



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



JÉSSYCA DE ARAÚJO BORRO

**PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA UTILIZANDO
SUBSTRATOS ALTERNATIVOS NO MEIO DE CULTURA**

Botucatu

2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



JÉSSYCA DE ARAÚJO BORRO

**PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA UTILIZANDO
SUBSTRATOS ALTERNATIVOS NO MEIO DE CULTURA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Energia na Agricultura).

Orientadora: Profa. Dra. Ivana Cesarino

Botucatu

2021

B737p	Borro, Jéssyca de Araújo Produção de celulose bacteriana utilizando substratos alternativos no meio de cultura / Jéssyca de Araújo Borro. -- Botucatu, 2022 99 p. : il., tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu Orientadora: Ivana Cesarino 1. Microbiologia. 2. Vinhaça. 3. Aloe vera. 4. Meios de cultura. 5. Celulose bacteriana. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA UTILIZANDO SUBSTRATOS ALTERNATIVOS NO MEIO DE CULTURA

AUTORA: JÉSSYCA DE ARAUJO BORRO

ORIENTADORA: IVANA CESARINO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Agronomia (Energia na Agricultura), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. IVANA CESARINO (Participação Virtual)
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / UNESPCâmpus de Botucatu

A handwritten signature in blue ink, reading "Ivana Cesarino", is placed to the right of the text.

Prof. Dr. MICHEL BRIENZO (Participação Virtual)
Laboratório de Caracterização de Biomassa / Instituto de Pesquisa em Bioenergia- IPBEN/ UNESP-Rio Claro

A handwritten signature in blue ink, reading "Ivana Cesarino", is placed to the right of the text.

Pos-Doutoranda MILENA CHANES DE SOUZA (Participação Virtual)
Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrômicas - UNESP

A handwritten signature in blue ink, reading "Ivana Cesarino", is placed to the right of the text.

Botucatu, 06 de dezembro de 2021

**Á minha amada avó,
Ana Maria Cardoso de Araújo,
dedico**

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos anjos por me protegerem e não me abandonarem em todos os momentos até agora.

A toda minha família por serem minha fortaleza e porto seguro. Por sonharem, acreditarem e apoiarem em todos meus sonhos, pelo amor, carinho e paciência, até mesmo nos períodos de estresse, desespero, choro e medo.

Ao meu companheiro, Vitor Sônego Bortolotti por todo carinho, parceria e apoio nesses anos e a sua família, a qual considero minha segunda família.

A Prof.^a Dr.^a Ivana Cesarino por me acolher, me apoiar e aconselhar nos momentos de dificuldades, diante de todas as adversidades nesse momento atípico que o mundo estava e está passando a orientação e calma da professora fizeram toda diferença nesse processo.

Ao Prof. Dr. Alcides Lopes Leão, por me acolher, pela oportunidade em 2018 de estagiar no laboratório RESIDUALL e prosseguir com o experimento do Mestrado no espaço.

À Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA) por ter sido minha segunda “casa” nesses últimos anos.

Aos docentes das disciplinas que tive a oportunidade de cursar durante esses anos, agradeço a troca de conhecimento.

Aos funcionários do Departamento de Biotecnologia e Bioprocessos pela vivência, convívio e aprendizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Energia na Agricultura pela oportunidade.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa concedida à minha pesquisa.

A Prof.^a Dr.^a Janaína Fracaro de Souza Gonçalves do Laboratório Multiusuário do Campus de Londrina da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), pela atenção e disponibilidade mesmo em pandemia, na realização da análise de DRX e concretização deste trabalho.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), pela atenção desde o processamento das amostras até a coleta dos dados.

Ao Laboratório de Fertilizantes e Corretivos do Departamento de Solos e Recursos Ambientais FCA/Unesp/Botucatu pelos serviços prestados.

Ao Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (Nupam), pelos serviços prestados para a análise no FTIR. A Iara, pela ajuda no processamento das amostras.

A banca de qualificação, Prof.^a Dr.^a Carla dos Santos Riccardi e Dr.^a Milena Chanes de Souza, pelas contribuições para que o trabalho se tornasse ainda melhor.

A banca de defesa Dr.^a Milena Chanes de Souza e Prof. Dr. Michel Brienzo por toda ajuda e contribuição.

Aos meus colegas e membros do Laboratório RESIDUALL: Fernando, Júlio, Guilherme, Mirela pelo convívio durante esse tempo. Em especial à Giovana, Victor, Ivan e Milena por toda ajuda quando precisei.

Aos amigos de Pirassununga – SP: Ana Elisa Millan, Gabriel Sundfeld, Luan Oliveira e Guilherme Barbirato, pela amizade, conversas e apoio.

Aos amigos de Botucatu – SP: Maíra Cuciello e Rafael Soler, sempre prontos a me ouvir, aconselhar e acalmar nos momentos de desespero.

Às meninas Juliana Trindade Caleffi e Ana Clara Denadai que me acompanham desde 2016 nesta jornada de crescimento pessoal e intelectual. Agradeço por estarem presente mesmo de longe, mesmo por infinitos áudios e textos por whatsapp.

Às companheiras de república Caroline Cézar e Amanda Baradel, desde 2013 fazendo parte das minhas conquistas.

Aos companheiros dos jantares de quinta: Bruno, Naira, Helena, Rodolfo e Bruna, tornaram minhas semanas mais animadas.

À minha homemade Patrícia Graosque, meu carinho imenso, juntas dividimos as frustrações, medos, desesperos, conquistas, choros, risadas e méritos de uma vida de pós-graduação abalada por uma pandemia.

“Celebra hoje sua vitória de ontem, para ter mais forças na batalha de amanhã.”

COELHO, P. A importância da alegria. **G1. Globo**, São Paulo, 26 jan. 2009. Mensagem do dia. Disponível em: <http://g1.globo.com/platb/paulocoelho/2009/02/26/a-importancia-da-alegria/>. Acesso em: 15 out. 2021.

RESUMO

A celulose bacteriana (CB) é produzida por meio da biossíntese de microrganismos, como as bactérias *Gluconacetobacter xylinus*. A utilização e aproveitamento de resíduos agroindustriais, alimentícios, cervejeiros, produtos com potenciais propriedades terapêuticas e/ou medicinais inseridos em meios de cultura para a obtenção de CB se fazem crescentes na literatura. A vinhaça, um subproduto da fabricação do etanol, é composta por 93% de água e 7% de sólidos orgânicos e inorgânicos. A *Aloe vera*, conhecida popularmente como babosa, é caracterizada pelo alto teor de água, cerca de 99%, e os outros 1% de 75 compostos ativos diferentes. A vinhaça e a *Aloe vera* apresentam-se como potenciais substratos para a produção de CB reduzindo o custo de produção, minimizando os impactos ambientais e revertendo em benefícios nas necessidades humanas, como aplicações em tratamentos de queimaduras, entre outros. O objetivo do trabalho foi o desenvolvimento de membranas de CB produzidas a partir da bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, em meios de cultura enriquecidos com vinhaça e *Aloe vera*. A análise de Espectroscopia na região do infravermelho (IR) possibilitou concluir que ocorreram alterações químicas nas estruturas da CB incorporadas com *Aloe vera*, presença de banda característica de interação com grupo amino e na incorporação com vinhaça, presença de banda característica de regiões cristalinas. Na análise de Difração de Raio – X (DRX), foi possível identificar incorporações com a presença de celulose I (CBV20, CBV40, CBV60, CBV80 e CBB80) e incorporações com a presença de celulose II (CBB20, CBB40 e CBB60). Mecanicamente, a incorporação CBB80 de *Aloe vera* demonstrou semelhança nos valores de módulo de elasticidade (MPa), tensão máxima (MPa) e alongamento (%), enquanto a incorporação com vinhaça, a CBV40 demonstrou semelhança nos valores de módulo de elasticidade (MPa), tensão máxima (MPa) e alongamento (%) quando comparadas às membranas CB (controle); morfolologicamente, a incorporação CBB80 de *Aloe vera* demonstrou uma rede de microfibrilas com gel de *Aloe vera* e possivelmente aderidas à superfície. Os resultados mostraram o potencial uso de incorporações da vinhaça e *Aloe vera* como substratos alternativos, reduzindo os altos custos envolvidos na produção, a valorização do uso de resíduos agroindustriais e o potencial uso de plantas com compostos bioativos.

Palavras-chave: celulose bacteriana; *Gluconacetobacter xylinus*; substratos alternativos; vinhaça, *Aloe vera*.

ABSTRACT

Bacterial cellulose (BC) is produced through the biosynthesis of microorganisms, such as the bacteria *Gluconacetobacter xylinus*. The use and utilization of agroindustrial, food, and brewery wastes, products with potential therapeutic and/or medicinal properties inserted in culture media to obtain CB are increasing in the literature. Vinasse, a byproduct of ethanol production, is composed of 93% water and 7% organic and inorganic solids, *Aloe vera*, popularly known as babosa, is characterized by high water content, about 99%, and the other 1% of 75 different active compounds, present themselves as potential substrates for the production of CB reducing production cost, minimizing environmental impacts and reverting into benefits in human needs, such as applications in burn treatments, among others. The objective of the work was to develop CB membranes produced from *Gluconacetobacter xylinus* bacteria, in culture media enriched with vinasse and *Aloe vera*. The IR analysis allowed the conclusion that chemical alterations occurred in the structures of the CB incorporated with *Aloe vera*, presence of a characteristic band of interaction with amino group and in the incorporation with vinasse, presence of a characteristic band of crystalline regions. In XRD analysis, it was possible to identify incorporations with the presence of cellulose I (CBV20, CBV40, CBV60, CBV80 and CBB80) and incorporations with the presence of cellulose II (CBB20, CBB40 and CBB60). Mechanically, the CBB80 incorporation of *Aloe vera* showed similarity in the values of modulus of elasticity (MPa), maximum stress (MPa) and elongation (%), while the incorporation with vinasse, CBV40 showed similarity in the values of modulus of elasticity (MPa), maximum stress (MPa) and elongation (%) when compared to CB (control) membranes; Morphologically, CBB80 *Aloe vera* incorporation demonstrated a network of microfibrils with *Aloe vera* gel and possibly adhered to the surface. The results showed the potential use of incorporations of vinasse and *Aloe vera* as alternative substrates, reducing the high costs involved in production, the valorization of the use of agroindustrial waste and the potential use of plants with bioactive compounds.

Key words: bacterial cellulose; *Gluconacetobacter xylinus*; alternative substrates; vinasse; *Aloe vera*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da molécula de celulose.....	28
Figura 2 – Estrutura da celulose: regiões amorfas e cristalinas.....	29
Figura 3 – Representação das ligações β – 1 – 4 glicosídicas (celulose) e das ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares.....	29
Figura 4 – Bactéria <i>Gluconacetobacter xylinus</i>	31
Figura 5 – Planta de <i>Aloe vera</i>	37
Figura 6 – Constituintes das folhas de <i>Aloe vera</i> : casca, gel e látex.....	38
Figura 7 – Processo de fertirrigação no solo.....	40
Figura 8 – Fluxograma experimental das etapas de preparação e obtenção das membranas de CB.....	43
Figura 9 – Bactéria <i>Gluconacetobacter xylinus</i> em meio de cultura padrão Alaban em eppenderff e Erlenmeyer.....	44
Figura 10 – Preparo do substrato Aloe vera para incorporação nos meios de cultura.....	45
Figura 11 – Etapas para obtenção das CB incorporadas com substrato <i>Aloe vera</i>	47
Figura 12 – Membranas de CB enriquecidas com diferentes porcentagens de <i>Aloe vera</i> após 7 dias de crescimento.....	48
Figura 13 – Preparo da vinhaça para incorporação nos meios de cultura padrão Alaban.....	49
Figura 14 – Etapas para obtenção das CB incorporadas com substrato vinhaça.....	50
Figura 15 – Membranas de CB enriquecidas com diferentes porcentagens de vinhaça após 7 dias de crescimento.....	51
Figura 16 – Etapas de purificação das CB.....	52
Figura 17 – Etapas para obtenção das CB secas.....	53
Figura 18 – Etapas para obtenção das CB em pó.....	56

Figura 19 – Fluxograma experimental das etapas de caracterizações.....	54
Figura 20 – Curva de crescimento do inóculo de <i>Gluconacetobacter xylinus</i> em meio de cultura Alaban.....	58
Figura 21 – Curva de crescimento de inóculo de <i>Gluconacetobacter xylinus</i> em relação ao corte de uma membrana 2 cm x 2 cm de CB.....	60
Figura 22 – Curva de consumo de açúcares em meio de cultura Alaban em relação à curva de crescimento com o inóculo.....	61
Figura 23 – Estrutura molecular da celulose: terminação redutora e não redutora.....	62
Figura 24 – Micrografias de CB obtidas a partir do meio de cultura padrão Alaban enriquecido com substrato <i>Aloe vera</i>	64
Figura 25 – Micrografias de CB obtidas a partir do meio de cultura padrão Alaban enriquecido com substrato vinhaça.....	65
Figura 26 – Amostra de CB presa na garra com auxílio das lixas P220.....	67
Figura 27 – Curva de comportamento das membranas de celulose bacteriana a partir do meio de cultura enriquecido com <i>Aloe vera</i>	68
Figura 28 – Curva de comportamento das membranas de celulose bacteriana a partir do meio de cultura enriquecido com vinhaça.....	68
Figura 29 – Espectros de IR de CB obtidos das incorporações com substrato <i>Aloe vera</i>	71
Figura 30 – Espectros de IR de CB obtidos das incorporações com substrato vinhaça.....	72
Figura 31 – Difrátogramas de DRX de CB obtidos a partir das incorporações com substrato <i>Aloe vera</i>	75
Figura 32 – Difrátogramas de DRX de CB obtidos a partir das incorporações com substrato vinhaça.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aplicações da CB.....	33
Tabela 2 – Substratos alternativos utilizados na produção de CB.....	35
Tabela 3 – Composição do meio de cultura padrão Alaban.....	43
Tabela 4 – Frações do substrato <i>Aloe vera</i> no meio de cultura padrão Alaban.....	46
Tabela 5 – Frações do substrato vinhaça no meio de cultura padrão Alaban.....	50
Tabela 6 – Propriedades mecânicas das membranas de CB obtidas a partir da incorporação de substrato <i>Aloe vera</i> no meio de cultura padrão Alaban.....	69
Tabela 7 – Propriedades mecânicas das membranas de CB obtidas a partir da incorporação de substrato vinhaça no meio de cultura padrão Alaban.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
FCA	Faculdade de Ciências Agrônomicas
IBB	Instituto de Biociências de Botucatu
NUPAM	Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia
CME	Centro de Microscopia Eletrônica
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
DRX	Difração de Raios - X
IR	Espectroscopia na Região do Infravermelho
OD	Densidade óptica
AR	Açúcares redutores
ATCC	American Type Culture Collection
UDP	Uridina – difosfato
UDPG	Uridina – difosfato – glicose
NaOH	Hidróxido de sódio
$(C_6H_{10}O_5)_n$	Celulose
$C_{12}H_{22}O_{11}$	Açúcar cristal – sacarose
$C_6H_8O_7$	Ácido cítrico
K_2HPO_4	Fosfato de potássio dibásico anidro
$MgSO_4$	Sulfato de magnésio
$(NH_4)_2SO_4$	Sulfato de amônio
DNS	Ácido 3,5 - dinitrosalicílico
CB	Celulose bacteriana
CV	Celulose vegetal
BCA	Celulose bacteriana de <i>Aloe vera</i>
CB – ACE	Celulose bacteriana de <i>Aloe vera</i> (acemanana)
CBB20	Celulose bacteriana 80 % Alaban e 20 % <i>Aloe vera</i>

CBB40	Celulose bacteriana 60 % Alaban e 40 % <i>Aloe vera</i>
CBB60	Celulose bacteriana 40 % Alaban e 60 % <i>Aloe vera</i>
CBB80	Celulose bacteriana 20 % Alaban e 80 % <i>Aloe vera</i>
CBV20	Celulose bacteriana 80 % Alaban e 20 % vinhaça
CBV40	Celulose bacteriana 60 % Alaban e 40 % vinhaça
CBV60	Celulose bacteriana 40 % Alaban e 60 % vinhaça
CBV80	Celulose bacteriana 20 % Alaban e 80 % vinhaça

LISTA DE SÍMBOLOS

C	Carbono
H	Hidrogênio
K	Potássio
Fe	Ferro
Ca	Cálcio
I	Iodo
O	Oxigênio
Br	Bromo
Mg	Magnésio
P	Fósforo
N	Nitrogênio
S	Enxofre
Zn	Zinco
Se	Selênio
Na	Sódio
Mn	Manganês
Cu	Cobre
Cr	Crômio
g	Gramas
mL	Mililitros
mg	Miligramas
MPa	Mega Pascal
cm	Centímetros
mm	Milímetros
μm	Micrômetros
nm	Nanômetros
g L^{-1}	Gramas por litro
L	Litro

°C Celsius

% Porcentagem

® Marca registrada

Kgf/cm² Kilograma - força

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	Objetivo Geral.....	27
2.1.1	Objetivos específicos.....	27
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	28
3.1	Celulose	28
3.2	Celulose Bacteriana	30
3.2.1	Biossíntese	32
3.2.2	Aplicações da Celulose Bacteriana.....	33
3.2.3	Substratos na produção de CB	35
3.3	Aloe vera	37
3.4	Vinhaça	39
4	METODOLOGIA	42
4.1	Microrganismo.....	42
4.2	Descrição operacional para produção de CB.....	42
4.3	Meio de cultura: crescimento e manutenção	43
4.4	Preparo do inóculo.....	44
4.5	Preparo do substrato Aloe vera	44
4.5.1	Incorporação do substrato Aloe vera no meio de cultura Alaban ..	46
4.6	Preparo do substrato vinhaça	48
4.6.1	Incorporação do substrato vinhaça no meio de cultura Alaban	49
4.7	Purificação e neutralização	51
4.8	Secagem	52
4.9	Moagem.....	53
4.10	Descrição operacional das caracterizações	54
4.10.1	Caracterização do meio de cultura padrão Alaban	54
4.10.1.1	Curva de crescimento	54
4.10.1.2	Quantificação de açúcares redutores	55
4.10.2	Caracterização dos substratos vinhaça e Aloe vera.....	55
4.10.2.1	Caracterização da vinhaça.....	55
4.10.2.2	Caracterização do solo: Aloe vera	55
4.10.3	Caracterização das membranas de celulose bacteriana	56
4.10.3.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	56

4.10.3.2	Propriedades Mecânicas: Teste de tração	56
4.10.3.3	Espectroscopia na Região do Infravermelho (IR)	57
4.10.3.4	Difratômetro de Raio – X (DRX)	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1	Caracterização do meio de cultura Alaban	58
5.1.1	Curva de Crescimento	58
5.1.2	Quantificação de açúcares redutores	61
5.2	Caracterização das membranas de celulose bacteriana	62
5.2.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	63
5.2.2	Propriedades Mecânicas: Teste de tração	67
5.2.3	Espectroscopia na Região do Infravermelho (IR)	71
5.2.4	Difratômetro de Raio – X (DRX)	74
6	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICE A – Curva de calibração açúcares	94
	ANEXO A – Script do ensaio de tração	95
	ANEXO B – Gráfico gerado no programa Tesc: Amostra CBB80..	96
	ANEXO C – Gráfico gerado no programa Tesc: Amostra CBV40..	97
	ANEXO D – Caracterização da vinhaça	98
	ANEXO E – Caracterização do solo	99

1 INTRODUÇÃO

A celulose bacteriana (CB) é produzida a partir de vias biossintéticas de microrganismos dos seguintes gêneros: *Komagataeibacter*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina* e *Salmonella*. A bactéria produz as membranas de celulose por meio da fermentação em meio rico em fontes de carbono (C) e nitrogênio (N). Esta membrana de CB é considerada quimicamente pura, por ser livre de lignina e hemicelulose e não tóxica, além de possuir alta porosidade e resistência mecânica (CHANG; CHEN, 2016; HALIB et al., 2019; QIU et al., 2016; WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019).

A utilização e aproveitamento de resíduos agroindustriais, alimentícios, cervejeiros, produtos com potenciais propriedades terapêuticas e/ou medicinais como substrato alternativo, nos meios de cultura, para a obtenção de celulose bacteriana se fazem crescentes na literatura, dentre eles, a utilização de glicerol (VAZQUEZ et al., 2013), líquido de sisal (LIMA et al., 2017), suco de caju e melaço de soja (SOUZA et al., 2020b), resíduos de cascas de laranja (KUO et al., 2019), resíduos de casca de banana (SIJABAT et al., 2020), mistura de xarope de tâmara e soro de queijo (RAISZADEH-JAHROMI et al., 2020) entre outros. Estes subprodutos, geralmente são ricos em açúcares como: glicose, frutose, galactose e sacarose e podem ser promissores para a produção industrial da celulose bacteriana (WU; LIU, 2013).

A vinhaça, um subproduto da fabricação do etanol, é rica em nitrato residual líquido, alto teor de matéria orgânica, de macro e micronutrientes, altas quantidades de cátions como o potássio (K), ferro (Fe), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) e menores quantidades de Nitrogênio (N) e Fósforo (P) (FUESS, 2013). É composta por 93 % de água e 7 % de sólidos orgânicos e inorgânicos, podendo variar a composição conforme o processo de produção do etanol (ALBANEZ et al., 2018). A vinhaça, quando depositada no solo, age como recuperador da fertilidade em um processo chamado de fertirrigação (OLIVEIRA, 2015). No entanto, a aplicação desse processo deve ser controlada para evitar impactos no solo e nos lençóis freáticos, pois quando descontrolada, pode acarretar em lixiviação (SULEIMAN et al., 2018).

Conhecida popularmente como babosa, a *Aloe vera* é uma planta pertencente à família das *Xanthorrhoeaceae* (LIM; CHEONG, 2015). A principal característica é o

alto teor de água, cerca de 99 %, com o outro 1 % de 75 compostos ativos diferentes, como vitaminas, minerais, enzimas, polissacarídeos, compostos fenólicos e ácidos orgânicos, além de derivados antracênicos, sendo as aloínas (barbalóina e isobarbalóina) os mais conhecidos. Possui grande potencial de aplicação nas áreas médicas – engenharia de tecidos, queimaduras e cicatrização. (RAMOS; PIMENTEL, 2011; FREITAS; RODRIGUES; GASPI, 2014; RADHA; LAXMIPRIYA, 2015; GAO et al., 2019).

