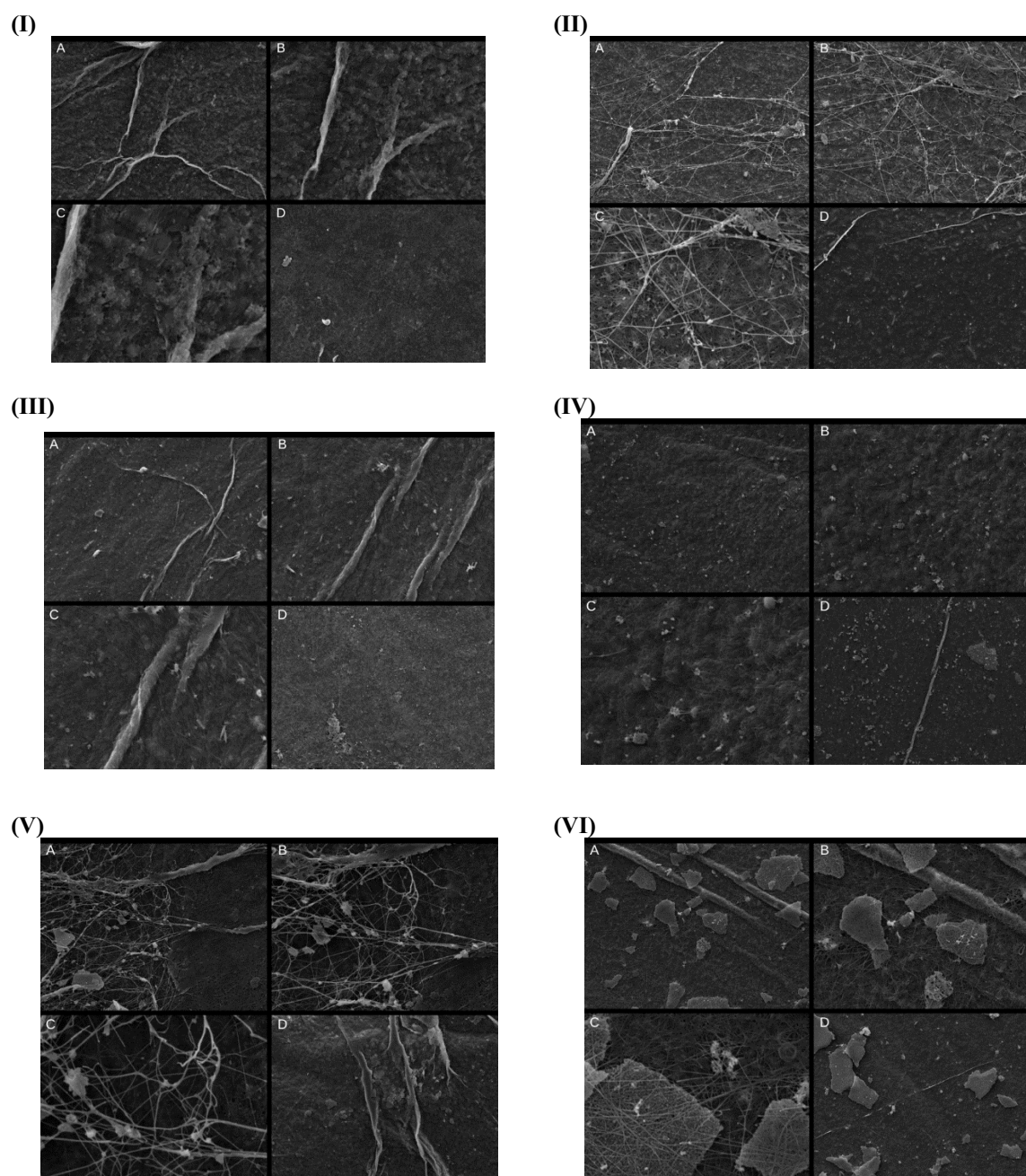
Em AF-V fica explícito a diferença entre o lado menos poroso e mais poroso. As imagens A, B e C que representam o lado menos poroso, mostraram que a NCB foi capaz de se desenvolver em meio modificado, comprovando que pode produzir o biofilme em diferentes substratos.

Tanto na figura AF-IV quanto AF-V resta comprovado o desenvolvimento de um novo meio de cultura eficiente, barato e sustentável para produção de NCB, eis que em ambas condições foram utilizadas água de filagem como substituinte de peptona e extrato de levedura respectivamente.

Na micrografia referente a figura AF-VI possível observar o arranjo das microfibrilas no lado menos poroso, contendo bastante espaço para passagem de água e oxigênio. Em D temos o lado mais poroso, onde é possível observar que as microfibrilas estão muito próximas apresentando a densidade esperada para essa condição. Relembrando que para a produção desse biofilme não foram utilizados peptona nem extrato de levedura, tornando a produção de NCB integralmente acessível. Nessa condição devido a alta porosidade poderiam haver diferentes aplicações de NCB.

A figura 11 segue os mesmos padrões de montagem da micrografia e tamanhos iguais as descritas anteriormente, porém o resíduo utilizado para produção dos meios de cultura modificados e desenvolvimento foi o soro de leite.

Figura 11. Micrografia da superfície de NCB, (I) SL-A, (II) SL-B, (III) SL-C, (IV) SL-D, (V) SL-E (VI) SL-F, as Imagens (A) representam o lado menos poroso da membrana de cada condição no aumento de 2.500x, (B) 5.000x e (C) 10.000x, A imagem D representa o lado mais denso no aumento de 2.500x.



