

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Câmpus de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Desenvolvimento de métodos de cultivo de *Gluconacetobacter xylinus* para
obtenção de compósitos à base de celulose bacteriana e colágeno Tipo I adicionado
in situ.**

Ígor Augusto Negri Donini

Dissertação de Mestrado

2011

Ígor Augusto Negri Donini

**Desenvolvimento de métodos de cultivo de *Gluconacetobacter xylinus* para
obtenção de compósitos à base de celulose bacteriana e colágeno Tipo I adicionado
in situ.**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Co-orientador Prof. Dr. Younés Messaddeq

Dissertação de Mestrado

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

D683d	Donini, Ígor Augusto Negri Desenvolvimento de métodos de cultivo de <i>Gluconacetobacter xylinus</i> para obtenção de compósitos à base de celulose bacteriana e colágeno tipo I adicionado in situ / Ígor Augusto Negri Donini. – Araraquara : [s.n], 2011 104 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Reinaldo Marchetto 1. Biotecnologia. 2. Celulose bacteriana. 3. Compósitos. I. Título.
-------	---

DADOS CURRICULARES

Ígor Augusto Negri Donini

1 Dados Pessoais

1.1 Nascimento: 16 de março de 1987

1.2 Nacionalidade: Brasileira

1.3 Naturalidade: Rincão - SP

1.4 Estado Civil: Solteiro

1.5 Filiação: Pai: Mauro Ivo Donini

Mãe: Sônia Eloisa Antonucci Negri Donini

1.6 Profissão: Biotecnólogo

1.7 Endereço: Av. Ernesto Loreto, 46, Jardim Bela Vista, Rincão, SP.

1.8 Endereço Profissional: Rua Prof. Francisco Degni s/n.

2 Formação Acadêmica

2.1 Técnico em Agropecuária – Colégio Técnico Agrícola “José Bonifácio”, UNESP
Jaboticabal - 2005

2.2 Graduação em Biotecnologia – Universidade de Ribeirão Preto - 2009

Atividades acadêmicas relevantes

Trabalhos publicados e/ou submetidos a periódicos indexados no período:

DONINI, I. A. N.; FUKUMOTO, F.; LUSTRI, W.R.; BARUD, H. S.; MARCHETTO, R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Biosíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana produzida por *Gluconacetobacter xylinus*. **Eclética Química** (aceito para publicação).

Participações em eventos científicos no período:

- A) 17º Encontro da SBQ - Regional Interior Paulista Waldemar Saffioti– Araraquara, SP, 2009; **Trabalho Apresentado:** DONINI, Í. A. N.; RIBEIRO, J. S. L.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S.; MESSADDEQ, Y.; MARCHETTO, R.; RIBEIRO, S. J. L.; Produção e modificação *in situ* de biocelulose produzida por *Gluconacetobacter xylinus*. Sob a forma de pôster.
- B) 12º Simpósio em Ciência e Engenharia de Materiais – São Carlos, SP, 2009. **Trabalho Apresentado:** DONINI, I. A. N.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S.; MESSADDEQ, Y.; MARCHETTO, R. Produção e Caracterização de Celulose bacteriana produzida por *Gluconacetobacter xylinus*. Sob a forma de pôster.
- C) 33ª Reunião Sociedade Brasileira de Química (SBQ) – Águas de Lindóia, SP, 2010; **Trabalho Apresentado:** SALVI, D.T.B.; BARUD, H. S.; DONINI, I.A.N.; PAWLICKA, A.; MESSADDEQ, Y. Hidrogéis transparentes, termoeestáveis e condutores iônicos baseados em Biocelulose. Sob a forma de pôster.
- D) Colóquio Franco Brasileiro de Polímeros e Meio Ambiente – Rio de Janeiro, RJ, 2009; **Trabalho Apresentado:** DONINI, Í. A. N.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S.; MESSADDEQ, Y.; MARCHETTO, R. Produção e Modificação *in situ* de Celulose Bacteriana produzida por *Gluconacetobacter xylinus*. 2009. Sob a forma de pôster.
- E) 7th International Symposium on Natural Polymers and Composites and XII International Macromolecular Colloquium.- Gramado, RS, 2010. **Trabalho Apresentado:** DONINI, I.A.N.; SALVI, D. B.; SASKA, S.; BARUD, H. S.; LUSTRI, W. R.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y.; MARCHETTO, R. *In situ* production of bionanocomposite based on bacterial cellulose and collagen. 2010. Sob a forma de pôster.

Produção bibliográfica:

Artigos completos publicados em periódicos

1. OLIVEIRA, L.P., CARDOZO, G.P., SANTOS, E.V., MANSUR, M.A.B., DONINI, Í. A. N., ZISSOU, V.G., ROBERTO, P.G., MARINS, M. Molecular analysis of the rRNA genes of *Babesia* spp and *Ehrlichia canis* detected in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p. 238 - 240, 2009.
2. CARDOZO, G.P., OLIVEIRA, L.P., ZISSOU, V.G., DONINI, I.A.N., ROBERTO, P.G., MARINS, M. Analysis of the 16S rRNA gene of *Anaplasma platys* detected in dogs from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p. 478 - 479, 2007.

Dedico este trabalho:

Aos meus pais e à minha irmã Isis, pelo carinho, dedicação, por sempre estarem presentes nas horas mais difíceis e por muitas vezes abdicarem de suas próprias vidas para que eu pudesse fazer tudo da melhor maneira possível e atingir meus objetivos. Eu devo não somente este trabalho, mas toda minha vida a vocês.