Uma vez que o meio de cultura deve conter, no mínimo, fonte de carbono (C), fonte de nitrogênio (N), e outros macro e micronutrientes necessários para o crescimento do microrganismo, tais como sais de fósforo (P), enxofre (S), potássio (K) e magnésio (Mg), a *Aloe vera* e a vinhaça apresentam-se como potenciais substratos nos meios de cultura para a produção de celulose bacteriana, podendo tornar-se uma solução economicamente viável (JOZALA et al., 2016; MOHAMMADKAZEMI; AZIN; ASHORI, 2015).

Esta dissertação de mestrado visa estudar a produção de CB utilizando os substratos alternativos de *Aloe vera*, planta com propriedades terapêuticas e medicinais, e vinhaça, resíduo agroindustrial, enriquecidos no meio de cultura padrão Alaban.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho propõem o desenvolvimento de membranas de celulose bacteriana (CB) utilizando meios de cultura enriquecidos com vinhaça e *Aloe vera*.

2.1.1 Objetivos específicos:

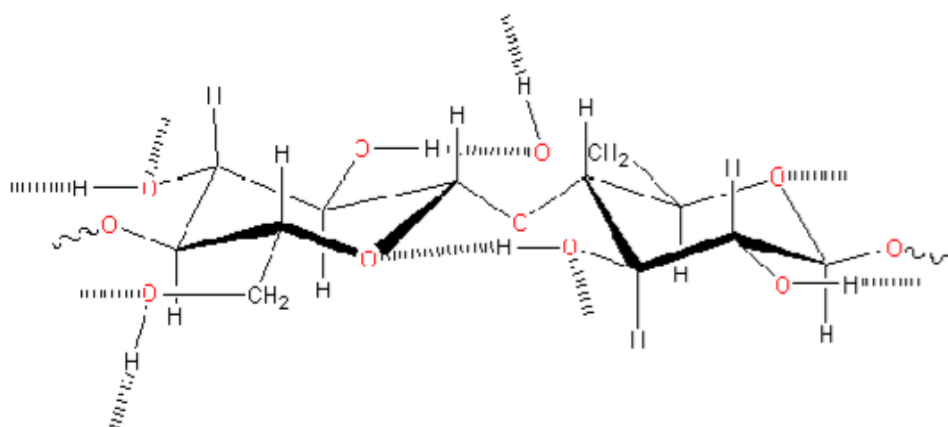
- Produzir membranas de celulose bacteriana por *Gluconacetobacter xylinus* utilizando *Aloe vera*, uma planta com propriedades terapêuticas e medicinais, como substrato alternativo ao meio de cultura.
- Produzir membranas de celulose bacteriana por *Gluconacetobacter xylinus* utilizando vinhaça, resíduo agroindustrial, como substrato alternativo ao meio de cultura.
- Caracterizar a composição química do substrato de vinhaça e *Aloe vera* utilizadas na produção de membranas de celulose bacteriana.
- Caracterizar as membranas de celulosas bacterianas produzidas morfológicamente, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopicamente, por espectroscopia na região do infravermelho (IR), difração de raios-X (DRX) e mecanicamente, por testes de tração.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Celulose

A celulose ($C_6H_{10}O_5$)_n foi primeiramente caracterizada pelo químico francês Anselme Payen, em 1838. É um polímero renovável e biodegradável, abundante na natureza e possui grande importância na economia global com uma produção de 10¹⁴ toneladas por ano (PACHECO et al., 2017).

Figura 1 – Representação esquemática da molécula de celulose



Fonte: DONINI et al., 2010.

Pode ser encontrada em diferentes formas de vida como em plantas, fungos, protozoários e algumas bactérias (KLEMM et al., 2005; PEREIRA et al., 2014).

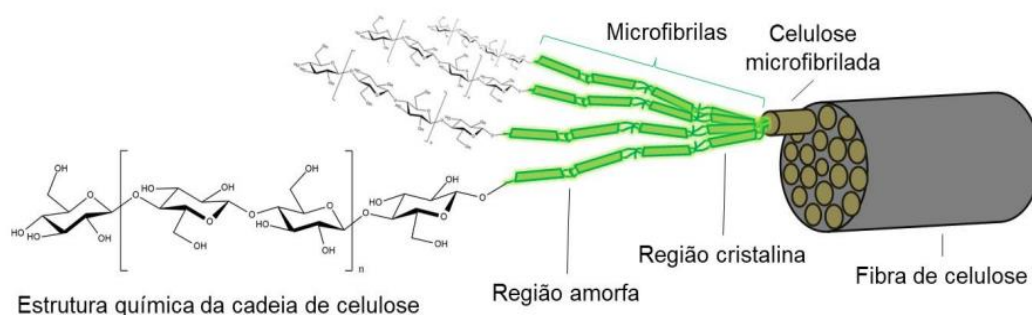
A celulose vegetal (CV) é o principal constituinte da parede celular e um dos materiais naturais mais utilizados na indústria de papel e fibras têxteis, como algodão, e na indústria madeireira, como emulsificador (FERRER; PAL; HUBBE, 2017).

Constituída de átomos de carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O), é formada por longas cadeias lineares não - ramificadas. As moléculas de glicose são unidas por ligações β – 1,4 – glicosídicas, entre o oxigênio ligado ao átomo de carbono 1 de uma molécula e o átomo de carbono 4 da molécula de glicose adjacente (ABDUL KHALIL; BHAT; IREANA YUSRA, 2012).

As moléculas de celulose, ao se agruparem, tendem a formar microfibrilas por meio das ligações intermoleculares. As microfibrilas têm regiões chamadas cristalinas,

que são altamente organizadas e regiões chamadas de amorfas, com baixa organização (WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019).

Figura 2 – Estrutura da celulose: regiões amorfas e cristalinas

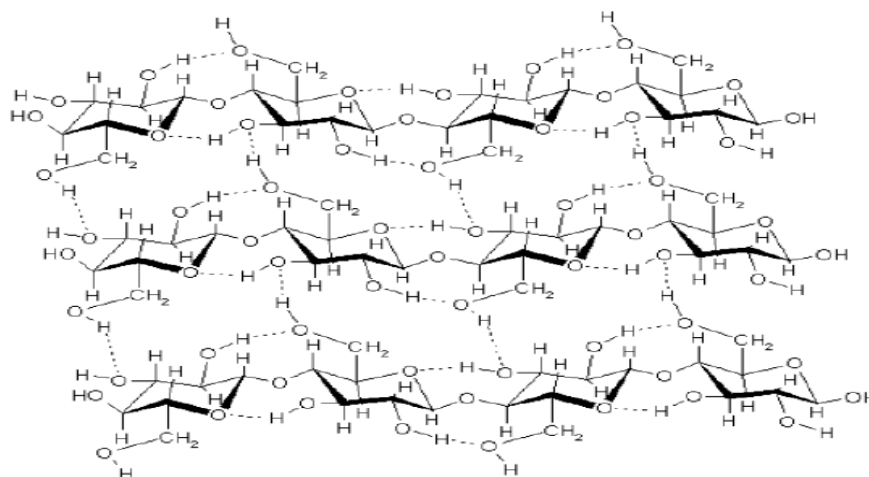


Fonte: LAVOINE et al., 2012 (adaptado).

Pertencente ao grupo dos carboidratos, é um material polimorfo, ou seja, pode ser encontrado em até quatro formas: celulose I, II, III e IV (JOZALA et al., 2016; VAZQUEZ et al., 2013).

A celulose do tipo I é classificada em celulose I α (triclínica) e I β (monoclínica), possuindo cadeias paralelas entre si. A celulose II pode ser obtida através da celulose I por métodos como mercerização (solubilização seguida de cristalização) ou recristalização (tratamento alcalino) e o arranjo das cadeias é antiparalelo (SOUZA et al., 2020a).

Figura 3 - Representação das ligações β - 1 – 4 glicosídicas (celulose) e das ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares



Fonte: RAVEN et al., 2001.

Os grupos hidroxilas livres formam ligações de hidrogênio do tipo intramoleculares com grupos hidroxilas da mesma molécula, e ligações de hidrogênio do tipo intermoleculares entre grupos hidroxilas de moléculas adjacentes. Essas ligações são responsáveis pela rigidez da cadeia de celulose e pela formação da parede da fibra vegetal. Inicia-se a formação da estrutura polimérica, chamada celobiose, quando duas moléculas de celulose, então, se unem (RAVEN et al., 2001; KHANDELWAL; WINDLE, 2013).

Algumas bactérias são capazes de produzir celulose da forma extracelular, chamando a atenção devido ao potencial elevado de fontes alternativas de celulose, conhecidas como celulose bacteriana (CB) (KLEMM et al., 2001).

Tanto a CV quanto a CB apresentam mesma fórmula molecular, porém quando comparadas nos quesitos das propriedades físicas, flexibilidade, biocompatibilidade, disponibilidade e resistência mecânica, a segunda demonstra excelentes resultados em relação à primeira (BARUD et al., 2011; CACICEDO et al., 2016).

3.2 Celulose Bacteriana

A celulose bacteriana (CB), também conhecida como biocelulose é considerada uma molécula idêntica à celulose vegetal, com alta cristalinidade, biocompatibilidade, alto grau de polimerização, porosidade, resistência mecânica, durabilidade, alta capacidade de retenção e absorção de água, biodegradabilidade e atoxicidade (CHOI; SHIN, 2020; DU et al., 2018; WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019).

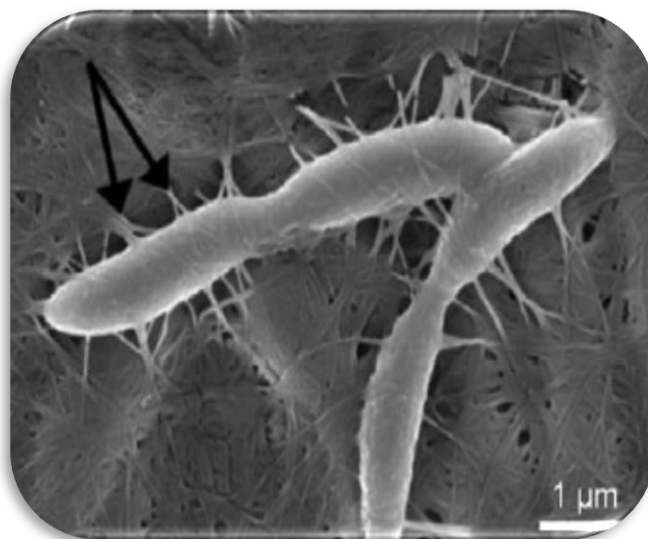
Diversos gêneros, como *Komagataeibacter*, (anteriormente *Gluconacetobacter*), *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina* e *Salmonella* podem gerar variedades de celulose bacteriana (AZEREDO et al., 2019; MOLINA-ROMERO et al., 2021).

A bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, anteriormente chamada de *Acetobacter xylinum*, foi descrita por Adrian Brown, em 1886, ao identificar a formação de um material gelatinoso na superfície do caldo da fermentação do vinagre (BROWN, 1886; SPEROTTO et al., 2021). Depois de 100 anos, os estudos com a celulose bacteriana foi retomado (SOUZA et al., 2020b).

Presentes em lugares em que ocorrem fermentações de açúcares e carboidratos, como nas flores, sucos, frutas em decomposição e bebidas alcoólicas,

estas bactérias produzem CB na presença de oxigênio e carbono contínuo (ESA; TASIRIN; RAHMAN, 2014; GORGIEVA; TRČEK, 2019).

Figura 4 – Bactéria *Gluconacetobacter xylinus*



Fonte: STANISŁAWSKA, 2016.

Possuem forma elipsoidal ou de bastonetes retos, podem ser encontradas em pares, sozinhas ou em cadeias com dimensões variando de 0,5 – 1,0 μm por 2,0 – 10,0 μm ; são estritamente aeróbicas, altamente tolerantes a condições ácidas, crescem em pH menores que 5,0, mesófilas – crescem em temperaturas moderadas, são gram – negativas e não patogênicas (HOMMEL, 2014).

Para a *Gluconacetobacter xylinus*, a membrana de CB que cresce na interface meio de cultura/ar atua como barreira física, protegendo-a da radiação ultravioleta, e previne o substrato de desidratação além de aumentar a capacidade de colonização total (HALIB et al., 2019; PACHECO et al., 2017).

Em condições de cultura estática, a CB cresce conforme o formato do frasco que está inserido, gerando uma membrana tridimensional e interconectada (SOUZA et al., 2020a). Já em cultivo dinâmico, cultura com agitação, variando a velocidade rotacional, são obtidas membranas que variam quanto a forma e o tamanho, sendo irregulares e com forma semelhante a pequenas esferas (SOUZA et al., 2020b).

Parâmetros como pH, disponibilidade de oxigênio, fontes de carbono, cepa bacteriana e temperatura podem influenciar no crescimento, morfologia e consequentemente na produção de CB (HU et al., 2014; MOHD NADZIR et al., 2021).

Em relação à estrutura química das membranas de CB, podem dispor de até 250 cadeias poliméricas de até 9 nm de comprimento, o que corresponde de 2 mil até 20 mil unidades de glicose estruturadas em nanofitas. Possuem grau de polimerização por volta de 2 mil a 6 mil, nanofibrilas com largura de 2 a 4 nm, que quando agrupadas formam microfibrilas. As microfibrilas possuem de 50 a 80 nm de largura e de 1 – 9 nm de espessura (CACICEDO *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2020).

Com quase todos os grupos hidroxilas (OH) da celulose ocupados com ligações de hidrogênio (H), uma extremidade carrega um grupo C4-OH não modificado e a outra extremidade carrega um grupo C1-OH livre, representando assim possíveis pontes para modificações químicas na celulose (GORGIEVA; TRČEK, 2019).

Dentre todas as características favoráveis, o alto custo de produção é fator limitante, já que o meio padrão descrito na literatura possui suplementação de glicose, peptona e extrato de levedura. Algumas estratégias vêm sendo propostas para a redução dos custos e aumento da produção, como as modificações dos meios de cultura (CACICEDO *et al.*, 2016; PACHECO *et al.*, 2017).

3.2.1 Biossíntese

A biossíntese da CB é uma reação com multi-etapas que ocorre tanto em meios sólidos como líquidos, transformando a fonte de carbono disponível formando celulose; dependendo da fonte de carbono utilizada, o microrganismo segue rotas metabólicas distintas (ULLAH *et al.*, 2021).

O princípio da formação da CB ocorre com as condições do substrato adequadas, gerando um crescimento celular/metabolismo microbiano e formação do subproduto (DONINI *et al.*, 2010).

Para a glicose, como fonte de carbono, a reação envolve quatro etapas: etapa 1, onde ocorre a fosforilação da glicose pela enzima hexoquinase, seguida da isomerização da glicose – 6 – fosfato (Glc – 6 – P) em glicose – 1 – fosfato (Glc – 1 – P) por meio da enzima fosfoglicomutase, caracterizando a etapa 2. Na etapa 3, se dá a formação da uridina – difosfato – glicose (UDP – Glicose) através da enzima UDPG – pirofosforilase, e produção de celulose a partir da formação da UDP – Glucose, em cadeias lineares de β - 1 – 4 glucano, catalisada pela celulose sintase, na etapa 4.

Nos monossacarídeos, como frutose, ocorre fosforilação da frutose para frutose – 6 – fosfato por meio da enzima hexoquinase, seguida de isomerização da frutose-6-fosfato para glicose – 6 – fosfato pela enzima fosfoglicose isomerase. Transformada a frutose em glicose – 6 – fosfato, segue o ciclo de síntese da celulose. Para dissacarídeos, como sacarose, ocorre a hidrólise dos dissacarídeos em monossacarídeos (frutose ou glicose), seguindo assim duas possíveis vias de biossíntese (CHAWLA et al., 2009; HU et al., 2014; UL-ISLAM; KHAN; PARK, 2012).

3.2.2 Aplicações da Celulose Bacteriana

A aplicabilidade das CB nos estudos tem sido explorada nas mais diversas áreas, conforme demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1 – Aplicações da CB

Aplicações		Literatura
Alimentos	• sobremesas dietéticas; • sorvetes; • espessantes na culinária; • embalagens comestíveis; • modificadores de textura;	(AZEREDO et al., 2019; ULLAH HÉLDER SANTOS TAOUS KHAN, [s.d.])
Produtos para bebês	• fraldas descartáveis; • pomadas;	(AZEREDO et al., 2019)
Meio ambiente	• tratamento de lixo; • purificação de esgotos;	(ALVES et al., 2020; HE et al., 2018)
Eletrônica e comunicações	• membranas acústicas em fones de ouvido e headsets;	(UL-ISLAM et al., 2015)
Mineração e nas refinarias	• atuando como esponjas na coleta de vazamentos de óleo;	(HUSSAIN WASIM SAJJAD TAOUS KHAN FAZLI WAHID, 2019)

Produtos florestais	• compensados; • fibras têxteis;	(FERNANDES et al., 2020; KAMIN et al., [s.d.])
Cosméticos e estética	• cremes condicionadores; • máscaras hidratantes embebidas em extratos vegetais; • polidores de unhas (BioCellulose®);	(LUDWICKA et al., 2016; YAN et al., 2017)
Produtos de couro artificial	• vestimentas e calçados	(FERNANDES et al., 2020)
Medicina	• pele artificial temporária em pacientes com queimaduras; • úlceras e tratamento de lesões crônicas (Biofill®, XCell®, Bionext®); • substituto temporário de pele (Membracell®); • material de substituição do menisco na articulação do joelho; • implantes de tubos para vasos sanguíneos artificiais (Basyc®); • implantes dentários; • dispositivos de liberação de fármacos; • reconstrução de tecidos periodontais (Gengiflex®);	(JORFI; FOSTER; FOSTER, 2014; PICHETH et al., 2017; SPEROTTO et al., 2021)

Fonte: Elaborada pela autora.

A aplicação de CB, em bioimpressões 3D na produção de novos produtos, vem tomando espaço, gerando melhorias na propriedade do material, otimização dos processos, redução de consumo de energia, além do aumento de compra (JANENI; ADASSOORIYA, 2021).

3.2.3 Substratos na produção de CB

O meio padrão utilizado na manutenção e produção de CB possui alto custo, devido à composição sintética de extrato de levedura, peptona e glicose (KHAN et al., 2021).

Diversos estudos buscam alternativas em relação ao aproveitamento de resíduos agroindustriais, alimentícios, cervejeiros, produtos com potenciais propriedades terapêuticas e/ou medicinais são relatados na literatura.

Durante o processo de formulação do meio, é possível inserir diferentes materiais para o desenvolvimento de membranas de celulose bacteriana e substituir os compostos sintéticos por compostos presentes nestes subprodutos (ALBUQUERQUE, 2019; SPEROTTO et al., 2021).

A Tabela 2, descreve os diferentes substratos alternativos que podem ser utilizados para a produção de CB.

Tabela 2 – Substratos alternativos utilizados na produção de CB

Substratos	Literatura
<i>Aloe vera</i>	(SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010)
Extrato de casca de uva e soro de queijo	(CARREIRA et al., 2011)
Polpa de licor, casca de arroz e resíduos de tecidos de algodão	(AL-ABDALLAH; DAHMAN, 2013)
Resíduos de frutas	(VIEIRA, 2013)
Resíduos do azeite de oliva	(GOMES et al., 2013)
Resíduo de abacaxi e água de coco	(VAZQUEZ et al., 2013)
Extrato da lichia	(YANG et al., 2013),
Melaço	(ÇAKAR et al., 2014)
Melaço de cana de açúcar, sacarose (açúcar), xarope	(MOHAMMADKAZEMI; AZIN; ASHORI, 2015)

Água residual de jujuba cristalizada	(LI et al., 2015),
Resíduos industriais de bebidas de cascas e bagaços de citros	(FAN et al., 2016)
Soro de leite e frutas	(JOZALA et al., 2016)
Resíduos de cajueiros	(PACHECO et al., 2017),
Líquido de sisal	(LIMA et al., 2017),
Resíduos de cascas de laranja	(KUO et al., 2019),
Óleo de soja refinado e tratado	(QIAO et al., 2019)
Mistura de xarope de tâmara e soro de queijo	(RAISZADEH-JAHROMI et al., 2020)
Vinhaça	(BARSHAN et al., 2019),
Extrato de resíduo de tabaco	(YE et al., 2019)
Suco de caju e melaço de soja	(SOUZA et al., 2020b),
Resíduos de casca de banana	(SIJABAT et al., 2020)
Resíduo de manga	(CALDERÓN-TOLEDO et al., 2021)
Resíduo de tapioca líquida	(GHOZALI; MELIANA; CHALID, 2021).
Óleo de coco	(SILVA et al., 2021)
Resíduo de cascas de frutas (abacaxi, laranja, limão doce e banana)	(KHAN et al., 2021)
Mucilagem residual do cacau	(SAAVEDRA-SANABRIA et al., 2021)
Casca de vegetais	(BOZDAĞ et al., 2021)

Fonte: Elaborada pela autora.

Segundo (SHARMA; BHARDWAJ, 2019), a adição de componentes ricos em carboidratos, minerais, vitaminas e outros compostos, podem aumentar o rendimento da produção de CB e torná-la economicamente mais viável.

3.3 *Aloe vera*

Pertencente à família *Xanthorrhoeaceae*, gênero *Aloe*, a *Aloe barbadensis* Miller ou *Aloe vera* é uma planta medicinal com mais de 400 espécies espalhadas em vários países (LIM; CHEONG, 2015). Originária da África do Sul, difundiu-se por milênios na China, Japão, Índia, Grécia e Egito (MARTINS CARNEIRO et al., 2013).

No Ocidente, especificamente nos EUA, teria sido cultivada e utilizada logo no início como fornecedora de látex. Conhecida popularmente no Brasil como babosa, são perenes, xerófitas, suculentas, adaptadas a viver em baixa disponibilidade de água, crescem nas regiões de clima seco e quente dos continentes africano, asiático, americano e europeu (RADHA; LAXMIPRIYA, 2015).

Figura 5 – Planta de *Aloe vera*



Fonte: iStock, Aloe vera, 2021.

A planta possui folhas de coloração verde túrgida unidas ao caule no formato de roseta, reunindo até 20 unidades. Cada folha tem formato côncavo na face superior e formato convexo na face inferior e nas margens, presença de espinhos triangulares, de coloração amarelada, curtos e espaçados. As folhas mais jovens são retas e menores (JOSEPH; RAJ, 2010).