Fonte: Autoria própria (2023)

Legenda: SL-I (soro de leite puro), SL-II (HS + 20% de resíduo + inóculo), SL-III (HS + 50% de resíduo + inóculo), SL-IV (HS modificado, substituindo a peptona pelo resíduo + inóculo), SL-V (HS modificado, substituindo o extrato de levedura pelo resíduo + inóculo), SL-VI (HS modificado, substituindo a peptona e extrato de levedura pelo resíduo + inóculo). As imagens (A) representam o lado menos poroso da membrana de cada condição no aumento de 2.500x, (B) 5.000x e (C) 10.000x, A imagem D representa o lado mais denso no aumento de 2.500x.

A condição que originou a imagem SL-I, utilizou apenas o soro de leite e o inóculo da bactéria, ao observar as imagens nota-se que está semelhante ao grupo controle, há pouca porosidade, apresenta densidade e compactação. Nas imagens A, B e C (SL-I) é evidente uma estrutura semelhante a uma nervura isso pode estar relacionado ao processo de liofilização (OLIVEIRA *et al.*, 2013; RAGHAVENDRAN *et al.* 2020). Nas micrografias apresentadas nas figuras SL-III e SL-VI, também apresenta tais estruturas semelhantes a nervuras, Oliveira *et al.* (2013) e Raghavendran *et al.* (2020) justificam que esse fato pode estar relacionado com o processo de liofilização, durante a secagem o contato com o frasco favorece a formação de estruturas tubulares de NCB, estima-se que o contato direto com tubo de faz como que as microfibrilas fiquem mais adensadas.

Nas micrografias representadas em SL-II as imagens A, B e C apresentam o arranjo das microfibrilas com muito espaço entre elas, o que era esperado para essa condição, já em D fica nítido que há maior densidade e baixa porosidade.

Na figura SL-IV, tanto no lado menos poroso (A, B, C) quanto no lado mais poroso (D) nota-se que as microfibrilas estão fortemente entrelaçadas apresentando alta densidade, semelhante as micrografias do grupo controle (fig. 10, AF-I), comprovando que a substituição da peptona em meio modificado é eficaz e possibilita o desenvolvimento do biofilme.

Na micrografia representada em SL-V, é evidente a diferença entre o lado mais poroso (A, B, C) e o lados menos poroso (D). É possível verificar que há muito espaço entre as microfibrilas, possibilitando a passagem de ar e água, em D observa-se as mesmas características obtidas na imagem SL-III.

Na fig. 11, SL-VI tem-se uma micrografia que apresenta densidade, microfibrilas muito próximas, o que era esperado para essa condição, para produção do meio de cultura na condição F não foram utilizados peptona e extrato de levedura, esses reagentes foram substituídos em mesma quantidade por soro de leite.

Aqui nota-se um aspecto interessante, algumas partes da amostra observada estão craqueladas, isso não foi obtido nas demais micrografias e pode ter ocorrido pelo fato de o SL ser rico em gorduras e no processo de liofilização essa gordura ter tomado essa forma.

Dentre todas as micrografias obtidas, algumas ficaram muito semelhantes à do grupo controle. Nas condições realizadas com a água de filagem as figuras 12 e 13 são que apresentam as características mais parecidas com as do grupo controle e dentre essas a figura 13 merece destaque, pois foi realizada em uma condição que substituiu a peptona pela água de filagem.

Em relação ao soro de leite, as imagens que mais chegaram próximo ao resultado esperado foram as elencadas nas figuras 10 e 11 foram AF-III, AF-IV, SL-III e SL-IV. Da mesma forma que a água de filagem, o soro de leite conseguiu substituir a peptona de forma satisfatória.

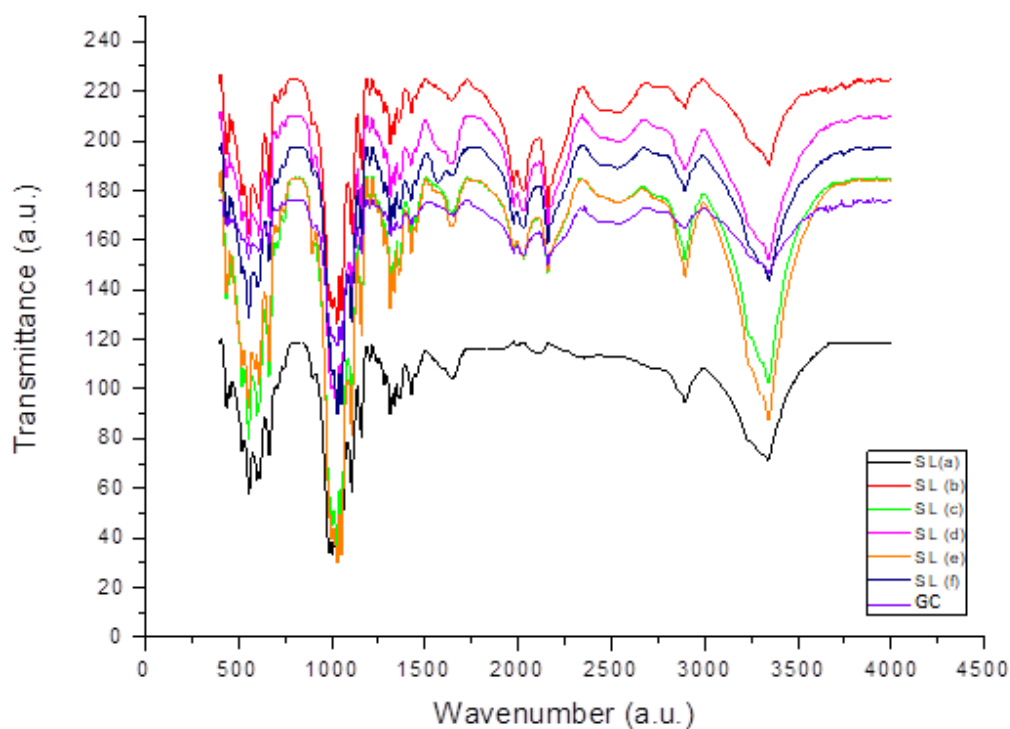
Através desses resultados, restou comprovado que os resíduos podem ser utilizados no desenvolvimento de biofilme, barateando o custo de produção. Conforme já descrito nessa pesquisa o SL apresenta diversas aplicabilidades, diferente da água de filagem que de acordo com a literatura quase não é reaplicada (GONÇALVES; CARDARELLI, 2021).