Figura 6 – Constituintes das folhas de *Aloe vera*: casca, gel e látex



Fonte: iStock, Aloe vera, 2021

Encontram-se três camadas constituintes nas folhas: o gel, o látex e a casca. O gel é extraído do parênquima de reserva e é caracterizado de uma gelatina mucilaginosa transparente, viscoso (baba) e inodoro. O látex, camada intermediária, denominado extrato de parênquima clorofiliano, possui coloração amarelada, sabor amargo, aroma rançoso e consistência leitosa. E a camada externa, chamada de casca, possui função protetora e é responsável pelo transporte de xilema e floema (SÁNCHEZ-MACHADO et al., 2017).

A principal característica desta planta é o alto teor de água, com cerca de 99 %; o outro 1 % contém 75 compostos ativos diferentes de biomoléculas orgânicas, como vitaminas (A, B1, B2, B3, B6, B9, B12, C e E), minerais (Zn, Se, Na, Mn, Mg, K, Cu, Cr, Ca), lipídios, glicoproteínas, enzimas (peroxidase, lipase, celulase, catalase), polissacarídeos (acemanana), compostos fenólicos e ácidos orgânicos, além de derivados de antracênicos, sendo as aloínas (barbaloína e isobarbaloína) os mais conhecidos (ADLAKHA; KOUL; KUMAR, 2021; RADHA; LAXMIPRIYA, 2015).

A acemanana é um heteropolímero encontrado no extrato do parênquima de reserva, com cadeia de tamanhos variados, formado pela união de manose e glucose por meio de ligações do tipo β (1 $\rightarrow$ 4). A denominação se dá pelo grupamento acetil ligado à casa manose na cadeia. Diversos estudos ressaltam as propriedades medicinais relacionadas a este polissacarídeo (RECOUVREUX, 2008).

Todas as propriedades terapêuticas são encontradas na gelatina que se encontra dentro da folha da planta. A combinação dos derivados na planta proporciona

aplicabilidade terapêutica e medicinal - como propriedades imunomoduladoras, antivirais, antifúngicas, anticâncer, antibacterianas e antidiabéticas; indústria farmacêutica - como anti-inflamatória, efeitos laxantes, antioxidante, devido à estimulação dos macrófagos e cicatrizante de feridas e de queimaduras promovendo o crescimento de epitélio da pele; indústria cosmética – como clareamento de pele, antienvelhecimento e hidratante; indústria alimentícia – em conservantes de alimentos, retardando o processo de putrefação das frutas; indústria odontológica – tratamento de doenças gengivais, redução de sangramento e inflamações (FREITAS; RODRIGUES; GASPI, 2014; GAO et al., 2019).

Saibuatong e Phisalaphong (2010), desenvolveram uma membrana composta por celulose bacteriana e *Aloe vera*, conhecida pela sigla BCA. Analisaram a estrutura da membrana, força de tensão, a capacidade de absorção de água entre outros fatores e concluíram que a BCA possuía grande potencial de aplicação nas áreas médicas – engenharia de tecidos, queimaduras e cicatrização.

Recouvreux (2008), produziu membranas de celulose bacteriana a partir de concentrações de acemanana, polissacarídeo presente na *Aloe vera*; estas membranas de biocompósitos foram denominadas CB – ACE.

O desenvolvimento de novos biomateriais, combinados com *Aloe vera*, vem sendo amplamente estudado, podendo gerar novos produtos com aplicações nas diversas áreas da saúde, estabelecendo as mesmas características quando comparados aos já citados na literatura e oferecerem alternativas para produção, reduzindo os altos custos quando utilizadas fontes de carbono convencionais.

3.4 Vinhaça

A vinhaça, vinhoto, restilo ou caldo da destilaria é o principal subproduto proveniente da produção do etanol durante a etapa de destilação da mistura alcoólica gerada da fermentação (DE CASTRO et al., 2018). Para cada 1 L de etanol produzido, são gerados aproximadamente 13 L de vinhaça (MARAFON et al., 2019).

A vinhaça é caracterizada pela coloração marrom-escura devido ao pigmento denominado melamedina. É um resíduo pastoso, com odor forte, composto por 93 % de água e 7 % de sólidos orgânicos e inorgânicos (SHINDE et al., 2020). Apresenta pH em torno de 4, alto teor de matéria orgânica, de macro e micronutrientes, altas

quantidades de cátions como o potássio (K), ferro (Fe), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) e menores quantidades de nitrogênio (N) e fósforo (P) (ALBANEZ et al., 2018).

É constituída também de componentes orgânicos, como glicose, sacarose, citrato, oxalato, ácido láctico, ácido acético, etanol, glicerol, ácido láctico, frutose e galactose, sendo variável a concentração dos mesmos devido aos diversos métodos de processamento e tipo do mosto (HARDER, 2020). Em áreas agrícolas, principalmente nas lavouras de cana – de – açúcar, a utilização de vinhaça promove benefícios econômicos, sociais e agrônômicos (MEDINA et al., 2021).

Em um processo denominado fertirrigação, a vinhaça quando depositada no solo age como recuperador da fertilidade, sendo capaz de reduzir custos e substituir adubos minerais devido à presença de potássio (K) e outros macro e micronutrientes (DA SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007).

Figura 7 – Processo de fertirrigação no solo



Fonte: RPA News, cana & indústria, 2021.

A fertirrigação deve ser controlada para evitar impactos no solo e nos lençóis freáticos. Quando descontroladas ou aplicadas em altas doses, podem acarretar lixiviação de vários íons, poluição do solo, das águas subterrâneas e superficiais, salinização do solo, perdas da colheita, aumento da acidez do solo, alteração da nutrição das plantas e até comprometimento na qualidade da produção de açúcar. A acidez e a presença dos metais na composição podem ser as causas da toxicidade (FUESS, 2013; SULEIMAN et al., 2018).

Sendo o meio de cultura um fator importante para o custo total de produção de celulose bacteriana, é importante identificar culturas de baixo custo para o uso como uma solução economicamente viável (LYRA; ROLIM; SILVA, 2003; OLIVEIRA, 2015).

Para Velásquez-riaño et al., (2013) e Barshan et al., (2019), a utilização da vinhaça rica na composição, como substrato alternativo ao meio de cultura, é uma prática promissora que reduziria tanto os custos de produção de celulose bacteriana como também o volume da produção do efluente, já que as membranas produzidas a partir da vinhaça são semelhantes às produzidas em meio de cultura padrão.

4 METODOLOGIA

4.1 Microrganismo

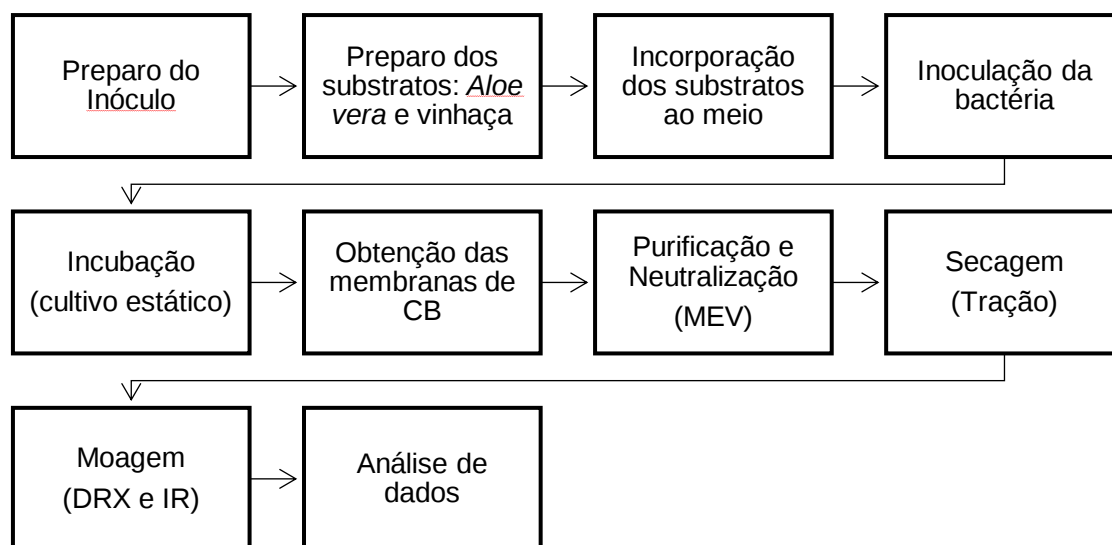
A bactéria utilizada para a produção de membranas de celulose bacteriana foi a *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 23768, doada gentilmente pelo Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Química de Araraquara – UNESP. Para preservação, a bactéria foi mantida em tubos de eppendorf, em 20% (v/v) de glicerol congelada em um ultra freezer CL580/86v a – 40 °C.

Com resultados preliminares do projeto FAPESP nº 18/10235-9 de Iniciação Científica realizado por Jéssyca de Araújo Borro, também desenvolvidos no laboratório RESIDUALL nos anos de 2018 e 2019. Determinou-se que as melhores incorporações para avaliar a adição de um substrato são de 100%, 80%, 60% 40% e 20% para cada substrato. Além da definição das porcentagens das incorporações que seriam reproduzidas nos estudos do mestrado, durante a iniciação científica, também foi possível determinar alguns parâmetros de cultivo, meio de cultura padrão com substituição de alguns reagentes, pH, tempo de cultivo, entre outros.

4.2 Descrição operacional para produção de CB

A Figura 8 esquematiza as etapas para a obtenção das membranas de celulose bacteriana desde o preparo do inóculo até a análise dos dados obtidos das membranas produzidas.

Figura 8 – Fluxograma experimental das etapas de preparação e obtenção das membranas de CB



4.3 Meio de cultura: crescimento e manutenção

Para garantir o crescimento e viabilidade do microrganismo, foi utilizado o meio de cultura Alaban modificado (substituição de glicose por sacarose – açúcar cristal), preparado em 1 L de água destilada e pH da solução ajustado entre 4,5 e 5 conforme Tabela 3.

Tabela 3 – Composição do meio de cultura padrão Alaban

Componentes	Concentração (g L ⁻¹)
Açúcar cristal (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	150
Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇)	6
Fosfato de potássio dibásico anidro (K ₂ HPO ₄)	10
Extrato de levedura	5
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	0,12
Sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	0,4

Fonte: Elaborada pela autora.

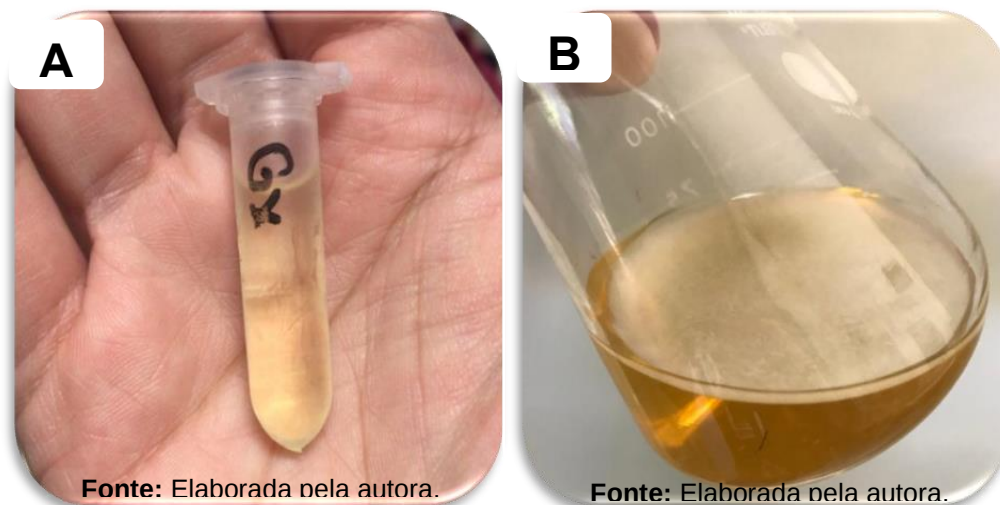
No processo de manutenção, foi acrescentado 15 g L⁻¹ de ágar ao meio, a replicação ocorreu em placas de petri, tubos Falcon e Erlenmeyers. As esterilizações

do meio de crescimento e de manutenção ocorreram em autoclave vertical, temperatura a 121°C, pressão 1,2 kgf/cm² por 15 min.

4.4 Preparo do inóculo

Para a formação do inóculo, cerca de 0,2 mL da alíquota recebida, foram adicionados em Erlenmeyer com 5 mL de meio de cultura padrão Alaban, esterilizado a 121°C, pressão 1,2 kgf/cm² por 15 min, e incubado por um período de 72 horas em cultivo estático com temperatura de 28 ± 2°C.

Figura 9 – Bactéria *Gluconacetobacter xylinus* em meio de cultura padrão Alaban em eppenderff e Erlenmeyer. A – Inóculo recebido em eppenderff / B – Membrana em meio de cultura Alaban após 3 dias de crescimento



Após 72 horas, 3 mL do conteúdo anterior foram adicionados em Erlenmeyer com 50 mL de meio de cultura padrão Alaban e incubados, também, por um período de 72 horas sem agitação em temperatura de 28 ± 2°C.

A partir da segunda inoculação da alíquota, iniciou-se a produção das membranas de celulose bacteriana incorporando os substratos alternativos que foram avaliadas nesta dissertação de mestrado. propostos.

4.5 Preparo do substrato *Aloe vera*

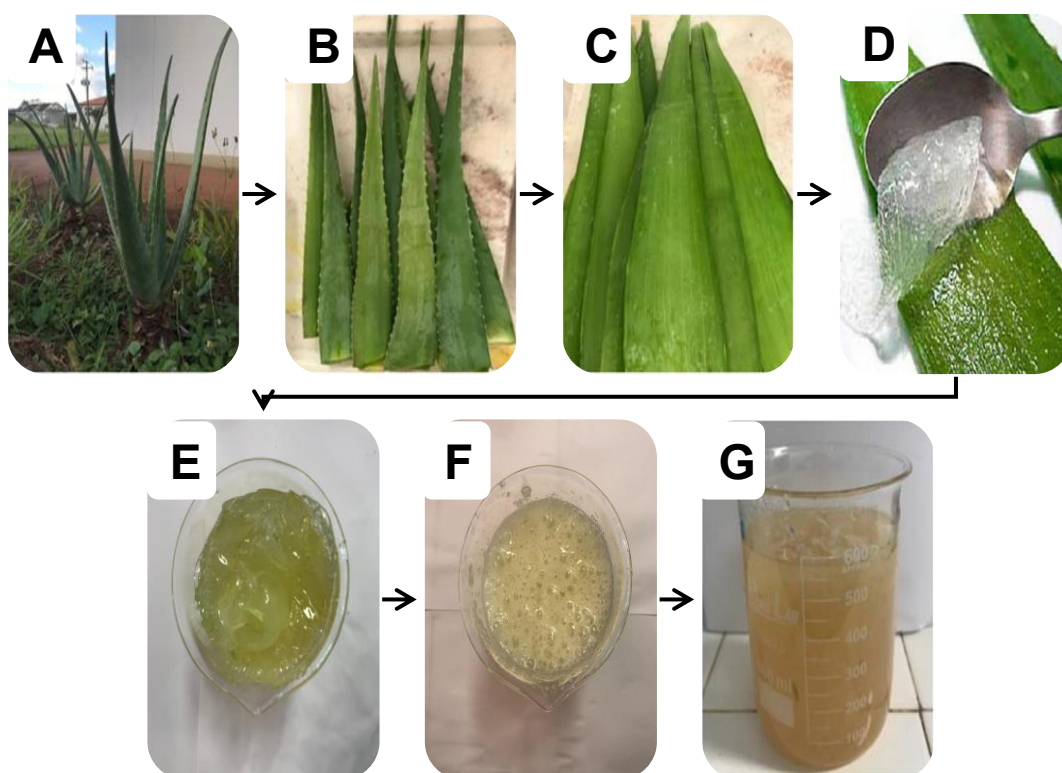
As folhas de *Aloe vera* foram coletadas na área externa do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, na Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus Botucatu.

O tratamento das folhas de *Aloe vera* foi realizado no laboratório RESIDUALL. Primeiramente as folhas foram lavadas em água corrente para remoção de impurezas maiores e logo após, lavadas uma segunda vez com água destilada a fim de garantir a limpeza do material. Para a separação do gel, foram cortados 2 cm da porção basal das folhas e 5 cm da porção apical.

Para obter o gel, retirou-se a casca, morfologicamente dito como parênquima clorofilado, em cortes longitudinais e os espinhos laterais. O gel, parênquima de reserva, foi raspado com uma colher e homogeneizado no liquidificador marca Walita, velocidade 3 por 2 minutos. A solução foi transferida para um béquer de 2 L e aquecida em estufa à temperatura de 60 °C por 20 minutos, para diminuição da espuma que foi formada após a mistura no liquidificador (GODINHO et al., 2016).

A Figura 10 apresenta as etapas do preparo da *Aloe vera*.

Figura 10 – Preparo do substrato *Aloe vera* para incorporação nos meios de cultura. A – Plantas de *Aloe vera* / B – Folhas de *Aloe vera* cortadas / C – Retirada dos espinhos laterais e da parte convexa das folhas / D – Remoção do gel com auxílio de colher / E – Gel para homogeneização no liquidificador / F – Gel homogeneizado com formação de espuma / G – Gel após estufa para diminuição da espuma formada



4.5.1 Incorporação do substrato *Aloe vera* no meio de cultura Alaban

O meio de cultura padrão Alaban e o substrato de gel homogeneizado da *Aloe vera* foram preparados semanalmente. Utilizou-se Erlenmeyers de 250 mL para adição de 100 mL de meio de cultura, volume representado pelo meio de cultura Alaban + substrato. Para as amostras de CB controle utilizou-se a quantia de 100 mL de meio de cultura padrão Alaban em Erlenmeyers de 250 mL. Já para as amostras de CBB20, 80mL de Alaban e 20mL de substrato de *Aloe vera*, amostras de CBB40, 60mL de Alaban e 40mL de substrato de *Aloe vera*, amostras de CBB60, 40mL de Alaban e 60mL de substrato de *Aloe vera* e amostras de CBB80, 20mL de Alaban e 80mL de substrato de *Aloe vera*. A certificação da distribuição das frações dos meios e dos substratos de maneira homogênea foi realizada utilizando-se de provetas graduadas. .

A Tabela 4 apresenta a forma com que o meio de cultura padrão Alaban foi fracionado em porcentagens de 100 %, 80 %, 60 %, 40 % e 20 % e inseridos o substrato *Aloe vera*.

Tabela 4 – Frações do substrato *Aloe vera* no meio de cultura padrão Alaban

Frações		Membranas de celulose bacteriana (CB)	
		Alaban	<i>Aloe vera</i>
CB	100 %	100 mL	0 mL
CBB20	20 %	80 mL	20 mL
CBB40	40 %	60 mL	40 mL
CBB60	60 %	40 mL	60 mL
CBB80	80 %	20 mL	80 mL

Fonte: Elaborada pela autora.

Os frascos, agora com o meio de cultivo padrão Alaban e o substrato alternativo de *Aloe vera*, nas devidas proporções, foram fechados com bonecas e autoclavados em autoclave vertical, temperatura de 121 °C, pressão 1,2 kgf/cm² por 15 min. Após serem resfriados em temperatura ambiente, foram para a capela microbiológica de fluxo laminar vertical, já esterilizada com álcool 70 %. A luz UV foi ligada por 15 minutos a fim de garantir que não ocorresse contaminação por outros organismos.

Encerrado o tempo de esterilização com a luz, iniciou-se o procedimento de inoculação.

A inoculação foi feita a partir de uma membrana de celulose bacteriana crescida em um Erlenmeyer com Alaban 100 % por 7 dias. Cortou-se as membranas em quadrados de de 2 cm x 2 cm para inocular os novos frascos. Os frascos inoculados, foram incubados em B.O.D (biochemical oxygen demand) com temperatura determinada de 28 ± 2 °C por cultivo estático durante 7 dias. A Figura 11 apresenta as etapas de obtenção das membranas de CB com diferentes incorporações do substrato *Aloe vera* e a Figura 12 apresenta as membranas de CB enriquecidas com diferentes porcentagens de substrato *Aloe vera*.

Figura 11 – Etapas para obtenção das CB incorporadas com substrato *Aloe vera*. A – Inoculação / B – Após 7 dias de inoculação / C – Membranas de CB enriquecidas com diferentes porcentagens de *Aloe vera*

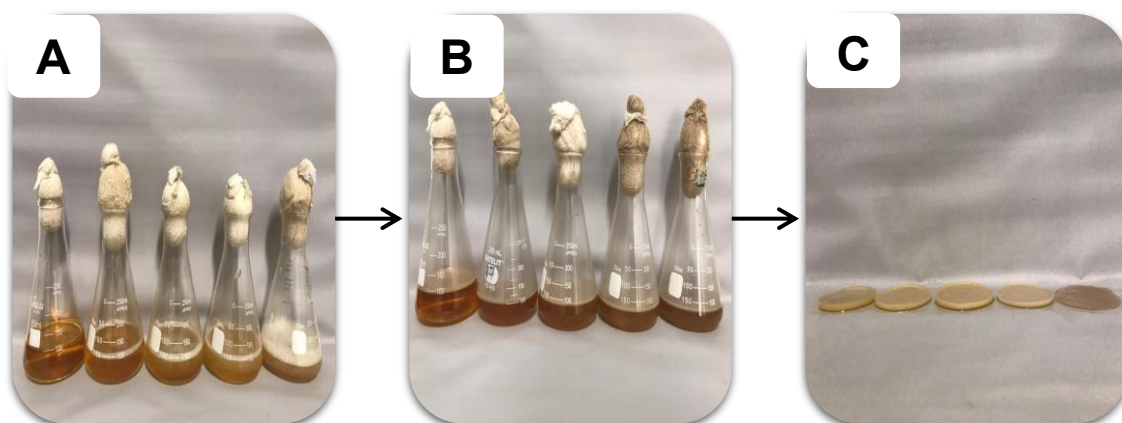
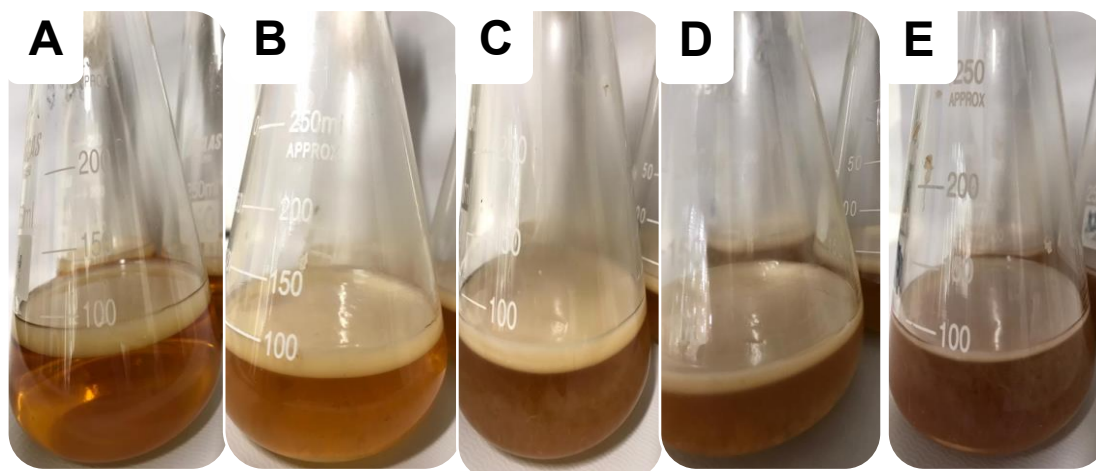


Figura 12 – Membranas de CB enriquecidas com diferentes porcentagens de *Aloe vera* após 7 dias de crescimento. A – CB / B – CBB20 / C – CBB40 / D – CBB60 / E – CBB80



*A – CB (100% Alaban) / B – CBB20 (80% Alaban e 20% *Aloe vera*) / C – CBB40 (60% Alaban e 40% *Aloe vera*) / D – CBB60 (40% Alaban e 60% *Aloe vera*) / E – CBB80 (20% Alaban e 80% *Aloe vera*).