Pode-se dizer que o desenvolvimento do meio modificado é uma nova aplicabilidade para o SL, e é uma novidade para reutilização da água de filagem. A seguir temos os resultados obtidos através da espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier que vem fortalecer os resultados obtidos até o momento.

5.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os biofilmes de NCB desenvolvidos com o meio de cultura modificado com soro de leite e água de filagem em diferentes condições, foram analisados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), com o objetivo de identificar grupos funcionais característicos da NCB e verificar a existência de novos picos provenientes de alguma interação entre a matriz e os resíduos lácticos utilizados. A região estudada para análise abrangeu uma janela espectral entre 4.000 e 400 cm^{-1} . Conforme observado nas figuras 12 e 13.

Figura 12 - Espectros de Infravermelho das membranas de NCB produzidas em meio de cultura modificado com soro de leite



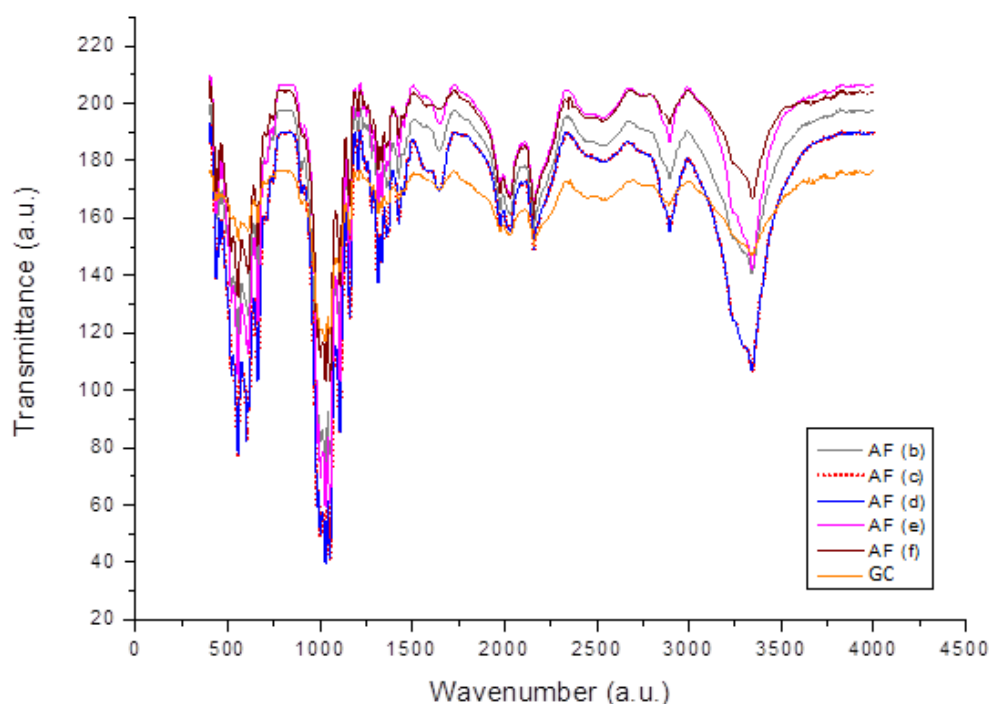
Fonte: Autoria própria (2023)

Legenda: SL (a) – Resíduo puro, SL (b) - HS + 20% de resíduo + inóculo, SL (c) - HS + 50% de resíduo + inóculo, SL (d) - HS modificado, substituindo a peptona pelo resíduo + inóculo, SL (e) - HS modificado, substituindo o extrato de levedura pelo resíduo + inóculo, SL (f) - HS modificado, substituindo a peptona e extrato de levedura pelo resíduo + inóculo, GC - grupo controle.

Na figura 12, o gráfico gerado confirma que há interação entre a NCB e o SL. Seguindo como parâmetro GC, nota-se que é feita por conjugação de polímeros com ligações de hidrogênio. A banda larga a 3500 cm^{-1} está associada ao estiramento de OH (LU, et. al, 2011; SOEIRO, et. al, 2021). Os picos a $2888\text{-}2895\text{ cm}^{-1}$ se referem a vibrações de estiramento C-H (MARECHA, 2012; SOEIRO, et. al, 2021) presentes em todas as condições propostas com o SL.