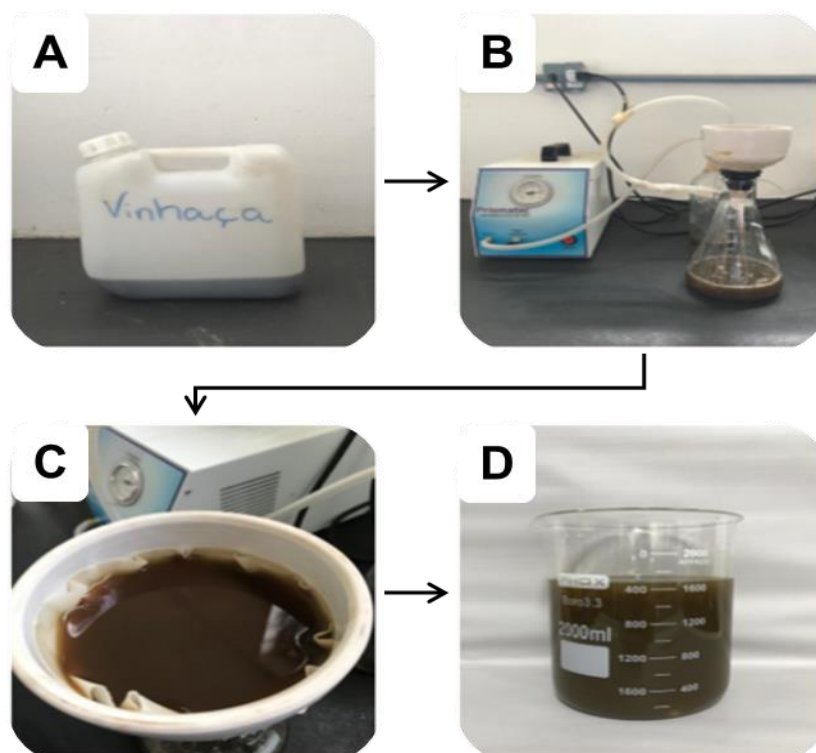
Após o período de cultivo, as membranas formadas na interface ar/meio foram retiradas dos frascos com auxílio de uma pinça esterilizada. Em seguida, as membranas foram lavadas com água destilada para remoção do excesso de meio de cultivo e possíveis bactérias aderidas, preparando-as para o processo seguinte de purificação.

4.6 Preparo do substrato vinhaça

A vinhaça utilizada na produção de membranas de celulose bacteriana foi doada gentilmente de um Alambique da região de São Manuel - SP.

A separação da parte sólida e detritos da parte líquida ocorreu por meio de bombas à vácuo 122 BCP (Figura 13). Para preservação do material durante o experimento, a vinhaça foi engarrafada e congelada em um ultra freezer CL580/86v a -40°C .

Figura 13 – Preparo da vinhaça para incorporação nos meios de cultura padrão Alaban. A – Vinhaça obtida no engenho / B – Bombas à vácuo / C – Vinhaça no filtro de papel / D – Vinhaça filtrada em Beckers



4.6.1 Incorporação do substrato vinhaça no meio de cultura Alaban

O meio de cultura padrão Alaban e o substrato vinhaça foram preparados semanalmente. Para o preparo de amostras, foram dispensados em Erlenmeyers de 250 mL, uma vez determinado o volume final de 100 mL (meio de cultura Alaban + substrato) a quantia de 100 mL de meio de cultura padrão Alaban, para as amostras de CB controle, para amostras de CBV20, 80mL de Alaban e 20mL de substrato de vinhaça, amostras de CBV40, 60mL de Alaban e 40mL de substrato de vinhaça, amostras de CBV60, 40mL de Alaban e 60mL de substrato de vinhaça e amostras de CBV80, 20mL de Alaban e 80mL de substrato de vinhaça. Utilizou-se provetas para a certificação da distribuição das frações dos meios e dos substratos de maneira homogênea. A Tabela 5 apresenta a forma com que o meio de cultura padrão Alaban foi fracionado em porcentagens de 100 %, 80 %, 60 %, 40 % e 20 % e inseridos o substrato vinhaça.

Tabela 5 – Frações do substrato vinhaça no meio de cultura padrão Alaban

Frações		Membranas de celulose bacteriana (CB)	
		Alaban	Vinhaça
CB	100 %	100 mL	0 mL
CBV20	20 %	80 mL	20 mL
CBV40	40 %	60 mL	40 mL
CBV60	60 %	40 mL	60 mL
CBV80	80 %	20 mL	80 mL

Fonte: Elaborada pela autora.

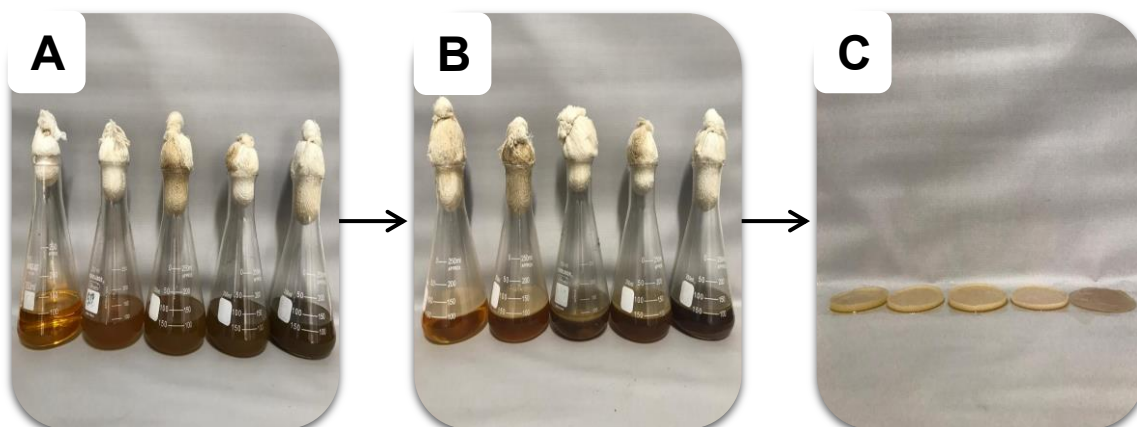
Os frascos, agora com o meio de cultivo padrão Alaban e o substrato alternativo de vinhaça, nas devidas proporções, foram fechados com bonecas e autoclavados em autoclave vertical, temperatura de 121°C, pressão 1,2 kgf/cm² por 15 min, mesmo procedimento realizado com a *Aloe vera*.

Após serem resfriados em temperatura ambiente, foram para a capela microbiológica de fluxo laminar vertical, já esterilizada com álcool 70 %. A luz UV foi ligada por 15 minutos a fim de garantir que não ocorresse nenhuma contaminação por outros organismos. Encerrado o tempo de esterilização com a luz, iniciou-se o procedimento de inoculação realizado da mesma forma que o meio com *Aloe vera*.

A Figura 14 apresenta as etapas de obtenção das membranas de CB com diferentes incorporações do substrato de vinhaça.

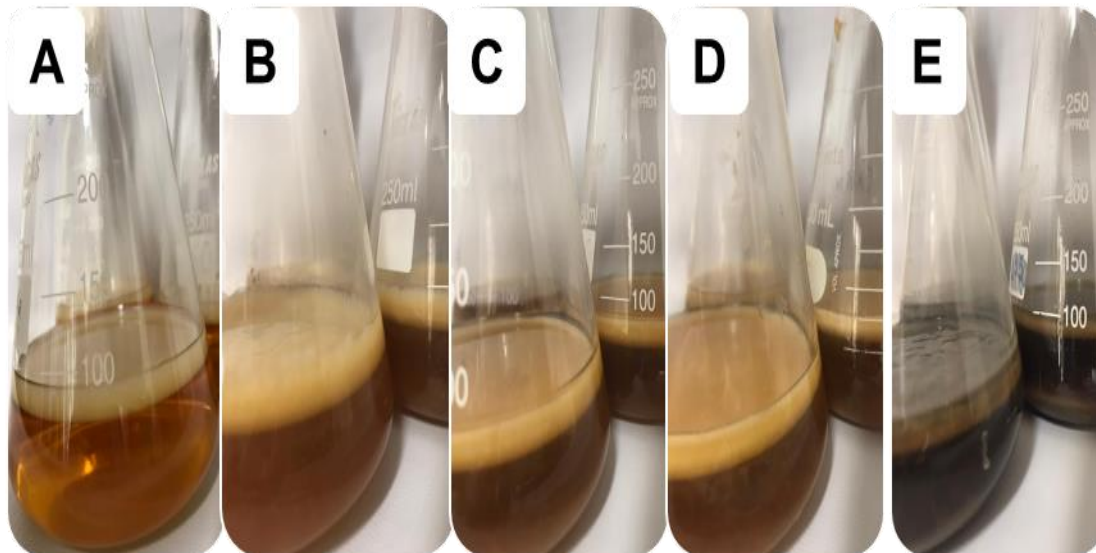
Figura 14 – Etapas para obtenção das CB incorporadas com substrato vinhaça.

A – Inoculação / B – Após 7 dias de inoculação / C – Membranas de CB enriquecidas com diferentes porcentagens de vinhaça



A Figura 15 apresenta as membranas de CB enriquecidas com diferentes porcentagens de substrato vinhaça.

Figura 15 – Membranas de CB enriquecidas com diferentes porcentagens de vinhaça após 7 dias de crescimento. A – CB / B – CBV20 / C – CBV40 / D – CBV60 / E – CBV80



*A – CB (100% Alaban) / B – CBV20 (80% Alaban e 20% vinhaça) / C – CBV40 (60% Alaban e 40% vinhaça) / D – CBV60 (40% Alaban e 60% vinhaça) / E – CBV80 (20% Alaban e 80% vinhaça).

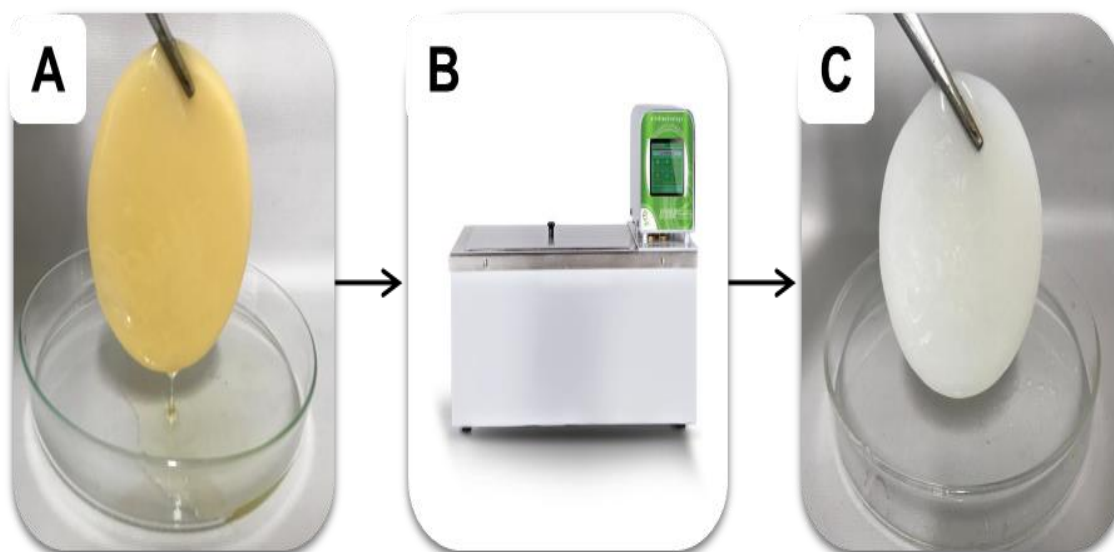
Após o período de cultivo, as membranas formadas na interface ar/meio também foram retiradas dos frascos com auxílio de uma pinça esterilizada e preparadas para o seguinte processo de purificação.

4.7 Purificação e neutralização

Para eliminar quaisquer resquícios de bactéria e garantir a purificação, as membranas de celulose bacteriana foram lavadas com solução NaOH 4 % (m/v) a 60 °C por 1 hora em banho e, posteriormente, lavadas em água destilada sucessivas vezes até a neutralização (CALDEIRA, 2013).

A Figura 16 apresenta as etapas do processo de purificação das membranas de CB.

Figura 16 – Etapas de purificação das CB. A – Membrana de CB antes da purificação / B – Banho – Maria para purificação e neutralização / C – Membrana de CB depois da purificação



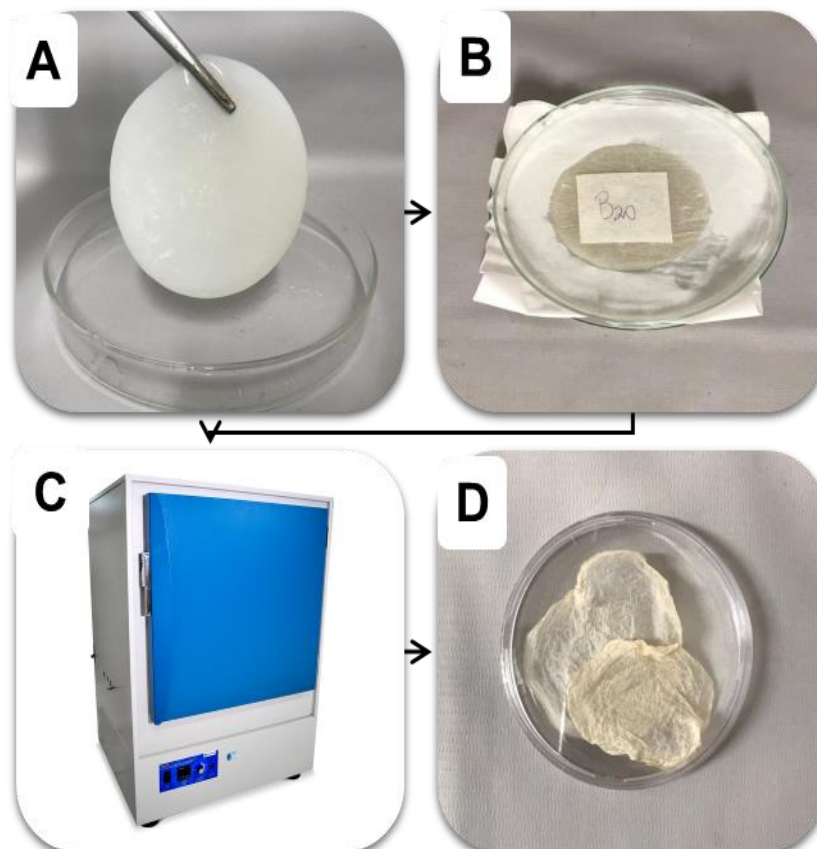
As membranas, depois de purificadas e neutralizadas, foram armazenadas de forma hidratada, em água destilada, em garrafas de vidro, sob refrigeração por um dia para análises futuras e próximas etapas.

4.8 Secagem

A fim de caracterizar as membranas de CB, o processo de secagem ocorreu em estufa, temperatura de 50 ± 2 °C por 10 h. As membranas foram colocadas em placas de petri previamente forradas com papel do tipo manteiga ou papel absorvente e uma outra placa foi colocada por cima, a fim de garantir que as CB secassem esticadas. A cada 1 h, trocou-se as folhas de papel manteiga e/ou papel absorvente, garantindo que as membranas não grudassem.

Depois de secas, as membranas foram transferidas para as placas de petri nomeadas e colocadas em dessecadores para futuras análises. A Figura 17 apresenta as etapas do processo de secagem das membranas de CB.

Figura 17 – Etapas para obtenção das CB secas. A – Membrana de CB purificada e neutralizada / B – Membrana de CB em placa de petri e envolvida em papel manteiga / C – Estufa / D – Membranas de CB secas



4.9 Moagem

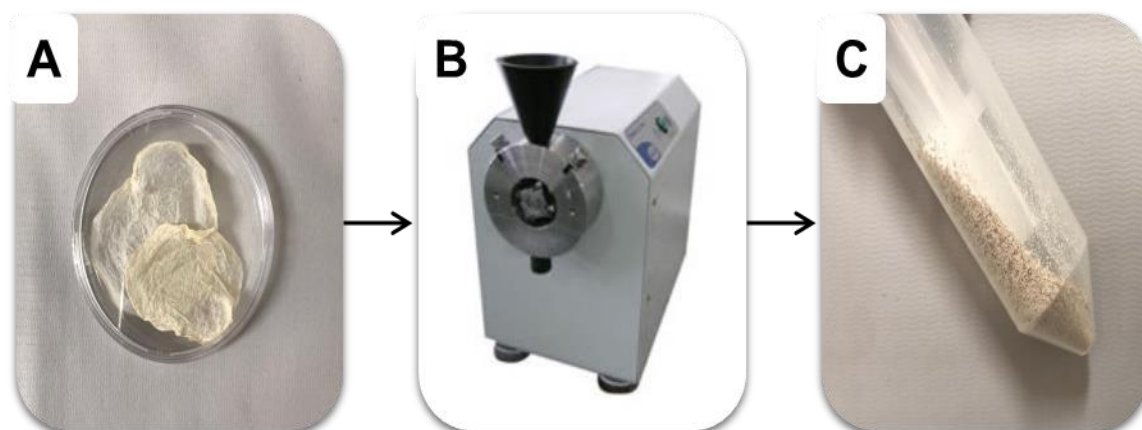
As membranas de celulose bacteriana, já secas, foram moídas em moinho de facas tipo Willey. Para padronização do tamanho das partículas das amostras, primeiramente passaram pela peneira de aço inox de 10 mesh e logo em seguida para a peneira de 20 mesh. As CB em pó foram armazenadas em tubos Falcon para futuras análises de caracterização.

As caracterizações realizadas com as membranas em pó foram:

→ Difração de raios-X (DRX).

→ Espectroscopia na região do infravermelho (IR).

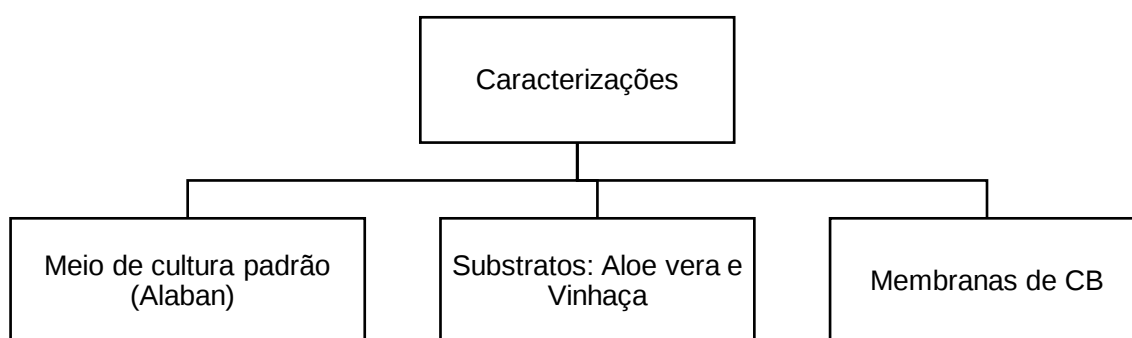
Figura 18 – Etapas para obtenção das CB em pó. A – Membranas de CB secas / B – Moinho de facas do tipo Willey / C – Amostras de CB em pó



4.10 Descrição operacional das caracterizações:

A Figura 19 esquematiza as etapas de caracterizações do meio de cultura padrão Alaban, dos substratos alternativos incorporados ao meio de cultura padrão e das membranas de CB obtidas.

Figura 19 – Fluxograma experimental das etapas de caracterizações



4.10.1 Caracterização do meio de cultura padrão Alaban

4.10.1.1 Curva de crescimento

Para determinar a curva de crescimento da *Gluconacetobacter xylinus* durante 21 dias utilizou-se a densidade ótica (OD) do meio de cultivo. A concentração de

células livres no meio foi medida pela absorbância em um espectrofotômetro na região do UV-visível, com comprimento de onda determinado de 600 nm.

A análise foi realizada em triplicatas durante 21 dias consecutivos e como referência (branco), utilizou-se o meio de cultura sem o inóculo. A curva foi gerada a partir da média das triplicatas e desvio padrão calculado no software Origin®.

4.10.1.2 Quantificação de açúcares redutores

Os açúcares redutores (AR) no decorrer do processo de formação das membranas de CB foram quantificados pelo método do DNS (ácido 3,5 - dinitrosalicílico), pela absorbância em um espectrofotômetro na região do UV-visível, com comprimento de onda determinado de 546 nm (MILLER, 1959).

A análise foi realizada a partir das alíquotas retiradas da amostra da curva de crescimento, e como referência (branco) utilizou-se solução de água destilada e DNS. A curva foi gerada a partir da média das triplicatas no software Origin®.

4.10.2 Caracterização dos substratos vinhaça e *Aloe vera*

4.10.2.1 Caracterização da vinhaça

Cerca de 300 mL de vinhaça utilizados nas incorporações dos meios de cultura para a produção de celulose bacteriana foram necessários para a caracterização no Laboratório de Fertilizantes e Corretivos do Departamento de Solos e Recursos Ambientais FCA/Unesp/Botucatu.