No pico 1028 a 1030 tem-se o estiramento do anel aromático COC e COH (SILVA, et. al, 2021).

Figura 13 - Espectros de Infravermelho das membranas de NCB produzidas em meio de cultura modificado com água de filagem



Fonte: Autoria própria (2023)

Legenda: AF (b) - HS + 20% de resíduo + inóculo, AF (c) - HS + 50% de resíduo + inóculo, AF (d) - HS modificado, substituindo a peptona pelo resíduo + inóculo, AF (e) - HS modificado, substituindo o extrato de levedura pelo resíduo + inóculo, AF (f) - HS modificado, substituindo a peptona e extrato de levedura pelo resíduo + inóculo, GC - grupo controle.

Tanto na figura 12 quanto na figura 13 nota-se que a banda 996 está em evidência, sinalizando vibração de COH (MAHECHA, 2012) e o pico 1077 está relacionado com alongamento da ligação C-OH (MAHECHA, 2012).

Na espectrometria exibida na imagem 24 nota-se que duas amostras se comportaram exatamente da mesma forma, o que não era esperado, pois em AF – C é uma condição que apresenta peptona e AF – D é uma condição em que a peptona foi substituída pelo resíduo. Nesse caso, conclui-se que a AF pode substituir a peptona, fornecendo condições para o desenvolvimento do biofilme.

5.5 Análise geral de viabilidade econômica

Para realizar a análise de viabilidade econômica foram tabelados os custos médios dos reagentes utilizados para produção do meio HS e do meio modificado, conforme descrito nas tabelas 7, 8, 9 e 10.

Tabela 7 - Custo médio de produção do meio de cultura HS (Hestrin e Schramm 1954)

Meio HS	g/L	Custo por kilo (R\$)	Nº do produto	Fornecedor	Custo para 1L de meio
Glicose	20	284,00	G8270	Sigma Aldrich	5,68
Fosfato dissódico	2.7	78,68	106585	Anydrous Emprove	0,21
Extrato de levedura	5.0	994,00	Y1625	Sigma Aldrich	4,97
Peptona	5.0	696,00	91249	Milipore	3,48
Ácido cítrico	1.5	617,00	C1909	Sigma Aldrich	0,93

Fonte: Aatoria própria (2022)

Conforme observado na tabela 7, para fazer um litro de meio HS gera em média um custo de R\$ 15,27 (quinze reais e vinte e sete centavos). Na tabela 8 foi proposto a modificação do meio, substituindo a peptona pelos resíduos lácticos, para um litro de meio gera um custo de R\$ 11.79 (onze reais e setenta e nove centavos).

Na tabela 9, o extrato de levedura foi substituído pelo RL, gerando em média um montante de R\$ 10,30 (dez reais e trinta centavos o litro do meio. Na tabela 9, foram substituídos: o extrato de levedura e a peptona gerando um custo médio de R\$ 6,82 (seis reais e oitenta e dois centavos).

Tabela 8 - Custo médio de produção do meio de cultura utilizando a modificação D

Meio HS	g/L	Custo por kilo (R\$)	Nº do produto	Fornecedor	Custo para 1L de meio
Glicose	20	284,00	G8270	Sigma Aldrich	5,68
Fosfato dissódico	2.7	78,68	106585	Anydrous Emprove	0,21
Extrato de levedura	5.0	994,00	Y1625	Sigma Aldrich	4,97
Resíduo láctico	5.0	00,00	-	-	00,00
Ácido cítrico	1.5	617,00	C1909	Sigma Aldrich	0,93

Fonte: Aatoria própria (2023)

Tabela 9 - Custo médio de produção do meio de cultura com a modificação E

Meio HS	g/L	Custo por kilo (R\$)	Nº do produto	Fornecedor	Custo para 1l de meio
Glicose	20	284,00	G8270	Sigma Aldrich	5,68
Fosfato dissódico	2.7	78,68	106585	Anydrous Emprove	0,21
Extrato de levedura	5.0	00,00	-	-	00,00
Peptona	5.0	696,00	91249	Milipore	3,48
Ácido cítrico	1.5	617,00	C1909	Sigma Aldrich	0,93

Fonte: Aatoria própria (2023)

Tabela 10 - Custo médio de produção do meio de cultura com a modificação F

Meio HS	g/L	Custo por kilo (R\$)	Nº do produto	Fornecedor	Custo para 1Lde meio
Glicose	20	284,00	G8270	Sigma Aldrich	5,68
Fosfato dissódico	2.7	78,68	106585	Anydrous Emprove	0,21

Extrato de levedura	5.0	00,00	-	-	00,00
Peptona	5.0	00,00	-	-	00,00
Ácido cítrico	1.5	617,00	C1909	Sigma Aldrich	0,93

Fonte: Autoria própria (2023)

Conforme observado nas tabelas 7, 8, 9 e 10 a substituição da peptona e extrato de levedura são vantajosas financeiramente, ainda mais se for realizada uma análise financeira em larga escala. A modificação dos meios visa o aumento no rendimento industrial (SPEROTTO *et al.*, 2021).

Durante a análise de viabilidade econômica, comprova-se que financeiramente a reutilização dos RL é impactante. Por exemplo, se a empresa fizer uma produção mensal de 100 litros de meio HS, ao final do mês terá em média um ônus de R\$ 1.527,00 (um mil quinhentos e vinte e sete reais).