4.10.2.2 Caracterização do solo: *Aloe vera*

O solo foi coletado aleatoriamente de três pontos diferentes, com profundidade de 0 - 20 cm. Para garantir homogeneidade da amostra de solo, o solo coletado foi misturado mecanicamente, e seco em estufa a 40 °C por 3 dias. Em seguida as amostras foram peneiradas com peneira de 24 mesh e armazenadas em sacos de papel para análise, conforme procedimento enviado pelo Departamento de Solos e Recursos Ambientais FCA/Unesp/Botucatu. Estas análises de caracterização do solo foram realizadas no Laboratório de Fertilizantes e Corretivos do Departamento de Solos e Recursos Ambientais.as.

4.10.3 Caracterização das membranas de celulose bacteriana

As membranas de CB utilizadas para a caracterização foram produzidas, lavadas, purificadas e secas.

4.10.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O Microscópio Eletrônico de Varredura SEM 515 da Philips no Laboratório de Microscopia da IB/Unesp/Botucatu foi utilizado para a análise morfológica das amostras de CB.

As amostras de CB foram montadas em “stubs” de tamanho 2 cm x 2 cm, metalizadas com uma fina camada de ouro no aparelho Emitech, modelo K450 e, em seguida, encaminhadas para visualização no microscópio em diferentes aumentos.

4.10.3.2 Propriedades Mecânicas: Teste de tração

Para análise das propriedades mecânicas das membranas de celulose bacteriana, foram realizados testes de tração, no equipamento EMIC, DL3000, do Laboratório de Resíduos Sólidos e Compósitos da FCA/Unesp/Botucatu – RESIDUALL.

Estes ensaios de tração foram realizados seguindo a norma ASTM D882 com adaptações. Para isso, dez corpos de prova secos em estufa de cada fração, mantidos em dessecador, foram cortados em 40 mm de comprimento, 15 mm de largura, e médias da espessura medidas com paquímetro digital em três pontos diferentes. Uma célula de carga de 5000 N (500 Kgf) foi utilizada.

Foram pré-determinadas e padronizadas antes do ensaio no software Tesc a velocidade de 5 mm/min e distância entre garras inicial de 20 mm, medida utilizada como comprimento inicial para cálculo do alongamento percentual.

Posteriormente em planilhas no Excel, foram calculadas as médias de Alongamento (%), Tensão de ruptura (MPa) e o Módulo de elasticidade (MPa), calculado a partir da inclinação da seção inicial reta da curva deformação *versus* tensão obtida no ensaio de tração.

4.10.3.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IR)

As análises das estruturas químicas das amostras de CB foram realizadas utilizando um Espectrômetro PerkinElmer® modelo Spectrum Two, do Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (Nupam) da FCA/Unesp/Botucatu.

A técnica determina as características estruturais das CB, os grupos funcionais e ligações presentes. As amostras foram secas, moídas e armazenadas em tubos Falcon. Para a leitura, foi determinada a faixa de 400 a 4.000 cm^{-1} . Os dados gerados foram tratados no software Origin®.

4.10.3.4 Difratorômetro de Raio – X (DRX)

Para a análise de cristalinidade das membranas de celulose bacteriana, as amostras foram processadas em um difratômetro de raio – X (D2 Phaser) de bancada do laboratório multiusuário do Campus de Londrina da Universidade Tecnológica do Paraná (UTFPR).

As amostras foram secas, moídas e armazenadas em tubos Falcon. A análise foi realizada nas 9 amostras em pó de CB nos parâmetros: Cu-K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), slit 0,2 mm + faquinha (Air Anti – scattering Screen – AAS) de 3 mm. A varredura de cada amostra foi entre 5° e 40° na faixa 2θ e velocidade de varredura de 0,02°/min.

Os dados gerados, foram exportados para planilhas do Excel e os gráficos gerados no software Origin®.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do meio de cultura Alaban

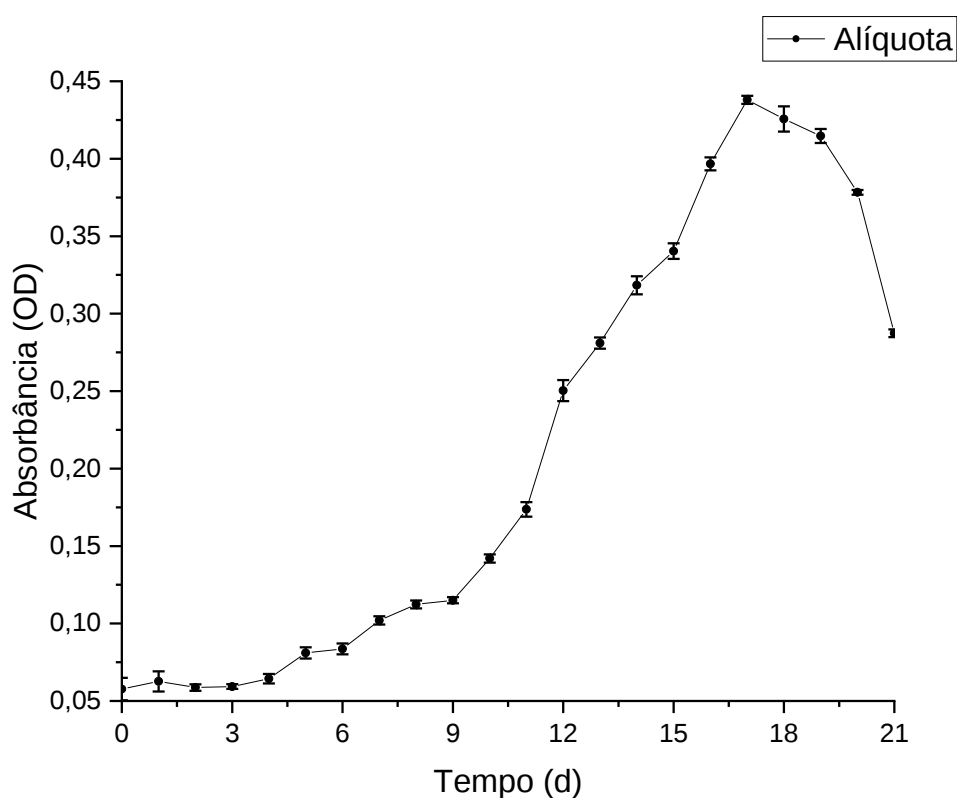
5.1.1 Curva de Crescimento

O crescimento bacteriano pode ser estimado pela absorbância ou densidade óptica (OD). O método considera a presença e o aumento de número de células livres do microrganismo em relação ao branco, ou seja, o quanto de luz é absorvida determina o aumento de células livres.

Para a obtenção da curva de crescimento, foram analisadas triplicatas do meio de cultura Alaban modificado com inóculo e como amostra referência, o meio de cultura Alaban modificado sem inoculação. Para a produção das membranas de CB neste trabalho, foi determinado o tempo de crescimento de 7 dias.

A Figura 20 mostra o crescimento de *Gluconacetobacter xylinus* durante 21 dias.

Figura 20 – Curva de crescimento do inóculo de *Gluconacetobacter xylinus* em meio de cultura Alaban



As condições como fonte de carbono, temperatura, disponibilidade de oxigênio e pH influenciam no crescimento e produtividade do microrganismo. A curva demonstra a atividade bacteriana no decorrer de 21 dias.

O aumento dos valores de absorbância (OD) está relacionado a uma maior turbidez do meio e, conseqüentemente, um aumento da quantidade de bactérias presentes (SIJABAT et al., 2020). O crescimento bacteriano pode ser dividido em quatro fases: fase lag ou de latência, fase log ou exponencial, fase estacionária e fase de declínio (SUSHIL, 2018).

Pode-se observar, entre os dias 0 e 4, a fase lag ou latência, caracterizada pela adaptação ao novo ambiente do microrganismo; no terceiro dia, visualmente observa-se o aparecimento de membrana fina na interface ar – líquida.

Na fase log ou exponencial, correspondente aos dias 5 a 17, ocorre um crescimento rápido e elevado, presença de consumo de substrato e produção de subprodutos.

Entre os dias 17 e 18, denominada fase estacionária, o crescimento microbiano e de subprodutos cessa, a quantidade de nutrientes no substrato é considerada limitante e a taxa de multiplicação da bactéria também diminui.

A partir do dia 19, percebe-se a redução de crescimento, esgotamento de substrato, ou seja, a fonte de carbono disponível no meio de cultivo diminui. Resultando na diminuição de células livres, fase também caracterizada como declínio.

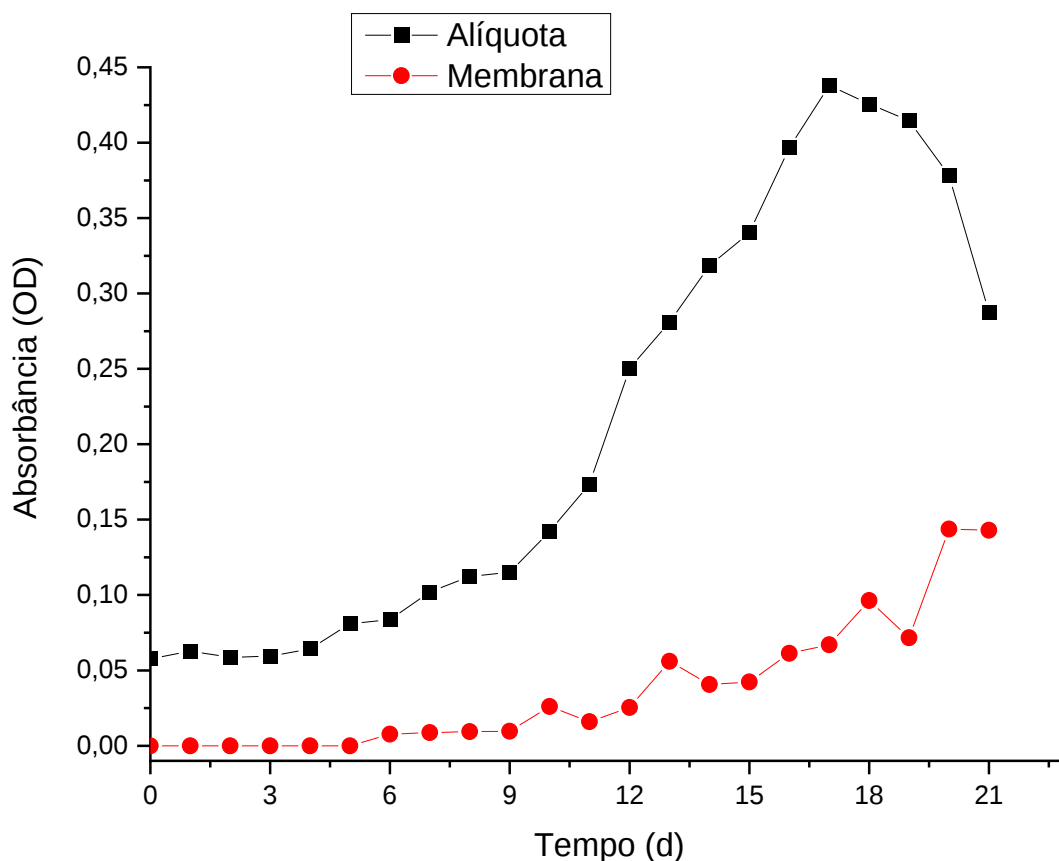
A curva apresenta, entre os dias 6 a 16, o rápido crescimento da bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, gerando subprodutos sem que ocorra morte do microrganismo, mostrando também a flexibilidade de produzir membranas de CB não somente nos 7 dias iniciais.

O gráfico demonstra também entre os dias 13 a 15, que o microrganismo continua em fase de crescimento e conseqüentemente produzindo celulose bacteriana. Podendo assim, estender o período de incubação de 7 dias para 14 dias e obtê-las mais espessas. Esta diferença do período de incubação vai depender da finalidade a que se destinará as CB.

Na literatura, encontra-se inoculação de microrganismo de duas formas: por corte de membranas de CB e inoculação por alíquota.

A Figura 21 apresenta a comparação do crescimento bacteriano quando inoculada com 10 % da alíquota e quando inoculada com um corte da membrana de CB 2 cm x 2 cm.

Figura 21 – Curva de crescimento de inóculo de *Gluconacetobacter xylinus* em relação ao corte de uma membrana 2 cm x 2 cm de CB



Comparando o crescimento da bactéria quando inoculada com 10 % da alíquota e quando inoculada com um corte da membrana de CB 2 cm x 2 cm, é notória a diferença do crescimento bacteriano quando nas mesmas condições de fonte de carbono, disponibilidade de oxigênio, temperatura e pH.

A fase lag, entre os dias 0 e 10, na inoculação por cortes de membrana, estende-se por um maior tempo em relação à inoculação por alíquota, ou seja, as células livres, ainda aderidas ao corte de CB e a ambientação ao novo substrato levaram um período maior quando comparadas às células livres na alíquota. Consequentemente, as demais fases iniciaram tardiamente.

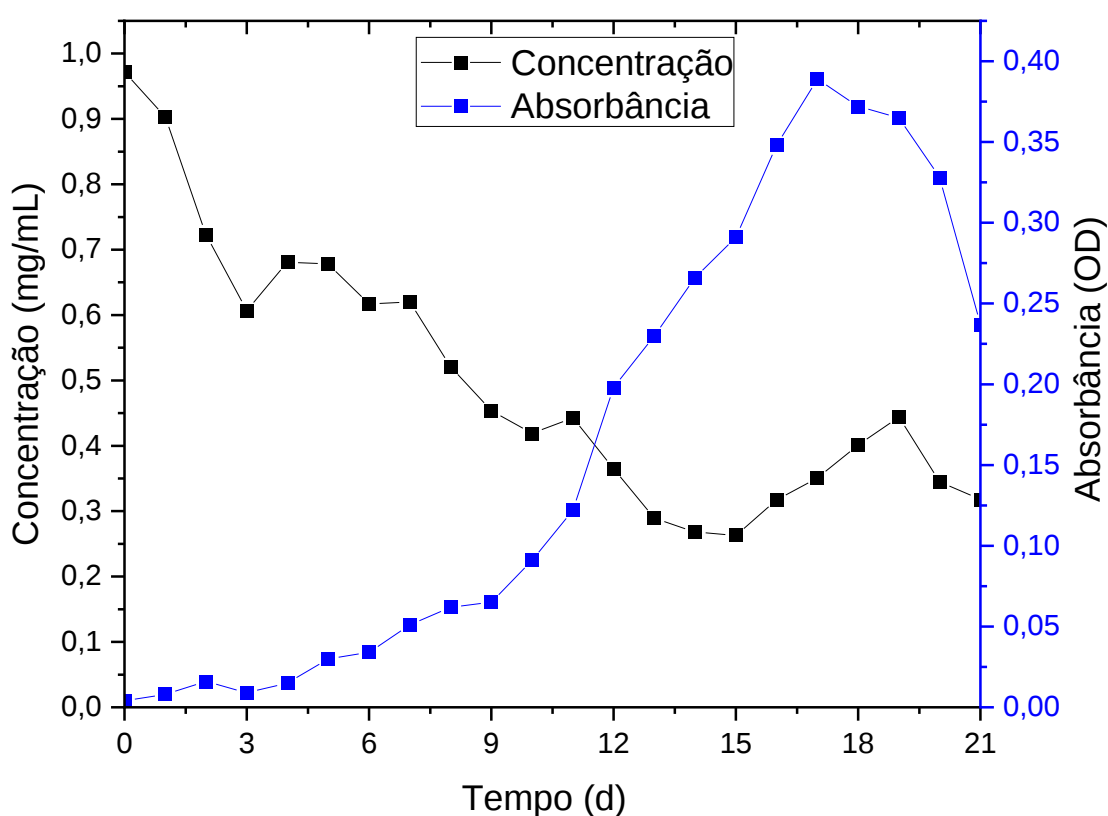
Pode-se concluir que, para os meios de cultura para produção de CB, com diferentes incorporações de fontes de carbono, a inoculação por corte de membrana

2 cm x 2 cm possibilita que o microrganismo tenha uma faixa de maior adaptação até liberação de células livres ao meio e produção de novo subproduto.

5.1.2 Quantificação de açúcares redutores

A partir da curva padrão de glicose, em apêndice A, já adotada pelo laboratório RESIDUALL, foram gerados os dados da curva de consumo de açúcares redutores (AR).

Figura 22 – Curva de consumo de açúcares em meio de cultura Alaban em relação à curva de crescimento com o inóculo



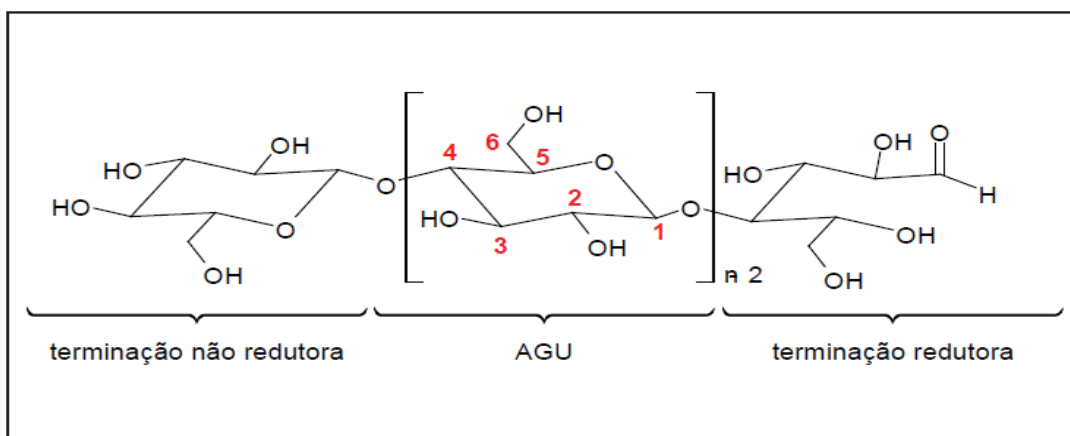
A quantificação pelo método de Miller 1959 demonstra o comportamento da bactéria quando inserida ao substrato rico em fonte de carbono.

O gráfico, de característica inversamente proporcional, no decorrer dos 21 dias, apresenta o crescimento da bactéria, consequente produção de membranas de CB e a queda dos açúcares, confirmando o consumo das fontes de carbonos presentes nos substratos no decorrer do tempo.

Entre os dias 16 e 19, podemos identificar um aumento na concentração de possíveis outros açúcares, que pode ser resultado da presença do subproduto, a celulose.

A cadeia da celulose possui uma terminação redutora e não-redutora. A terminação redutora, com um grupamento OH, em equilíbrio com a estrutura de um aldeído ou álcool, explica o aumento significativo nos dias finais da leitura dos AR (CLARO, 2017). Portanto, fica evidente que a *Gluconacetobacter xylinus* utiliza das fontes disponíveis no meio para produzir celulose.

Figura 23 – Estrutura molecular da celulose: terminação redutora e não – redutora



Fonte: CLARO, 2017.

O dissacarídeo, sacarose, é um açúcar não redutor, quando hidrolisado resulta na formação de um grupo funcional aldeídico de uma molécula de glicose e o grupo funcional cetônico de uma molécula de frutose, tipo de “açúcar invertido” (DEMIATE et al., 2002). O que explicaria os altos níveis de concentração (mg/mL) no início do gráfico, uma vez que o meio quando autoclavado, poderia ocasionar a quebra da sacarose em glicose + frutose, detectando logo no dia 0 e 1 da análise.