Por outro lado, se a empresa produzir o meio modificado sem peptona terá um gasto médio de R\$ 1.119,00 (um mil cento de dezenove reais). Se modificar o meio retirando o extrato de levedura terá um gasto médio de R\$ 1.030,00 (um mil e trinta reais). Porém se forem retirados do meio o extrato de levedura e a peptona, substituindo-os pelos RL, tem-se um gasto médio para a produção de 100L de meio o valor de R\$ 682,00 (seiscentos e oitenta e dois reais), ou seja, na tabela 10 podemos observar que o custo de produção cai pela metade.

É válido ressaltar que além do rendimento satisfatório e a grande diminuição do custo de produção das grandes empresas de NCB, tem-se a questão ambiental que permeia o ambiente científico e se dá pela reutilização dos resíduos gerados pela indústria leiteira. Esses subprodutos são altamente poluentes e tóxicos como já descritos no decorrer dessa pesquisa.

A análise de viabilidade econômica comprovou que a utilização dos resíduos lácticos no desenvolvimento da nanocelulose bacteriana criando meios de cultivo em diferentes condições é viável economicamente e sustentável para o meio ambiente.

6 CONCLUSÃO

No decorrer dessa pesquisa foram feitas diversas análises preliminares, utilizando os resíduos soro de leite e água de filagem em condições diferentes. Com as experimentações comprovou-se que o pH ideal para que a *K. xylinus* produza a NCB tanto no soro quanto na água de filagem é de 4,5. Com as análises obtidas através da microscopia eletrônica de varredura constatou-se que os experimentos realizados com condição D, tanto com água de filagem quanto com soro de leite foram os que mais se aproximaram do grupo controle, é possível observar que as microfibrilas ficaram muito próximas, deixando a membrana com a densidade adequada para posteriores aplicações e desenvolvimento de biomateriais, comprovando que a peptona pode ser substituída em igual quantidade por qualquer um dos dois resíduos. As outras condições também apresentaram características importantes e abrem espaço para futuras aplicações

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier fortaleceu o que já estava comprovado nas micrografias. O meio de cultura modificado fez com que as membranas de NCB apresentassem os picos de acordo com o esperado, na fig. 23 observa-se que as condições C e D da água de filagem apresentam um estiramento maior que o grupo controle na região da banda de $2888-2895\text{ cm}^{-1}$ se referindo a vibrações de estiramento C-H.

As tabelas de viabilidade econômica construídas e descritas na construção deste trabalho comprovaram a possibilidade da econômica para indústria e diminuição do impacto ambiental causado pelo soro de leite e água de filagem.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L. H. **Tratamento de efluentes de laticínios por duas configurações de biorreator com membranas e nanofiltração visando o reuso**. 214 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, UFU, Belo Horizonte, 2011.
- ANDRADE, M. A. *et al.* Evaluation of the oxidative status of salami packaged with an active whey protein film. **Foods**, v. 8, n. 9, 2019.
- ANDRADE, M. A. *et al.* Characterization of rosemary and thyme extracts for incorporation into a whey protein based film. **LWT**, v. 92, n. February, p. 497–508, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.041>>.
- ARDISSON-KORAT A.V., RIZVI S.S.H., Vatless manufacturing of low-moisture part-skim mozzarella cheese from highly concentrated skim milk microfiltration retentate, **J. Dairy Sci.** 87, 3601–3613, 2004.
- ARIADNE, Y. *et al.* Filmes comestíveis de soro de leite e amido de mandioca: caracterização física, térmica e microestrutural. **FOODS**, 2020.
- AZEREDO, H. M. C. *et al.* Bacterial cellulose as a raw material for food and food packaging applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 3, n. February, 2019.
- BATISTA, R. A. B. *et al.* Lactose in processed foods: Evaluating the availability of information regarding its amount. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 23, n. 12, p. 4119–4128, 2018.
- BERTI, F. V. *et al.* Nanofiber density determines endothelial cell behavior on hydrogel matrix. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 8, p. 4684–4691, 2013.
- BIDEAU, B.; LORANGER, E.; DANEALU, C. Nanocellulose-polypyrrole-coated paperboard for food packaging application. **Progress in Organic Coatings**, v. 123, n. July, p. 128–133, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2018.07.003>>. Acesso em 20 out. 2022
- BRASÃO, S. C. **Biofilmes de *Salmonella Minnesota*: Formação, influência da superfície, inibição por agentes químicos e importância do período entre tratamentos**. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo, 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 set. 2002a.
- BROWN, A. J. The chemical action of pure cdtirations of bactekm aceti. **Journal of the Chemical Society**, Transactions, n. 172, p. 172–187, 1886. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/1886/ct/ct8864900172>>. Acesso em 20 abr. 2022.

BOSI, M. G. *et al.* Bebida com adição de soro de leite e fibra alimentar prebiótica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 3, p. 339–341, 2013.

BOSSI, A.; BONIZZATO, L.; ZAPPAROLI, G. Acidic extracellular proteases from microorganisms of fairly acidic niche. **Protein & Peptide Letters**, v. 13, n. 7, p. 737–741, 2006.

BOZA, Y.; GOMES, R. A. R.; BLUMER, P. Lactose: Alternativa para uso do soro e para diversificação do setor de lácteos. **Revista Laticínios**, p.62-66, 2011. Disponível em: <http://revistalaticinios.com.br/wp-content/uploads/2011/09/10-Fazer-Melhor-104.pdf> . Acesso em: 26 mar. 2022.