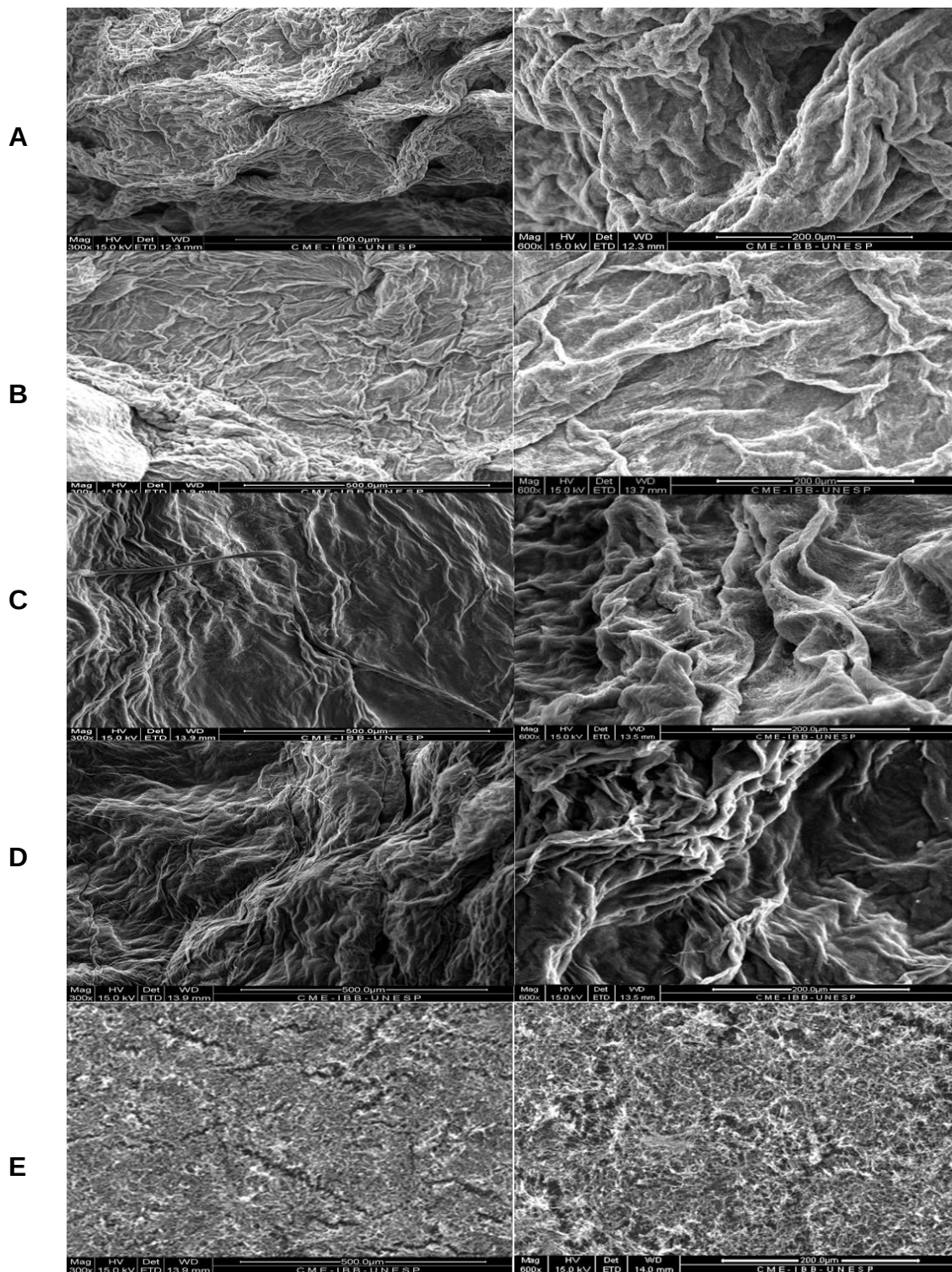
5.2 Caracterização das membranas de celulose bacteriana

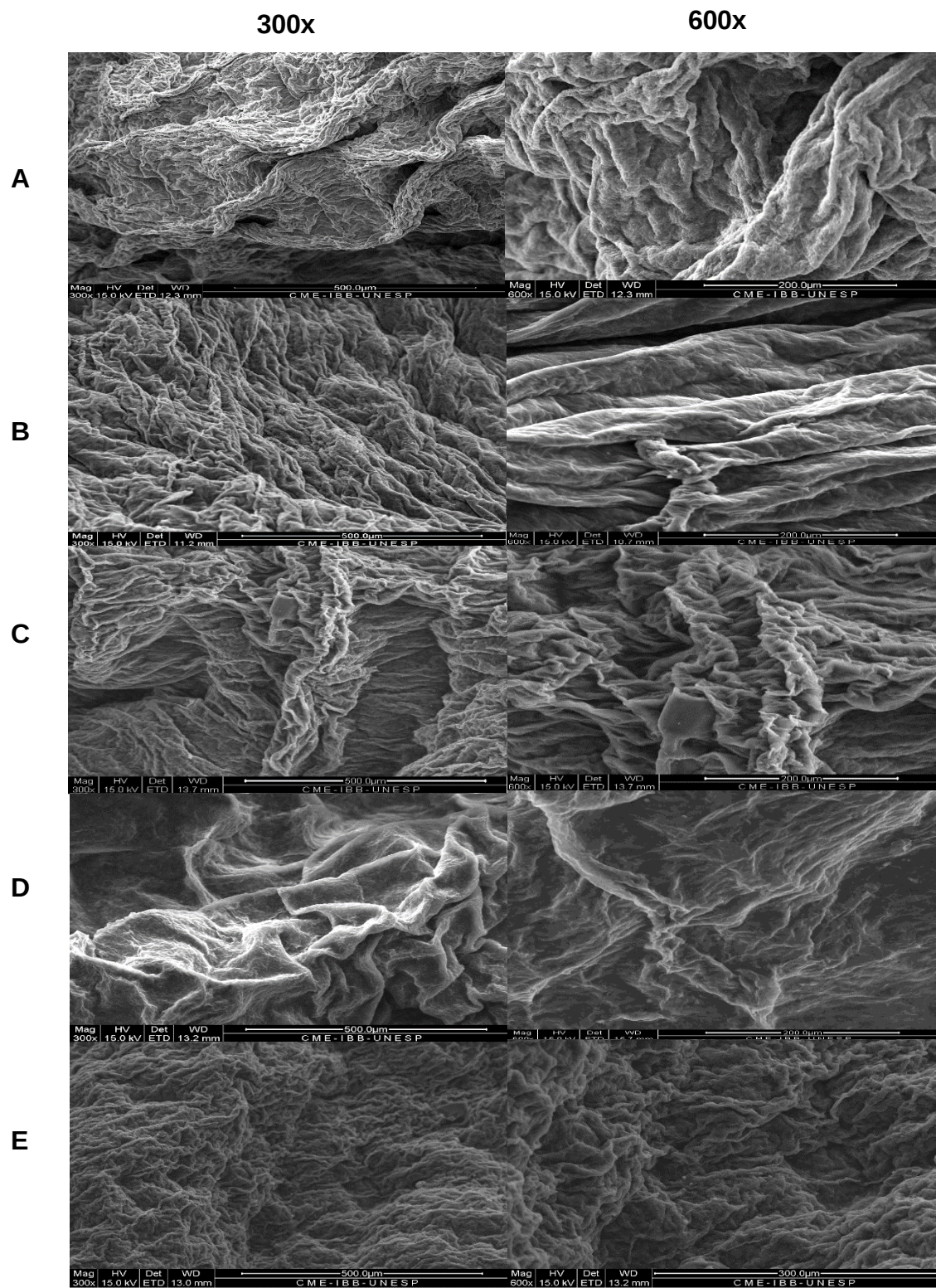
Todas as análises foram realizadas em comparação com membranas de celulose bacteriana controle. As CB foram caracterizadas através das propriedades morfológicas, químicas e mecânicas.

5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura examinou a morfologia da rede das CB úmidas produzidas. Foram visualizadas em aumentos de 300 x e 600 x conforme apresentadas nas figuras 24 e 25.

300x **600x**





Observam-se na Figura 24 diferenças morfológicas nas densidades das fibras das membranas de celulose bacteriana, conforme o enriquecimento do substrato de *Aloe vera* nos meios de cultura.

Nas micrografias A, B, C e D, as estruturas morfológicas das nanofibras são organizadas, entrelaçadas entre si e apresentadas sem padrão nas disposições. Há regiões com aglomerados maiores de fibras (D) e regiões com fibras mais dispersas (B).

Na amostra CBB80 (E), nota-se a presença de gel por toda a superfície, tornando-a menos uniforme, quando comparada aos outros enriquecimentos. Segundo Saibuatong e Phisalaphong, (2010), em condições de CB hidratadas, a presença de gel em toda a superfície da membrana de CB reduz a densidade da rede de nanofibrilas, o que explica as micrografias das membranas de celulose bacteriana CBB80 (E).

Nas micrografias da Figura 25, obtidas das incorporações de vinhaça ao meio de cultura e tempo de incubação de 7 dias, observa-se alta densidade das nanofibras. Uma rede interligada, sobreposta e agregada sem qualquer orientação específica, aproximando-se das membranas cultivadas em meio Alaban – CB (A). Se comparados os diferentes enriquecimentos de vinhaça (B, C, D e E) em relação à membrana controle (A), morfolologicamente, as CB produzidas à base de cana-de-açúcar possuem uma rede de fibrilas mais densas.

Sabendo que o meio deve conter, no mínimo, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, e outros macro e micronutrientes necessários para o crescimento do microrganismo, tais como sais de fósforo, enxofre, potássio e magnésio (CHAWLA et al., 2009; JOZALA et al., 2016; MOHAMMADKAZEMI; AZIN; ASHORI, 2015) a vinhaça apresentou potencial como meio de cultura alternativo para a produção de CB.

As micrografias tanto das CB enriquecidas com *Aloe vera*, como das CB enriquecidas com vinhaça, também evidenciaram a ausência de contaminantes, podendo ser a presença de outros microrganismos ou até mesmo a própria bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, demonstrando a eficácia do processo de purificação (NaOH 4 %) e neutralização das membranas antes do armazenamento para futuras análises.

5.2.2 Propriedades Mecânicas: Teste de tração

A umidade relativa das membranas de CB foi pré-estabelecida entre $85 \pm 10\%$, mesmo depois de secas, seguindo a ASTM D882 adaptada. As CB foram cortadas nas medidas determinadas e separadas em placas de petri. Após realizar as medidas dimensionais e inseri-las no software, fixou-se a amostra nas garras do equipamento com o auxílio de lixas P220. Utilizou-se lixas para garantir a fixação e o não escorregamento das CB durante o ensaio. Para cada incorporação foram realizadas dez repetições de ensaios de tração, garantindo um valor médio representativo e os desvios padrão (DP) das propriedades de interesse. A Figura 26 é uma imagem da amostra de CB fixa na garra do equipamento com auxílio das lixas, representativa para todas as incorporações.

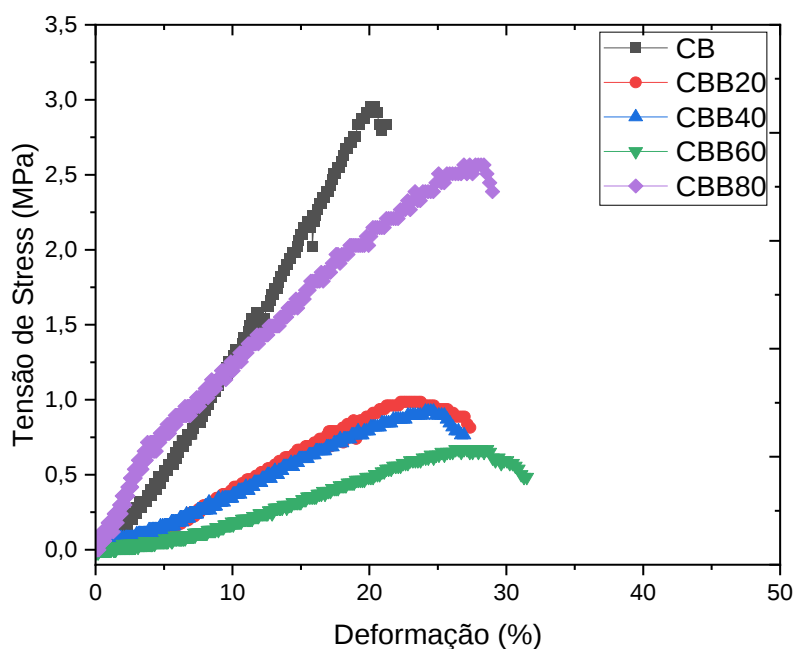
Figura 26 – Amostra de CB fixada na garra com auxílio das lixas P220



A curva de comportamento das membranas de CB obtidas a partir do enriquecimento do meio de cultura padrão Alaban modificado com substratos de *Aloe vera* e vinhaça são demonstradas nas figuras 27 e 28.

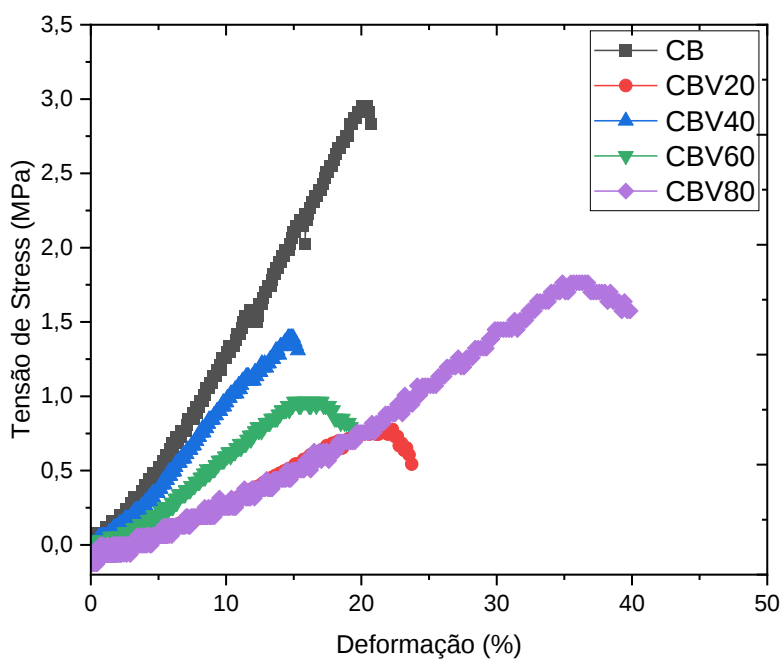
As figuras 27 e 28 representam a curva de comportamento das membranas de CB enriquecidas com substrato *Aloe vera* e vinhaça. Em ambos os enriquecimentos, CBB80 (80 mL *Aloe vera* e 20 mL meio de cultura) como o CBV80 (80 mL vinhaça e 20 mL meio de cultura), apresentaram um valor para tensão máxima (MPa) alto, se comparados com o desempenho das demais incorporações.

Figura 27 – Curva de comportamento das membranas de celulose bacteriana a partir do meio de cultura enriquecido com *Aloe vera*



*A – CB (100% Alaban) / B – CBB20 (80% Alaban e 20% *Aloe vera*) / C – CBB40 (60% Alaban e 40% *Aloe vera*) / D – CBB60 (40% Alaban e 60% *Aloe vera*) / E – CBB80 (20% Alaban e 80% *Aloe vera*).

Figura 28 – Curva de comportamento das membranas de celulose bacteriana a partir do meio de cultura enriquecido com vinhaça



*A – CB (100% Alaban) / B – CBV20 (80% Alaban e 20% vinhaça) / C – CBV40 (60% Alaban e 40% vinhaça) / D – CBV60 (40% Alaban e 60% vinhaça) / E – CBV80 (20% Alaban e 80% vinhaça).

As Tabelas 6 e 7 mostram os resultados obtidos do ensaio de tração em meios de cultura padrão Alaban enriquecidos com substrato *Aloe vera* e substrato vinhaça.

Tabela 6 – Propriedades mecânicas das membranas de CB obtidas a partir da incorporação de substrato *Aloe vera* no meio de cultura padrão Alaban

CB	Módulo de Elasticidade (MPa)	Tensão Máxima (MPa)	Alongamento (%)	Espessura (mm)
CB	13,05 ± 5,69	2,32 ± 1,23	33,7 ± 9,02	0,66 ± 0,13
CBB20	5,95 ± 2,10	0,91 ± 0,24	35,1 ± 8,21	0,57 ± 0,14
CBB40	4,87 ± 1,02	0,91 ± 0,05	34,4 ± 6,55	0,45 ± 0,02
CBB60	3,41 ± 0,59	0,91 ± 0,26	45,7 ± 705	0,50 ± 0,06
CBB80	10,83 ± 7,27	1,91 ± 0,58	36,5 ± 12,39	0,20 ± 0,01

*A – CB (100% Alaban) / B – CBB20 (80% Alaban e 20% *Aloe vera*) / C – CBB40 (60% Alaban e 40% *Aloe vera*) / D – CBB60 (40% Alaban e 60% *Aloe vera*) / E – CBB80 (20% Alaban e 80% *Aloe vera*).

Tabela 7 – Propriedades mecânicas das membranas de CB obtidas a partir da incorporação de substrato vinhaça no meio de cultura padrão Alaban

CB	Módulo de Elasticidade (MPa)	Tensão Máxima (MPa)	Alongamento (%)	Espessura (mm)
CB	13,05 ± 5,69	2,32 ± 1,23	33,7 ± 9,02	0,66 ± 0,13
CBV20	5,98 ± 1,38	0,78 ± 0,15	36,9 ± 4,62	0,65 ± 0,06
CBV40	13,42 ± 2,26	1,61 ± 0,22	28,9 ± 6,23	0,37 ± 0,05
CBV60	10,15 ± 4,42	1,12 ± 0,42	33,4 ± 7,17	0,35 ± 0,05
CBV80	6,79 ± 1,96	1,76 ± 0,56	47,9 ± 9,05	0,19 ± 0,02

*A – CB (100% Alaban) / B – CBV20 (80% Alaban e 20% vinhaça) / C – CBV40 (60% Alaban e 40% vinhaça) / D – CBV60 (40% Alaban e 60% vinhaça) / E – CBV80 (20% Alaban e 80% vinhaça).

Os valores das propriedades mecânicas estão relacionados com a quantidade de água presente nas membranas de CB. A tensão pode ser afetada em relação à espessura das amostras, devido às ligações inter e intramoleculares na membrana e a orientação das fibrilas.

As CB úmidas, em geral, possuem valores de módulo de elasticidade em torno de $1,5 \pm 0,3$ MPa e alongamento de $49,0 \pm 3,6$ %. Para as CB secas, o valor do módulo de elasticidade chega a $428,0 \pm 24,1$ MPa e um alongamento reduzido a $7,5 \pm 0,4$ % (POGORELOVA et al., 2020).

As diferentes incorporações com o substrato *Aloe vera* apresentaram variações da tensão máxima de 0,91 a 2,32 MPa, de alongamento de 33,7 a 45,7% e de módulo de elasticidade de 3,41 a 13,05 MPa. Quando comparada com a CB controle, a CBB80 apresentou maiores valores de módulo de elasticidade, tensão máxima e alongamento.

Os diferentes enriquecimentos com o substrato vinhaça apresentaram variações da tensão máxima de 0,78 a 1,76 MPa, de alongamento de 28,9 a 47,9% e do módulo de elasticidade de 5,98 a 13,42 MPa. Quando comparada com a CB controle, a CBV40 apresentou maior módulo de elasticidade e a CBV80 maiores valores de alongamento (%) e tensão máxima (MPa).

Com a adição do gel de *Aloe vera* 80 % ao meio de cultura, a CBB80 produzida gerou valores muito semelhantes aos valores das membranas CB (controle), enquanto a CBV40, produzida a partir da vinhaça, apresenta valores semelhantes aos da CB.

Os valores baixos das propriedades mecânicas podem ser atribuídos ao tratamento alcalino (NaOH), onde a base causa um rearranjo das fibras de celulose, ou seja, a quebra das ligações intermoleculares, devido ao intumescimento, causando assim a ordenação das fibras (COLLA, 2014). As membranas de CB não tratadas com NaOH possuem os valores das propriedades mecânicas mais elevados (RECOUVREUX, 2008).

O índice de cristalinidade também é um fator que influencia nas propriedades mecânicas das CB. A presença de celulose do tipo II pode estar relacionada a uma menor resistência à tração (CLARO 2017). A fonte de carbono também pode influenciar as propriedades mecânicas das membranas de CB, embora não afete a estrutura química (MOHD NADZIR et al., 2021).

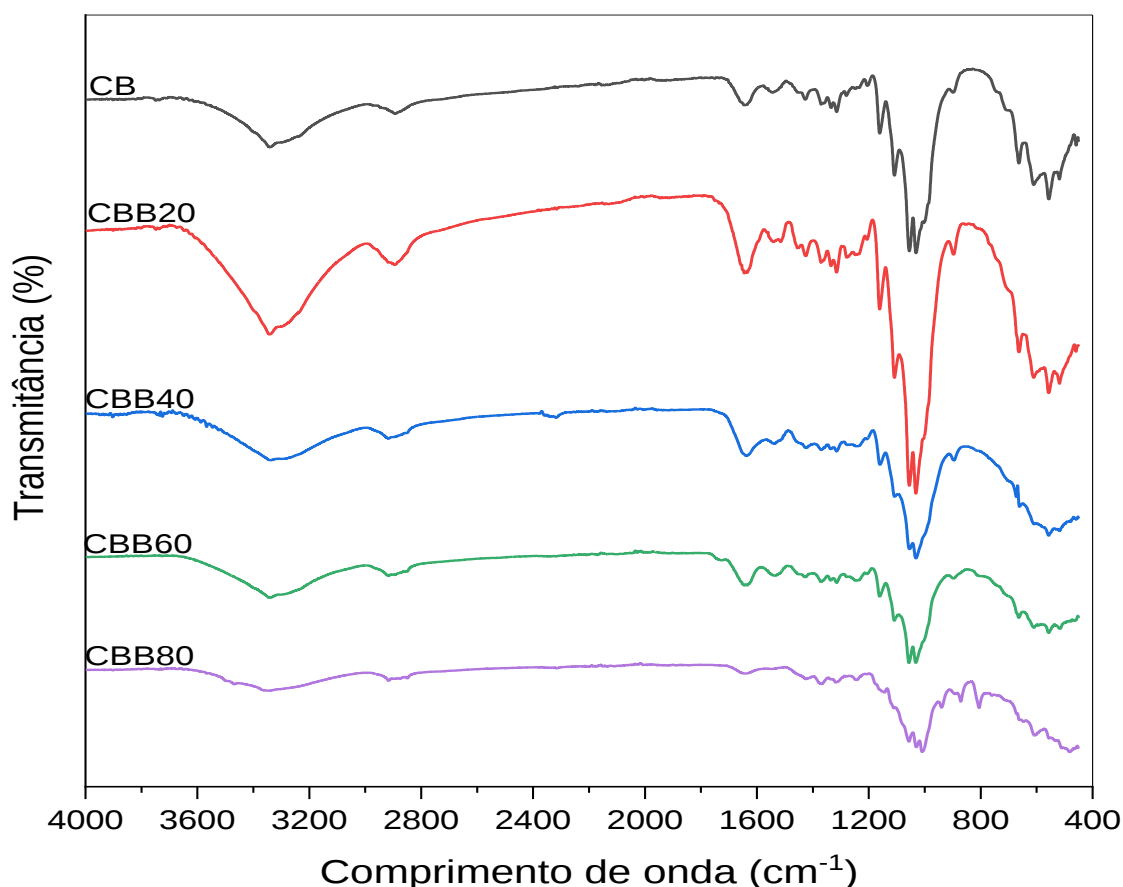
Portanto, os fatores citados acima, combinados entre si ou isolados, podem contribuir e/ou explicar a redução das propriedades mecânicas das membranas de CB incorporadas com *Aloe vera* e vinhaça.

5.2.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IR)

As espectroscopias de infravermelho (IR) foram realizadas a fim de identificar a ocorrência de novas bandas, ou qualquer mudança que pudesse ser relacionada às interações entre a celulose bacteriana e o meio de cultura enriquecido com o substrato *Aloe vera* e a celulose bacteriana e o meio de cultura enriquecido com o substrato vinhaça.