CAPELLETTI, R. V. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais**. 81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

CARREIRA, P.; MENDES, J. A. S.; TROVATTI, E.; *et al.* Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 15, p. 7354–7360, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.081>. Acesso em 18 jul. 2022

CHEN, W.; YU, H.; LIU, Y.; CHEN, P.; ZHANG, M.; HAI, Y. Individualization of cellulose nanofibers from wood using high-intensity ultrasonication combined with chemical pretreatments. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1804-1811, 2011.

CHOLLAKUP, R. *et al.* Antioxidant and antibacterial activities of cassava starch and whey protein blend films containing rambutan peel extract and cinnamon oil for active packaging. **LWT**, v. 130, 2020.

CHU, M. *et al.* Functionalization of composite bacterial cellulose with C60 nanoparticles for wound dressing and cancer therapy. **RSC Advances**, v. 8, n. 33, p. 18197–18203, 2018.

COSTA, M. A.; KUHN, D.; RAMA, G. R.; LEHN, D. N.; SOUZA, C. F. V. DE. Whey butter: a promising perspective for the dairy industry. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 25, p. 1–9, 2022.

DA SILVA, T. G. F. *et al.* Climate change scenarios and their impacts on milk production in northeastern states of Brazil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 8, p. 863–870, 2010.

DE AMORIM, J. D. P. *et al.* Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 3, p. 851–869, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10311-020-00989-9>>. Acesso em 09 nov. 2022.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. **Portaria Nº 537, de 24 de fevereiro de 2022**. Disponível em: <https://in.gov.br/web/dou/-/portaria-sda-n-537-de-24-de-fevereiro-de-2022-383074050>. Acesso em 11 out. 2022.

DÍAZ-MONTES, E.; CASTRO-MUÑOZ, R. Trends in chitosan as a primary biopolymer for functional films and coatings manufacture for food and natural products. **Polymers**, v. 13, n. 5, p. 1–28, 2021.

DINIKA, I. *et al.* Potential of cheese whey bioactive proteins and peptides in the development of antimicrobial edible film composite: A review of recent trends. **Trends In Food Science & Technology**, v. 103, p. 57–67, 2020.

DINIKA, I.; UTAMA, G. L. Cheese whey as potential resource for antimicrobial edible film and active packaging production. **Foods and Raw Materials**, v. 7, n. 2, p. 229–239, 2019.

EMBRAPA GADO DE LEITE. (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Anuário do Leite 2019: novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais**. Anuario Leite, n. 35 art, p. 104, 2019.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Anuário do leite 2022: Pecuária leiteira de precisão**. Anuário 2022, p. 59, 2022.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Anuário leite 2023: Leite baixo carbono**. Anuário 2023, p. 61, 2023.

FACCIA, M. *et al.* Características de qualidade do queijo mussarela fabricado com estiramento reciclado. **Science direct**, v. 147, 2022.

FERNANDES, A. P. S. *et al.* Aplicação de filmes biodegradáveis produzidos a partir de concentrado proteico de soro de leite irradiado. **Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 2, p. 192–199, 2015.

FREIRE, P. **Pedagogia da autonomia**. 1996.

GERNIGON, G.; SCHUCK, P.; JEANTET, R. Processing of Mozzarella cheese wheys and stretchwaters: A preliminary review. **Dairy Science and Technology**, v. 90, n. 1, p. 27–46, 2010.

GOFMAN, I. V *et al.* Biocomposites and their cytocompatibility. **Materials**, v. 13, p. 4558, 2020.

GOMES, F. P. *et al.* Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using mill residue. **Biomass and Bioenergy**, v. 55, p. 205–211, 2013.

GONÇALVES, M. C.; CARDARELLI, H. R. Mozzarella cheese stretching: A minireview. **Food Technology and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 82–91, 2021.

GOPU, G.; GOVINDAN, S. Production of bacterial cellulose from *Komagataeibacter saccharivorans* strain BC1 isolated from rotten green grapes. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 9, p. 842–852, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1513032>>. Acesso em 02 jun. 2022.

GORGIEVA, S.; TRČEK, J. Bacterial cellulose: Production, modification and perspectives in biomedical applications. **Nanomaterials**, v. 9, n. 10, p. 1–20, 2019.

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

GULLO, M. *et al.* Feasible acetic acid fermentations of alcoholic and sugary substrates in combined operation mode. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 9, p. 1129–1139, 2016.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.05.018>>. Acesso em 28 ago. 2022

HUNTRAKUL, K. *et al.* Effects of pea protein on properties of cassava starch edible films produced by blown-film extrusion for oil packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 24, p. 100480, 2020. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214289419305071>>. Acesso em 14 jul 2022.

HUSSAIN, Z. *et al.* Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review. **Cellulose**, v. 26, n. 5, p. 2895–2911, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10570-019-02307-1>>.

IBGE. **Produção leiteira no Brasil**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>. Acesso em 21 dez. 2021.

JAMSHEERA, C. P.; PRADEEP, B. V. Production of bacterial cellulose from acetobacter species and its applications - A review. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 544–555, 2021.

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

JUSTINA, M. D.; KEMPKA, A. P.; SKORONSKI, E. Tecnologias empregadas no tratamento de efluentes de laticínios do vale do Rio Braço do Norte-SC. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 10, p. 809-824, 2017.

LAPPA, I. K. *et al.* Processamento de soro de queijo: conceitos integrados de biorrefinaria e aplicações de alimentos emergentes. p. 8–15, 2019.

LEITE, M.T.; BARROZO, M.A.D.S.; RIBEIRO, E.J. **Canonical analysis technique as an approach to determine optimal conditions for lactic acid production by lactobacillus helveticus ATCC 15009**. International Journal of Chemical Engineering, v. 2012, p. 1-9.
Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ijce/2012/303874/>>. Acesso em: 02 jun. 2023.

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

LIU, F. *et al.* Design and characterization of controlled-release edible packaging films prepared with synergistic whey-protein polysaccharide complexes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 24, p. 5824–5833, 2013.

LU, Q., WANG, X., LU, S., *et al.* Nanofibrous architecture of silk fibroin scaffolds prepared with a mild self-assembly process. **Biomaterials**, v. 32, n. 4, pp. 1059-1067, 2011.

MAHECHA, M.M.A. **Microcompósitos, nanocompósitos e coberturas a base de materiais biodegradáveis obtidos a partir do biri** (*Canna indica* L.) Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 2012.

MENDES, B. G. *et al.* Qualidade e rendimento da mussarela em tempos de armazenamento sob refrigeração da massa acidificada. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 9, n. 1, p. 1744–1756, 2015.

METZGER L.E., BARBANO D.M., RUDAN M.A., KINDSTEDT P.S., Effect of milk preacidification on low fat Mozzarella cheese. I. Composition and yield, **J. Dairy Sci.** 83, 648–658, 2000.

MOHAMMADKAZEMI, F.; AZIN, M.; ASHORI, A. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 518–523, 2015.

MOHAMMEDI, Z. Structure, Properties and Medical Advances for Biocellulose Applications : A Review. **American Journal of Polymer Science and Technology**, v. 3, n. 5, p. 89–96, 2017.

MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **Plos Biology**, v. 5, n. 11, p. 2458–2461, 2007.

ODEYEMI, O. A. *et al.* Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 2, p. 311–331, 2020.

OLIVEIRA, V. A.; RAMBO, C. R.; PORTO, L. M.. Produção e degradação in vitro de estruturas tubulares de celulose bacteriana. **Polímeros**, v. 23, n. 4, p. 559–564, 2013.

PICOLI, T. *et al.* Características da produção de leite no Sul do Brasil. **Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3Sup11, p. 1991–1998, 2015.

POPPI, F. A. *et al.* Soro de leite e suas proteínas: Composição e Atividade Funcional. **Journal of Health Sciences**, v. 12, n. 2, p. 31–38, 2010.

POSTIGO, E. *et al.* Otimização da Produção de Biocelulose Utilizando Resíduos Agroindustriais. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2020.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48–68, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>>. Acesso em 15 jan. 2022.

RAISZADEH-JAHROMI, Y. *et al.* Optimization of bacterial cellulose production by *Komagataeibacter xylinus* PTCC 1734 in a low-cost medium using optimal combined design. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 7, p. 2524–2533, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13197-020-04289-6>>. Acesso em 17 fev. 2022.

RAGHAVENDRAN, V.; ASARE, E.; ROY, I. Bacterial cellulose: Biosynthesis, production, and applications. **Advances in Microbial Physiology**, v. 77, p. 89–138, 2020.

RIBEIRO-SANTOS, R. *et al.* Combined use of essential oils applied to protein base active food packaging: Study in vitro and in a food simulant. **European Polymer Journal**, v. 93, p. 75–86, 2017.

ROCHA, G. O. *et al.* Filmes compostos biodegradáveis a base de amido de mandioca e proteína de soja. **Polímeros**, v. 24, n. 5, p. 587–595, 2014.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, A. N. D. M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria positive control. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 35–58, 1991.

RUDAN M.A., BARBANO D.M., YUN J.J., KINDSTEDT P.S., Effect of fat reduction on chemical composition, proteolysis, functionality, and yield of Mozzarella cheese, **J. Dairy Sci**, 1999.

REGHELIM, M. Reaproveitamento de Resíduo: Alternativas para o Soro do Queijo Residue Reuse: Alternatives to Cheese Serum. **In: Congresso Internacional de Tecnologias Para o Meio Ambiente**, p. 1–8, 2018.

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

RODRIGUES, J. B. Níveis de Tratamento: Preliminar e Primário. Medianeira, Paraná. **Apostila Teórica de Tratamento de Águas Residuárias**, v. 01, 2004.

ROHFLES, A. L. B. *et al.* Aproveitamento de agroindústrias do setor queijeiro para desenvolvimento de produtos alimentícios e redução de impacto ambiental. **Tecnológica**, Santa Cruz do Sul, v.18, n.1, p. 13-18, jan./jun. 2014.

ROL, F. *et al.* Recent advances in surface-modified cellulose nanofibrils. **Progress in Polymer Science**, v. 88, p. 241–264, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.09.002>>. Acesso em 20 mar. 2022.

SABIONI, R. C. **Otimização de um processo industrial de filagem: uma comparação entre métodos multiobjetivo**. Dissertação (mestrado em Engenharia de Produção) Universidade Federal de Itajuba, 2018.

SALDANHA, J.T.; Emprego de nanopartículas em estratégias de prevenção e tratamento de infecções relacionadas à formação de biofilmes bacterianos. **Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, Set. 2013.