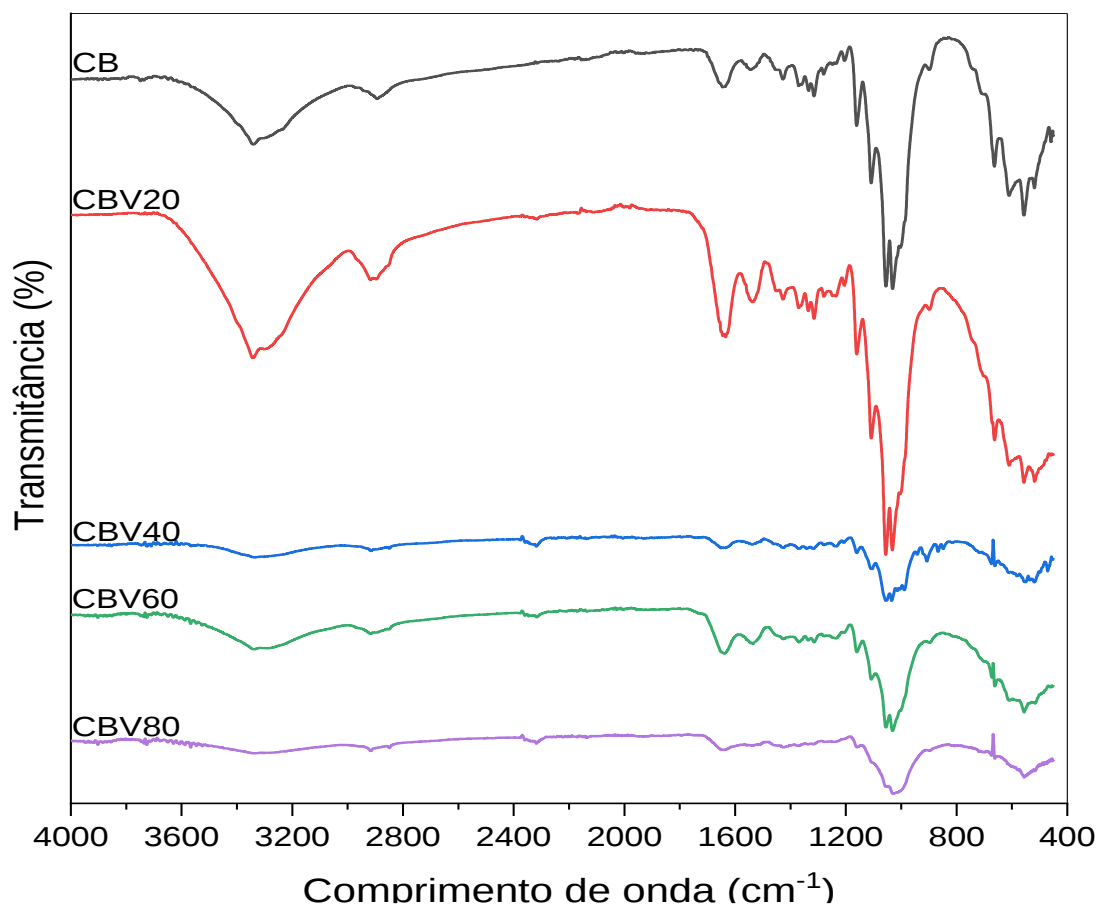
Os espectros de IR das membranas de CB obtidas por meio do enriquecimento do meio de cultura Alaban com os substratos *Aloe vera* e vinhaça são apresentados nas Figuras 29 e 30.

Figura 29 – Espectros de IR de CB obtidos das incorporações com substrato *Aloe vera*



*A – CB (100% Alaban) / B – CBB20 (80% Alaban e 20% *Aloe vera*) / C – CBB40 (60% Alaban e 40% *Aloe vera*) / D – CBB60 (40% Alaban e 60% *Aloe vera*) / E – CBB80 (20% Alaban e 80% *Aloe vera*).

Figura 30 – Espectros de IR de CB obtidos das incorporações com substrato vinhaça



*A – CB (100% Alaban) / B – CBV20 (80% Alaban e 20% vinhaça) / C – CBV40 (60% Alaban e 40% vinhaça) / D – CBV60 (40% Alaban e 60% vinhaça) / E – CBV80 (20% Alaban e 80% vinhaça).

Conforme aumenta a diluição dos componentes, em relação ao meio, percebe-se que algumas bandas específicas ainda estão presentes, mesmo que menos acentuadas e outras bandas de absorção aparecem.

Em relação ao espectro dos enriquecimentos com *Aloe vera*, a banda na região de comprimento de onda entre 3352 – 3246 cm^{-1} , em CB, CBB20, CBB40, CBB60 e CBB80, está relacionada à vibração de alongamento de grupos de hidroxila (OH) e é característica de celulose do tipo I (REVIN et al., 2020). A banda em 2894 cm^{-1} , presente na CBB20, corresponde à vibração de alongamento assimétrico da ponte de metileno ($-\text{CH}_2$) presente em celuloses (REVIN et al., 2020). A banda 1538 cm^{-1} , na incorporação CBB20 e CBB40, pode ser atribuído aos grupos amino, demonstrando uma notável interação da CB com o gel de *Aloe vera* (SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010).

A banda entre $1625 - 1645 \text{ cm}^{-1}$ é relacionada ao estiramento da ligação O-H, referente à água absorvida pela membrana (ANDRITSOU et al., 2018; GASC et al., 2018). A banda em 1315 cm^{-1} presente na CB, CBB20 e CBB40 e CBB60, sugere regiões cristalinas, ou seja, regiões características de membranas de formação bacteriana, uma vez que a cristalinidade é um dos fatores imprescindíveis na caracterização das amostras de CB, mesmo que existam regiões não cristalinas numa mesma CB (ZHONG, 2020).

As bandas 1055 e 1161 cm^{-1} estão relacionadas à vibração de deformação C-O-C e anel C-C (HE et al., 2020). As bandas em $1160 - 1161 \text{ cm}^{-1}$ são atribuídos os alongamentos assimétricos C-O-C (ANDRITSOU et al., 2018). A absorção em 1036 cm^{-1} pode estar associada às vibrações de alongamento ao C-OH de carboidratos e alongamento de SO (HE et al., 2020). A presença das bandas na faixa de 1200 a 1000 cm^{-1} é característica de álcoois primários (C6) e secundários (C2 e C3) (POGORELOVA et al., 2020).

Já em relação ao espectro dos enriquecimentos com vinhaça, a região do espectro entre $3352 - 3246 \text{ cm}^{-1}$ representa a vibração de alongamento de grupos de hidroxila (OH), característicos de celulose do tipo I (REVIN et al., 2020). A banda em 2917 cm^{-1} , presente em todas as amostras, corresponde ao alongamento simétrico e antissimétrico dos grupos funcionais CH de CH_2 e CH_3 , presente apenas na CBV20 (PACHECO et al., 2018). A banda em 1645 cm^{-1} e 1637 cm^{-1} , presente em todas as incorporações com vinhaça, está relacionado ao estiramento H-O-H de água absorvida (SALARI et al., 2019).

A banda em 1315 cm^{-1} presente na CB e CBV20 sugere regiões cristalinas na membrana, uma vez que a cristalinidade é um dos fatores imprescindíveis na caracterização das amostras de CB, mesmo que existam regiões não cristalinas numa mesma CB (HE et al., 2020; ZHONG, 2020). As bandas 1055 e $1161 - 60 \text{ cm}^{-1}$ estão relacionadas à vibração de deformação C-O-C e anel C-C, presentes na CB e na CBV20 (HE et al., 2020).

Na região $1200 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ correspondem as vibrações de alongamento de ligações C-O-C e C - C de pontes glicosídicas, identificadas em todas as amostras (ANDRITSOU et al., 2018). Não foram identificados bandas entre 710 e 750 cm^{-1} , característico de celulose I β e celulose I α (POGORELOVA et al., 2020).

Há fatores que podem contribuir para a modificação da membrana, como o tempo de fermentação, a fonte de carbono disponível, os processos de purificação e secagem. Essas modificações acarretam mudanças nas ligações químicas e nas características estruturais das membranas de CB (ANDRITSOU et al., 2018).

Segundo (STANISŁAWSKA; STAROSZCZYK; SZKODO, 2020) os espectros de IR das CB podem também variar em relação à cepa aplicada, à posição e à intensidade das bandas.

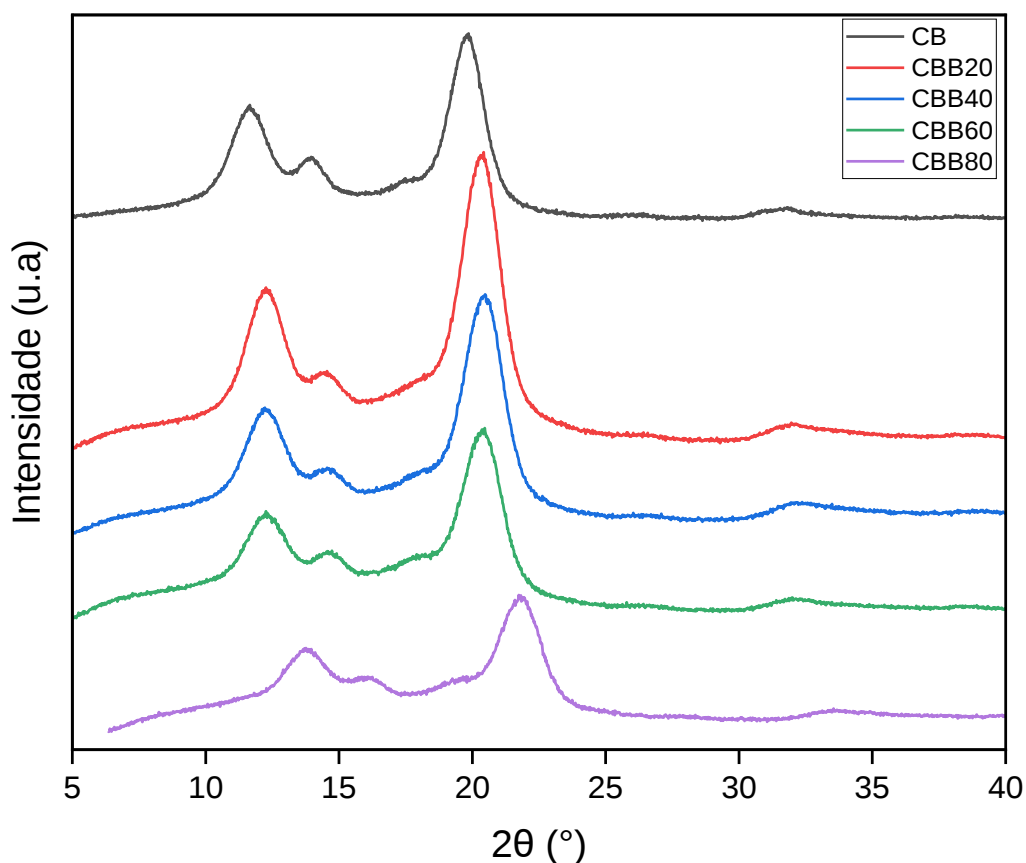
Os espectros de IR mostraram que as diferentes incorporações, tanto de vinhaça como de *Aloe vera*, apresentaram semelhanças entre si, com mudanças em relação ao tamanho e intensidade dos espectros, principalmente na presença das bandas relacionadas à celulose do tipo I, características de CB (GÜZEL; AKPINAR, 2020).

5.2.4 Difratômetro de Raio – X (DRX)

A técnica por Difratômetro de Raio – X (DRX), resulta da interação entre as ondas de radiação eletromagnética (raio – X) com os elétrons dos átomos das membranas de CB, identificando assim, a cristalinidade da amostra.

As figuras 31 e 32 apresentam os difratogramas obtidos das membranas de CB enriquecidas com os substratos *Aloe vera* e vinhaça.

Figura 31 – Difratomogramas de DRX de CB obtidos a partir das incorporações com substrato *Aloe vera*



*A – CB (100% Alaban) / B – CBB20 (80% Alaban e 20% *Aloe vera*) / C – CBB40 (60% Alaban e 40% *Aloe vera*) / D – CBB60 (40% Alaban e 60% *Aloe vera*) / E – CBB80 (20% Alaban e 80% *Aloe vera*).

A celulose I é uma mistura de duas formas cristalinas, a I α e a I β . A celulose I α (triclínica), é predominante em algas e bactérias e celulose I β (monoclínica), característico da celulose vegetal, encontrados em plantas e tunicados. A celulose I, pode ser convertida em celulose II e III. A celulose II, material polimorfo da indústria, é considerada a forma mais estável. A diferença entre a celulose I e II está na orientação atômica, a direção no sentido paralelo da celulose I é oposto ao da celulose II (SOUZA et al., 2020a).

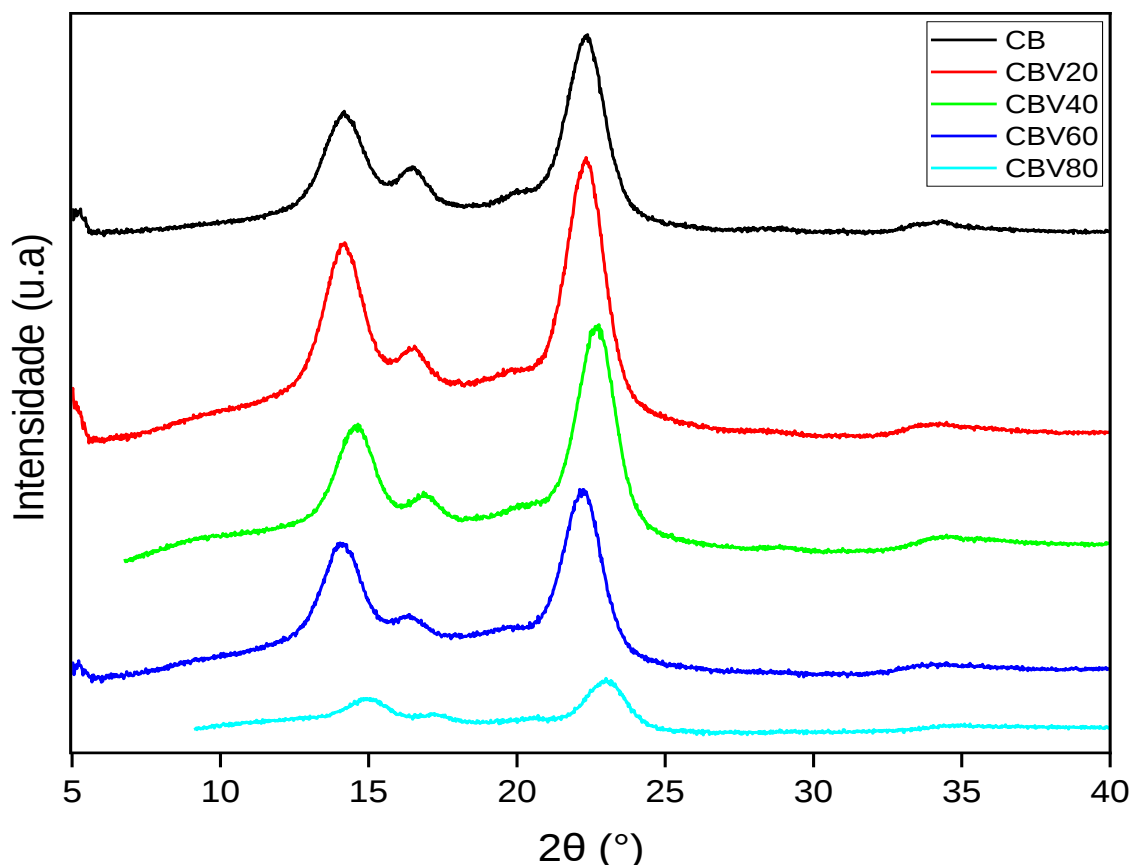
A figura 31 apresenta os difratogramas das membranas de CB obtidas a partir do enriquecimento com a *Aloe vera*, os padrões de DRX de todas as amostras, apresentaram difratogramas em picos diferentes como $2\theta \cong 12^\circ$, 14° , 16° , 20° e 22° característicos de celulose I e II (BARSHAN et al., 2019; THORAT; DASTAGER, 2018).

Em todas as amostras CB, CBB20, CBB40, CBB60 e CBB80, foram identificados, no segundo pico, região do ângulo $2\theta \cong 14$, celulose I. Nas amostras enriquecidas com substrato *Aloe vera*, a CBB20, CBB40 e CBB60 apresentaram picos predominantemente na região de $12,2^\circ$ e $20,5^\circ$. O pico no ângulo $2\theta \cong 12^\circ$ e 20° são característicos de celulose II, apresentando arranjo antiparalelo (THORAT; DASTAGER, 2018).

A celulose II, pode ser obtida a partir da celulose I quando expostas a tratamento alcalino (NaOH), método conhecido como mercerização. O reagente adentra na estrutura da celulose, desfazendo as ligações intermoleculares (LENGOWSKI et al., 2013; SOUZA et al., 2020b). Não foram encontrados no enriquecimento de meio de cultura com substrato vinhaça estes picos (ALEMAM et al., 2021).

Para o processo de formação de CB em meios enriquecidos com *Aloe vera*, uma planta medicinal, o fato de a conformação da celulose bacteriana possuir características de celulose II (presentes em plantas) pode ser devido ao processo de purificação e neutralização que as CB's são sujeitas, a fim de eliminar contaminantes e microrganismos. Na amostra CBB80, foram encontrados picos na região $13,8^\circ$, 16° e $21,9^\circ$, picos característicos de celulose I.

Figura 32 – Difratomogramas de DRX de CB obtidos a partir das incorporações com substrato vinhaça



*A – CB (100% Alaban) / B – CBV20 (80% Alaban e 20% vinhaça) / C – CBV40 (60% Alaban e 40% vinhaça) / D – CBV60 (40% Alaban e 60% vinhaça) / E – CBV80 (20% Alaban e 80% vinhaça).

A celulose I é uma mistura de duas formas cristalinas, a Ia e a Ib. A celulose Ia (triclínica), é predominante em algas e bactérias e celulose Ib (monoclínica), característico da celulose vegetal, encontrados em plantas e tunicados. A celulose I, pode ser convertida em celulose II e III. A celulose II, material polimorfo da indústria, é considerada a forma mais estável. A diferença entre a celulose I e II está na orientação atômica, a direção no sentido paralelo da celulose I é oposto ao da celulose II (SOUZA et al., 2020a).

A figura 31 apresenta os difratogramas das membranas de CB obtidas a partir do enriquecimento com a *Aloe vera*, os padrões de DRX de todas as amostras, apresentaram difratogramas em picos diferentes como $2\theta \cong 12^\circ$, 14° , 16° , 20° e 22° característicos de celulose I e II (BARSHAN et al., 2019; THORAT; DASTAGER, 2018).

Em todas as amostras CB, CBB20, CBB40, CBB60 e CBB80, foram identificados, no segundo pico, região do ângulo $2\theta \cong 14$, celulose I. Nas amostras enriquecidas com substrato *Aloe vera*, a CBB20, CBB40 e CBB60 apresentaram picos predominantemente na região de $12,2^\circ$ e $20,5^\circ$. O pico no ângulo $2\theta \cong 12^\circ$ e 20° são característicos de celulose II, apresentando arranjo antiparalelo (THORAT; DASTAGER, 2018).

A celulose II, pode ser obtida a partir da celulose I quando expostas a tratamento alcalino (NaOH), método conhecido como mercerização. O reagente adentra na estrutura da celulose, desfazendo as ligações intermoleculares (LENGOWSKI et al., 2013; SOUZA et al., 2020b). Não foram encontrados no enriquecimento de meio de cultura com substrato vinhaça estes picos (ALEMAM et al., 2021).

Para o processo de formação de CB em meios enriquecidos com *Aloe vera*, uma planta medicinal, o fato de a conformação da celulose bacteriana possuir características de celulose II (presentes em plantas) pode ser devido ao processo de purificação e neutralização que as CB's são sujeitas, a fim de eliminar contaminantes e microrganismos.

Na amostra CBB80, foram encontrados picos na região $13,8^\circ$, 16° e $21,9^\circ$, picos característicos de celulose I.

Na figura 32, é apresentado os difratogramas das membranas de CB a partir do enriquecimento com substrato vinhaça, os padrões de DRX de todas as amostras apresentaram três picos nos ângulos $2\theta \cong 14^\circ$, 16° e 22° que são característicos de celulose I, apresentando arranjo paralelo (BARSHAN et al., 2019; GHOZALI; MELIANA; CHALID, 2021; LI et al., 2019).

A variação das intensidades, principalmente entre o ângulo $2\theta \cong 16^\circ$, podemos relacionar com as mudanças na cristalinidade da celulose (celulose cristalina e amorfa), associado também com as diferentes incorporações de vinhaça ao meio de cultura (GHOZALI; MELIANA; CHALID, 2021), provocando uma possível alteração na conformação da celulose.

Percebe-se que, o enriquecimento CBV80, com proporção de 80% de vinhaça inserida ao meio de cultura, o pico próximo a 16° , se faz menos acentuado, uma

possível cristalinidade menor, quando comparado por exemplo, com o enriquecimento CBV20, que apresenta cerca de 20% de vinhaça ao meio de cultura, amostra com possível alta cristalinidade, que se assemelha com a CB controle.

A intensidade do pico $\cong 14^\circ$ no substrato vinhaça (CB, CBV20, CBV40, CBV60 e CBV80), foram maiores quando comparados a intensidade no pico $\cong 16^\circ$, apontando principalmente a presença de celulose Ia (triclínica) (HE et al., 2020). As maiores intensidades de picos, podem ser resultados de uma densa estrutura das membranas de CB (SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010).

Alguns processos envolvidos na produção de CB podem influenciar na cristalinidade destas membranas, são eles: o meio de cultivo (estático ou dinâmico), a fonte de carbono, pH do meio, temperatura, tempo de crescimento, método de secagem e método de obtenção das CB em pó (liofilizador, moinho de bolas, moinho de facas, entre outros) (KHAN et al., 2021).

6 CONCLUSÕES

A análise de IR possibilitou avaliar os grupos funcionais presentes e as modificações nas membranas devido às diferentes incorporações ao meio de cultura, concluindo que ocorreram alterações químicas nas estruturas da CB incorporadas com *Aloe vera*, devido a presença da banda 1538 cm^{-1} , característico de interação do grupo amino e da região entre $3352 - 3246\text{ cm}^{-1}$, característico de celulose tipo I, já nas incorporações com vinhaça, presença de bandas 1315 cm^{-1} , características de regiões cristalinas e de bandas características de celulose tipo I.

Na análise de DRX, foi possível identificar picos $2\theta \cong 14^\circ$, 16° e 22° , característicos de celulose I nos enriquecimentos com vinhaça (CBV20, CBV40, CBV60 e CBV80) e exclusivamente no enriquecimento CBB80 e picos $2\theta \cong 12^\circ$ e 20° característicos de celulose II nos enriquecimentos com *Aloe vera* (CBB20, CBB40 e CBB60).

Mecanicamente, a CBB80 de *Aloe vera* demonstrou semelhança nos valores de módulo de elasticidade (MPa), tensão máxima (MPa) e alongamento (%) quando comparadas às membranas CB (controle) enquanto, que a CBV40 demonstrou semelhança nos valores de módulo de elasticidade (MPa), tensão máxima (MPa) e alongamento (%).

Morfologicamente, as CB incorporadas com vinhaça, apresentaram uma rede de microfibrilas densa e sem padrão de disposição muito semelhante às membranas controle. Nas incorporações com *Aloe vera*, a CBB80 demonstrou uma rede de microfibrilas com gel de *Aloe vera* aderidas na superfície e as demais incorporações CBB20, CBB40 e CBB60 apresentaram semelhança com as membranas controles.

Pensando na aplicabilidade das membranas de celulose bacteriana (CB), as incorporações que demonstraram maior resistência mecânica, podem ser aproveitadas na área de alimentos, como em embalagens, na área médica, na produção de vasos sanguíneos sintéticos, em bioimpressões 3D.