SANTOS, V. S. *et al.* Avaliação e caracterização de biofilme comestível de carboximetilcelulose contendo nanopartículas de quitosana e Cúrcuma longa. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 26, n. 1, 2021.

SCHAFFER H.W., OLSON N.F., Characteristics of Mozzarella cheese made by direct acidification from ultra-high-temperature processed milk, **J. Dairy Sci**. 58, 1974.

SCHRAMM, M.; HESTRIN, S. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. **Journal of general microbiology**, v. 11, n. 1, p. 123–129, 1954.

SEOL, M. L. *et al.* All-printed triboelectric nanogenerator. **Nano Energy**, v. 44, n. November 2017, p. 82–88, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2017.11.067>>. Acesso em 12 mar. 2022.

SERRA, D. O.; RICHTER, A. M.; HENGGE, R. Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 24, 2013.

SILVA, G. S. da *et al.* Evaluation of the influence of incorporation of coconut oil in Bacterial Cellulose Membranes. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e52910112002, jan. 2021. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/12002>>. Acesso em 05 jan. 2023.

SILVA, A. R. B. **Tratamento de Efluentes na Indústria de Laticínios**. Trabalho de Conclusão de Curso (Título de Engenheiro Químico). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia MG, 26p, 2013.

SINGHANIA, R. R. *et al.* Genetic modification for enhancing bacterial cellulose production and its applications. **Bioengineered**, v. 12, n. 1, p. 6793–6807, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1968989>>. Acesso em 08 ago. 2022.

MÜLLER, D. *et al.* Chemical in situ polymerization of polypyrrole on bacterial cellulose nanofibers. **Synthetic Metals**, v. 161, n. 1–2, p. 106–111, 2011.

ŠKRABAN, J. *et al.* Genome sequences and description of novel exopolysaccharides producing species *Komagataeibacter pomaceti* sp. nov. and reclassification of *Komagataeibacter kombuchae*, **Bioresource Technology**. v. 57, p.1-11, 1996.

SPEROTTO, G. *et al.* Uma revisão dos meios de cultura para a produção de celulose bacteriana: modulações de mídia complexas, quimicamente definidas e mínimas. **Springer Nature**. v. 5, p. 2649–2673, 2021.

SOEIRO, V. S. *et al.* Bacterial nanocellulose and fibroin: natural products to produce a structure membranes. **Matéria** (Rio de Janeiro), v. 26, n. 4, p. e13086, 2021.

SRIKANDAKUMAR, A.; JOHNSON, E. H. Effect of heat stress on milk production, rectal temperature, respiratory rate and blood chemistry in Holstein, Jersey and Australian milking zebu cows. **Tropical Animal Health and Production**, v.36, p.685-692, 2004.

THOMAZ, M. R. *et al.* Identificação de programas de qualidade aplicados em alguns laticínios do oeste de Santa Catarina. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 74, n. 3, p. 159–170, 2019.

THONGSOMBOON, W. *et al.* **Modified Cellulose**. v. 338, p. 334–338, 2018.

VOURCH M.; BALANNEC, B.; CHAUFER, B.; DORANGE, G. **Treatment of dairy industry wastewater by reverse osmosis for water reuse**. **Desalination**, v. 219, p. 190–202, 2008.

YOSHIDA, C. M. P.; ANTUNES, A. J. Aplicação de filmes proteicos à base de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 420–430, 2009.

WAGNER, E. M. *et al.* Bacteria of eleven different species isolated from biofilms in a meat processing environment have diverse biofilm forming abilities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 349, n. February, p. 109232, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109232>>. Acesso em 12 abr. 2023.

WAGNER, E. M. *et al.* Identification of biofilm hotspots in a meat processing environment: Detection of spoilage bacteria in multi-species biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 328, n. May, 2020.

WISSMANN, M. A. *et al.* Environmental costs: Analysis of its impact and importance in the pursuit of eco-efficiency in an industry of cheese. **Custos e Agronegocio**, v. 8, n. 3, p. 2–23, 2012.

XIE, Y. *et al.* Novel Electronic-Ionic Hybrid Conductive Composites for Multifunctional Flexible Bioelectrode Based on in Situ Synthesis of Poly(dopamine) on Bacterial Cellulose. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 26, p. 22692–22702, 2018.

ZANDONA, E.; BLAŽIĆ, M.; REŽEK JAMBRAK, A. Whey utilisation: Sustainable uses and environmental approach. **Food Technology and Biotechnology**, v. 59, n. 2, p. 147–161, 2021.

ZANELA, J. *et al.* Active Biodegradable Packaging for Foods Containing *Baccharis dracunculifolia* Leaf as Natural Antioxidant. **Food and Bioprocess Technology**, v. 14, n. 7, p. 1301–1310, 2021.

ZHANG, X. *et al.* Influence of glycerol on potato starch-based biodegradable packaging films. **Lecture Notes in Electrical Engineering**, v. 369, p. 837–842, 2016.

ZHANG, H. *et al.* Complete genome sequence of the cellulose-producing strain *Komagataeibacter nataicola* RZS01. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.

ZHONG, C. *et al.* Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 14, p. 6189–6199, 2013.

ZHU, H. *et al.* Transparent paper: Fabrications, properties, and device applications. **Energy and Environmental Science**, v. 7, n. 1, p. 269–287, 2014.

ŻYWICKA, A. *et al.* Bacterial cellulose yield increased over 500% by supplementation of medium with vegetable oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 199, n. March, p. 294–303, 2018.