As incorporações que apresentaram desempenho inferior nos ensaios de tração, podem ser utilizadas, em pó, na área dos cosméticos, uma vez que as CB possuem características de alta absorção e adesão.

O trabalho apresenta o potencial uso da vinhaça e *Aloe vera* como substratos alternativos ao meio de cultura. O uso da vinhaça, promove a redução dos altos custos envolvidos na produção de CB e a valorização do uso de resíduos agroindustriais no processo de produção de CB. O uso da *Aloe vera*, com propriedades terapêuticas e/ou medicinais, conhecidas e descritas na literatura, possibilita além da redução dos custos na produção de CB, como também aplicação nas mais diversas áreas, como médicas, cosméticas e farmacêuticas.

REFERÊNCIAS

- ABDUL KHALIL, H. P. S.; BHAT, A. H.; IREANA YUSRA, A. F. Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 963–979, 2012.
- ADLAKHA, K.; KOUL, B.; KUMAR, A. Value-added products of Aloe species: Panacea to several maladies. **South African Journal of Botany**, 3 fev. 2021.
- AL-ABDALLAH, W.; DAHMAN, Y. Production of green biocellulose nanofibers by *Gluconacetobacter xylinus* through utilizing the renewable resources of agriculture residues. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 11, p. 1735–1743, 2013.
- ALBANEZ, R. et al. Feasibility of biohydrogen production by Co-digestion of vinasse (Sugarcane stillage) and Molasses in an Ansbbr. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 1, p. 27–41, 2018.
- ALBUQUERQUE, R. M. B. Biodegradável À Base De Celulose Bacteriana (Cb) E Polihidroxibutirato (Phb) para Aplicação Como Embalagem Ativa Biodegradável À Base De Celulose Bacteriana (Cb) E Polihidroxibutirato (Phb) Para Aplicação Como Embalagem Ativa. p. 1–131, 2019.
- ALEMAM, A. M. et al. Production enhancement of bacterial cellulose nanofiber using local *Komagataeibacter xylinus* SB3.1 under static conditions. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 2213–2221, 2021.
- ALVES, A. A. et al. Bacterial cellulose membranes for environmental water remediation and industrial wastewater treatment. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 17, n. 3, p. 3997–4008, 2020.
- ANDRITSOU, V. et al. Synthesis and Characterization of Bacterial Cellulose from Citrus-Based Sustainable Resources. **ACS Omega**, v. 3, n. 8, p. 10365–10373, 2018.
- 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.
- BAFFA, D. C. F.; FREITAS, R. G.; BRASIL, R. P. C. O Uso Da Vinhaça Na Cultura

Da Cana-De-Açúcar. **Núcleos**, p. 31–46, 2009.

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

BARUD, H. S. et al. Antimicrobial bacterial cellulose-silver nanoparticles composite membranes. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, 2011.

BOZDAĞ, G. et al. Valorization of pea pod, celery root peel, and mixed-vegetable peel as a feedstock for biocellulose production from *Komagatacibacter hansenii* DSM 5602. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2021.

CACICEDO, M. L. et al. **Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications** *Bioresource Technology* Elsevier Ltd, , 1 ago. 2016.

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

CALDERÓN-TOLEDO, S. et al. Isolation and partial characterization of *Komagatacibacter* sp. SU12 and optimization of bacterial cellulose production using *Mangifera indica* extracts. 2021.

CALDEIRA, M. da S. **Produção de nanocompósito utilizando diferentes fontes de celulose como reforço**. 2014. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

CARREIRA, P. 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.

CHANG, W. S.; CHEN, H. H. Physical properties of bacterial cellulose composites for wound dressings. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 75–83, 2016.

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

CHOI, S. M.; SHIN, E. J. The nanofication and functionalization of bacterial cellulose and its applications. **Nanomaterials**, v. 10, n. 3, 2020.

CLARO, F C. **Elaboração e caracterização de filmes a partir de nanofibrilas de celulose vegetal**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências dos Materiais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

DA SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Use of stillage and its impact on soil properties and groundwater. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108–114, 2007.

DE CASTRO, R. E. N. et al. Open Sugarcane Process Simulation Platform. In: **Computer Aided Chemical Engineering**. [s.l.] Elsevier B.V., 2018. v. 44p. 1819–1824.

DEMIATE et al. Determinação de Açúcares Redutores e Totais em Alimentos. Comparação entre Método Colorimétrico e Titulométrico. Publicatio **UEPG – Exact and Soil Sciences, Agrarian Sciences and Engineering**, v. 8, n. 1, p. 65-78, 2002. Disponível em: < <http://www.revistas2.uepg.br/index.php/exatas/article/view/772/677> >.

DU, R. et al. Production and characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* isolated from Chinese persimmon vinegar. **Carbohydrate Polymers**, v. 194, p. 200–207, 15 ago. 2018.

ESA, F.; TASIRIN, S. M.; RAHMAN, N. A. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 113–119, 1 jan. 2014.

FAN, X. et al. Production of nano bacterial cellulose from beverage industrial waste of citrus peel and pomace using *Komagataeibacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 1068–1072, 20 out. 2016.

FERNANDES, I. DE A. A. et al. Bacterial cellulose: From production optimization to new applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 2598–2611, 2020.

FERRER, A.; PAL, L.; HUBBE, M. **Nanocellulose in packaging: Advances in barrier layer technologies** *Industrial Crops and Products* Elsevier B.V., , 1 jan. 2017.

FREITAS, V. S.; RODRIGUES, R. A. F.; GASPI, F. O. G. Propriedades farmacológicas da Aloe vera (L.) Burm. f. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 299–307, 2014.

FUESS, L. Potencial contaminante e energético da vinhaça: riscos de contaminação ao solo e recursos hídricos e recuperação de energia a partir da digestão anaeróbica. **Aleph**, 2013.

GAO, Y. et al. Biomedical applications of Aloe vera. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 0, p. S244–S256, 2019.

GASC, A. et al. No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における 健康関連指標に関する共分散構造分析Title. **Photosynthetica**, v. 2, n. 1, p. 1–13, 2018.

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

GODINHO, J. F. et al. Incorporation of Aloe vera extracts into nanocellulose during biosynthesis. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 545–555, 2016.

GOMES, F. P. et al. Production of bacterial cellulose by Gluconacetobacter sacchari using dry olive mill residue. **Biomass and Bioenergy**, v. 55, p. 205–211, 1 ago. 2013.

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

GÜZEL, M.; AKPINAR, Ö. Preparation and characterization of bacterial cellulose produced from fruit and vegetable peels by Komagataeibacter hansenii GA2016. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 1597–1604, 1 nov. 2020.

HALIB, N. et al. The remarkable three-dimensional network structure of bacterial cellulose for tissue engineering applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 566, n. May, p. 631–640, 2019.

HARDER, G. DE M. C. E M. N. C. Avaliação da Viabilidade do Uso de Resíduos na Agricultura. **Embrapa Meio Ambiente**, v. 1, p. 9, 2008.

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

HE, J. et al. Superelastic and superhydrophobic bacterial cellulose/silica aerogels with hierarchical cellular structure for oil absorption and recovery. **Journal of Hazardous Materials**, v. 346, p. 199–207, 15 mar. 2018.

HOMMEL, R. K. Acetobacter. In: **Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition**. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. p. 3–10.

HU, W. et al. Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 1043–1060, 2014.

HUSSAIN WASIM SAJJAD TAOUS KHAN FAZLI WAHID, Z. Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review. [s.d.].

JANENI, J.; ADASSOORIYA, N. M. Nanocellulose biopolymer-based biofilms: Applications and challenges. In: **Biopolymer-Based Nano Films**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 43–62.

JORFI, M.; FOSTER, E. J.; FOSTER, E. J. Recent advances in nanocellulose for biomedical applications. **J. Appl. Polym. Sci**, v. 132, p. 41719, 2014.

JOSEPH, B.; RAJ, S. J. PHARMACOGNOSTIC AND PHYTOCHEMICAL PROPERTIES OF ALOE VERA LINN – AN OVERVIEW Taxonomy : Enzymes : **October**, v. 4, n. 2, p. 106–110, 2010.

JOZALA, A. F. et al. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2063–2072, 2016.

KAMIN, K. et al. Hydrogel bacterial cellulose: a path to improved materials for new eco-friendly textiles. **Cellulose**, v. 27, [s.d.].

KHAN, H. et al. Valorization of fruit processing waste to produce high value-added bacterial nanocellulose by a novel strain *Komagataeibacter xylinus* IITR DKH20. **Carbohydrate Polymers**, v. 260, p. 117807, 15 maio 2021.

KHANDELWAL, M.; WINDLE, A. H. Self-assembly of bacterial and tunicate cellulose nanowhiskers. **Polymer**, v. 54, n. 19, p. 5199–5206, 2013.

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

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

KUO, C. H. et al. Hydrolysis of Orange Peel with Cellulase and Pectinase to Produce Bacterial Cellulose using *Gluconacetobacter xylinus*. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 1, p. 85–93, 2019.

LAVOINE, N. et al. **Microfibrillated cellulose - Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review** *Carbohydrate Polymers* Elsevier, , 1 out. 2012.

LENGOWSKI, E. C. et al. Avaliação de métodos de obtenção de celulose com diferentes graus de cristalinidade. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, v. 41, n. 98, p. 185–194, 2013.

LI, J. et al. Production of high crystallinity type-I cellulose from *Komagataeibacter hansenii* JR-02 isolated from Kombucha tea. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 66, n. 1, p. 108–118, 2019.

LI, Z. et al. Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 120, p. 115–119, 20 abr. 2015.

LIM, Z. X.; CHEONG, K. Y. Effects of drying temperature and ethanol concentration on bipolar switching characteristics of natural Aloe vera-based memory devices. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, n. 40, p. 26833–26853, 2015.

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.

LUDWICKA, K. et al. Medical and Cosmetic Applications of Bacterial NanoCellulose. **Bacterial Nanocellulose: From Biotechnology to Bio-Economy**, p. 145–165, 1 jan. 2016.

LYRA, M. R. C. C.; ROLIM, M. M.; SILVA, J. A. A. DA. Topossequência de solos fertilizados com vinhaça: contribuição para a qualidade das águas do lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 7, n. 3, p. 525–532, 2003.

MARAFON, A. C. et al. Use of sugarcane vinasse to biogas, bioenergy, and biofertilizer production. In: **Sugarcane Biorefinery, Technology and Perspectives**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 179–194.

MARTINS CARNEIRO, L. et al. Aloe vera: botanical, phytochemical and therapeutic characteristics. **Arte Méd Ampl**, v. 33, n. 4, p. 160–164, 2013.

MEDINA, E. C. et al. Reuso da vinhaça na produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 14, n. 4, p. 4154–4161, 2021.

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.

MOHD NADZIR, M. et al. polymers Biomedical Applications of Bacterial Exopolysaccharides: A Review. 2021.

MOLINA-ROMERO, J. M. et al. Reduced tensile properties of bacterial cellulose membranes after an accelerated composite temperature/humidity cyclic assay. **Journal of Polymers and the Environment**, n. 0123456789, 2021.

OLIVEIRA, B. G. Emissão de metano e microbiota funcional associadas a vinhaça de cana-de-açúcar em sistemas de armazenamento e transporte. p. 98, 2015.

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

PACHECO, G. et al. Bacterial cellulose skin masks—Properties and sensory tests. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 17, n. 5, p. 840–847, 2018.

PEREIRA, A. L. S. et al. Improvement of polyvinyl alcohol properties by adding nanocrystalline cellulose isolated from banana pseudostems. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 165–172, 4 nov. 2014.

PICHETH, G. F. et al. **Bacterial cellulose in biomedical applications: A review** *International Journal of Biological Macromolecules* Elsevier B.V., , 1 nov. 2017.

POGORELOVA, N. et al. materials Bacterial Cellulose Nanocomposites: Morphology and Mechanical Properties. [s.d.].

QIAO, N. et al. Soybean oil refinery effluent treatment and its utilization for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. **Food Hydrocolloids**, v. 97, p. 105185, 1 dez. 2019.

QIU, Y. et al. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-vaccarin membranes for wound healing. **Materials Science and Engineering C**, v. 59, p. 303–309, 2016.

RADHA, M. H.; LAXMIPRIYA, N. P. Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of Aloe vera: A systematic review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 5, n. 1, p. 21–26, 2015.

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.

RAMOS, A. DE P.; PIMENTEL, L. C. Ação da Babosa no reparo tecidual e cicatrização Effectiveness of Aloe vera on the tissue repair and healing process. **Brazilian Journal of Health v**, v. 2, n. 1, p. 40–48, 2011.

RECOUVREUX. Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos. **Tese de doutorado em Engenharia Química Universidade Federal de Santa Catarina**, v. Único, p. 145, 2008.

REVIN, V. V. et al. Isolation and Characterization of the Strains Producing Bacterial Cellulose. **Microbiology (Russian Federation)**, v. 89, n. 1, p. 86–95, 2020.

RPA News, cana&indústria Fertirrigação com vinhaça localizada cresce 185% em áreas da BP Bunge. **RPA News, cana&indústria**. Mar. 2021. Disponível em: <https://revistarpanews.com.br/fertirrigacao-com-vinhaca-localizada-cresce-185-em-areas-da-bp-bunge/>. Acesso em: 08 set. 2021.

SAAVEDRA-SANABRIA, O. L. et al. Cellulose biosynthesis using simple sugars

available in residual cacao mucilage exudate. **Carbohydrate Polymers**, v. 274, p. 118645, 15 nov. 2021.

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

SALARI, M. et al. Preparation and characterization of cellulose nanocrystals from bacterial cellulose produced in sugar beet molasses and cheese whey media. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 280–288, 1 fev. 2019.

SÁNCHEZ-MACHADO, D. I. et al. **Aloe vera: Ancient knowledge with new frontiers** *Trends in Food Science and Technology* Elsevier Ltd, , 1 mar. 2017.

SHARMA, C.; BHARDWAJ, N. K. Biotransformation of fermented black tea into bacterial nanocellulose via symbiotic interplay of microorganisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 166–177, 1 jul. 2019.

SHINDE, P. A. et al. Distillery spent wash: An emerging chemical pool for next generation sustainable distilleries. **Journal of Water Process Engineering**, v. 36, p. 101353, 1 ago. 2020.

SIJABAT, E. K. et al. Optimization on the synthesis of bacterial nano cellulose (BNC) from banana peel waste for water filter membrane applications. **Materials Research Express**, v. 7, n. 5, 2020.

SILVA, G. S. DA et al. Avaliação da influência da incorporação do óleo de coco em membranas de Celulose Bacteriana. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e52910112002, 2021.

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

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

STANISŁAWSKA, A. Bacterial Nanocellulose as a Microbiological Derived

Nanomaterial. **Advances in Materials Science**, v. 16, n. 4, p. 45–57, 1 dez. 2016.

STANISŁAWSKA, A.; STAROSZCZYK, H.; SZKODO, M. The effect of dehydration/rehydration of bacterial nanocellulose on its tensile strength and physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 236, p. 116023, 15 maio 2020.

SULEIMAN, A. K. A. et al. Recycling organic residues in agriculture impacts soil-borne microbial community structure, function and N₂O emissions. **Science of the Total Environment**, v. 631–632, p. 1089–1099, 1 ago. 2018.

THORAT, M. N.; DASTAGER, S. G. High yield production of cellulose by a *Komagataeibacter rhaeticus* PG2 strain isolated from pomegranate as a new host. **RSC Advances**, v. 8, n. 52, p. 29797–29805, 2018.

UL-ISLAM, M. et al. Bacterial cellulose composites: Synthetic strategies and multiple applications in bio-medical and electro-conductive fields. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 12, p. 1847–1861, 2015.

UL-ISLAM, M.; KHAN, T.; PARK, J. K. Nanoreinforced bacterial cellulose-montmorillonite composites for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1189–1197, 2012.

ULLAH HÉLDER SANTOS TAOUS KHAN, H. A. Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery. [s.d.].

ULLAH, M. W. et al. Trends on the Cellulose-Based Textiles: Raw Materials and Technologies. 2021.

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

VELÁSQUEZ-RIANO, M. et al. Cellulose production by *Gluconacetobacter kakaiceti* GM5 in two batch process using vinasse as culture media. **Water Science and Technology**, v. 68, n. 5, p. 1079–1084, 2013.

VIEIRA, D. C. M. Produção de biofilme (membrana de biocelulose) por *Gluconacetobacter xylinus* em meio de resíduos de frutas e folhas de chá verde. p. 176, 2013.

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

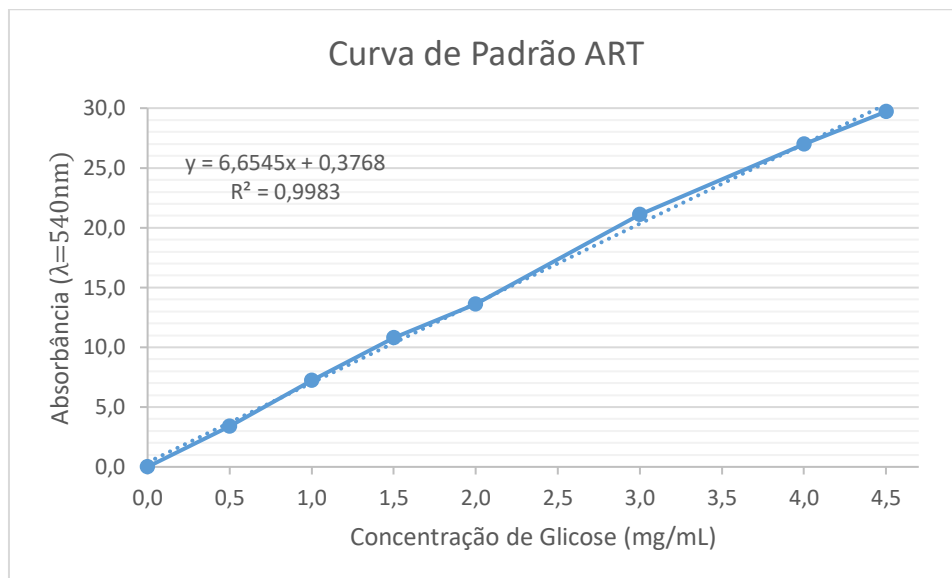
WU, J. M.; LIU, R. H. Cost-effective production of bacterial cellulose in static cultures using distillery wastewater. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 3, p. 284–290, 2013.

YAN, H. et al. Synthesis of bacterial cellulose and bacterial cellulose nanocrystals for their applications in the stabilization of olive oil pickering emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 72, p. 127–135, 1 nov. 2017.

YANG, Y. et al. Isolation and characteristics analysis of a novel high bacterial cellulose producing strain *Gluconacetobacter intermedius* CIs26. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 2012–2017, 2013.

YE, J. et al. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* ATCC 23767 using tobacco waste extract as culture medium. **Bioresource Technology**, v. 274, p. 518–524, 1 fev. 2019.

ZHONG, C. Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. December, p. 1–19, 2020.

APÊNDICE A – Curva de calibração açúcares

ANEXO A – Script do ensaio de tração

```

>>>>> Programa Tesc - Esboço de Script
>>>>> Método Membrana_jessyca
>>>>> Data: 01/01/09

1  ### VARIÁVEIS DE ENTRADA
2  ## Seção e comprimento base:
3  Larg -> "Largura", 17.00 mm, Ent, Res, Rel, Edi
4  Espess -> "Espessura", 2.00 mm, Ent, Res, Rel, Edi
5  Delta L -> "DL", 0.0 mm, Ent, Res, Rel, Edi
6  ComprBase -> "Compr. Base", 20 mm, Ent, Edi
7  ## Utilizadas nos comandos
8  Cmd_VE -> "Velocidade de ensaio", 5.000 mm/min, Const
9  Cmd_VR -> "Velocidade de retorno", 0.000 mm/min, Const
10 Cmd_LF -> "Limite de força", 45.000 kgf, Const
11 Cmd_LD -> "Limite de deformação", 400.000 mm, Const
12 Cmd_SR -> "Sensibilidade de detecção de ruptura", 0 , Const
13
14 ### VARIÁVEIS ATRIBUÍVEIS
15 ## Resultados desejados:
16 T1 -> "Tensão->@Força Max.", MPa, Res, Rel
17 Alongamento -> "Along", %, Res, Rel
18 ME1 -> "Mod.Elástico.", MPa
19 Fmax -> "Fmax", N, Res, Rel
20
21 ### EVENTOS
22 ## Eventos correspondentes aos resultados desejados:
23 @Força Max. -> "", Vis
24 @Ruptura -> "", Vis
25
26 ### RETAS
27 RetaElast -> "", Vis
28
29 ### ATRIBUIÇÕES
30 ## Seção e comprimento base:
31 SIS_ÁREA = ÁREA_RETANG( Larg; Espess )
32 SIS_COMPR_BASE = CÓPIA( ComprBase )
33 ## Reta elástica:
34 RetaElast = RETA_INICIAL( +++, +++ )
35 ## Resultados desejados:
36 @Força Max. = @FORÇA_MAX( )
37 T1 = TENSÃO( @Força Max. )
38 Alongamento = DIV( Delta L; ComprBase )
39 Fmax = FORÇA( @Força Max. )
40
41 ### MENSAGENS
42 Msg1 -> Ensaio finalizado por ação de fim de cur...
43 Msg2 -> Ensaio finalizado por limite de força.
44 Msg3 -> Ensaio finalizado por limite de deformaç...
45
46 ### COMANDOS
47 SALVAR_POSIÇÃO_INICIAL( )
48 ATIVAR_LIMITE_FORÇA( Cmd_LF )
49 ATIVAR_LIMITE_DEFORM( Cmd_LD )
50 SUBIR_COM_VELOC_CONST( Cmd_VE )
51 AGUARDAR_CHEGADA( )
52 BIP( -2.000 )
53 DISPARAR_MENSAGEM( Msg1; 0.0000 s )
54 FINALIZAR_ENSAIO( )
55 ## Na ocorrência de limite de força:
56 EM_LIMITE_FORÇA( )
57 PARAR_ABRUPTAMENTE( )
58 BIP( -1.000 )
59 DISPARAR_MENSAGEM( Msg2; 0.0000 s )
60 FINALIZAR_ENSAIO( )
61 ## Na ocorrência de limite de deformação:
62 EM_LIMITE_DEFORM( )
63 PARAR_ABRUPTAMENTE( )
64 BIP( -1.000 )
65 DISPARAR_MENSAGEM( Msg3; 0.0000 s )
66 FINALIZAR_ENSAIO( )

```


ANEXO D – Caracterização da vinhaça

[illegible]