Agradecimentos

Especialmente ao Professor Doutor Reinaldo Marchetto pela oportunidade, pelos conhecimentos adquiridos, pela paciência e dedicação durante toda a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Wilton Rogério Lustri pelo apoio e importantes contribuições ao trabalho.

Ao Professor Doutor Younes Messaddeq, pela amizade, pela oportunidade e por acreditar no meu potencial.

Ao Professor Doutor Hernane Barud pela amizade, pela grandiosa contribuição à esta que dissertação e também aos ensinamentos que levarei por toda minha vida.

À toda minha família que muito me apoiou durante a realização deste trabalho, principalmente nos períodos que estive ausente.

Aos integrantes do Grupo de Materiais Fotônicos alunos e funcionários, Denise, Elaine, Maurício, Alexandre Gatti, Kíria, Andréa, Daniele, Molíria, Miguel, Fabiana, Adriana, Robson, Wanderson, Danilo, Lucas, Wagner, César, Tâmara, Mariana, Maristela, Carolina, que levarei boas lembranças e aprendizado por toda a vida.

Aos integrantes do Grupo de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida, Anderson, Davi, Luiz, Larissa pelo carinho e companheirismo. Ao Professor Doutor Saulo Garrido pelos ensinamentos.

À técnica de laboratório Luciene, pela atenção e pelos infindáveis momentos no laboratório de Microbiologia da Uniara, que sem eles este trabalho não seria possível.

Aos meus vizinhos Senhor Milton e Dona Vani da cidade de Rincão, pela paciência e por me despertarem o gosto pela ciência, vocês fazem parte da minha história.

Ao meu pai, por mostrar-me que o universo não é uma casca de noz.

À FAPESP pela bolsa concedida.

Até que o sol não brilhe, acendamos uma vela na escuridão.

(Confúcio)

Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida.

(Sócrates)

Resumo

A celulose bacteriana (CB) é um polímero produzido pela bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, e apresenta diversas aplicações biomédicas e tecnológicas. Recentemente foi desenvolvido o método de inserção *in situ*, que visa a produção de compósitos via adição de materiais no meio de cultura. Neste trabalho tem sido realizada a inserção de colágeno durante a formação da CB no intuito de melhorar as propriedades osteocondutoras do compósito, formando um *scaffold* visando o uso em regeneração óssea. A produção de celulose bacteriana foi testada via cultivo da bactéria gram-negativa *Gluconacetobacter xylinus* linhagem ATCC 23769, em diferentes meios de cultura estáticos e agitado à base de distintas fontes de carbono e adição de colágeno *in situ*, a fim de avaliar tanto a produção, como as propriedades dos materiais produzidos. Foram utilizados meios da literatura, ou com algumas modificações, sendo o meio com melhor resultado foi aquele utilizado no restante do trabalho, ou seja, na produção de compósitos *in situ*. As membranas sem adição de materiais *in situ* foram caracterizadas por FT-IR, DRX, MEV, grau de polimerização, intumescimento e análise térmica, apresentando similaridade com o material disponível no mercado para comercialização. O processo de obtenção das mantas de CB foi acompanhado e estudado através da avaliação do crescimento da cepa utilizada, curva de consumo de açúcares, variação do pH e produção de CB em função do tempo de cultivo, para avaliar qual condição seria ideal para a produção de CB. Foram obtidos melhores resultados utilizando-se o manitol como fonte de carbono e um pH inicial de 4,5, ao utilizar a cepa ATCC 23769. O cultivo agitado mostrou-se mais eficiente ao produzir 5,47 g/L. A produção do compósito à base de CB e colágeno (CB+Col) através da adição *in situ*, variando a concentração de 1 a 5% foi realizada no cultivo estático. O material obtido foi caracterizado quanto às suas propriedades físico-químicas, utilizando-se as mesmas técnicas usadas para membranas puras. Com isso, ao unir as excelentes propriedades biocompatíveis da CB e do colágeno num mesmo compósito, têm-se, por fim, um material com potencial aplicação no reparo de tecidos, como ossos, tendões e pele, através da produção em um método eficiente e prático que é o sistema de inserção *in situ*.

Palavras-chave: Celulose bacteriana. Colágeno. Adição *in situ*.

Abstract

The Bacterial Cellulose (BC) is a polymer produced by *Gluconacetobacter xylinus* bacteria, and shows many biomedical and technological applications. Recently was developed the *in situ* method of insertion, that aims to obtain composites materials via addition of interfering substances in the culture medium. In this work, has been performed the insertion of collagen during the BC formation, aiming to improve the osteoconductive properties of composite, making a *scaffold* to be used at bone regeneration. The BC production was tested by bacterial culture of gram-negative *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 23769, in different culture media static and agitated based on different carbon sources and *in situ* addition of collagen, to assess the production and the material properties. Literature mediums were used, or with some modifications, being the best was that used at rest of the work, i.e., in the *in situ* composite production. The membranes without addition of materials *in situ* were characterized by techniques FT-IR, XRD, SEM, degree of polymerization, swelling and thermal analysis, showing similarity with the material available in the market for sale. The obtaining process of the BC blankets was accompanied and studied by evaluation of strain growing, sugar consumption curve, pH variation and BC production versus time of cultivation, to assess what's the ideal for BC production. Thus the better results was obtained using manitol as carbon source and a initial pH of 4,5, using ATCC 23769 strain. The agitated culture showed more efficient leading to a production of 5,47 g/L. The composite materials based on bacterial cellulose and collagen (CB+Col) through *in situ* addition, varying from 1 to 5% (v/v) was performed at static culture. The final material was characterized regarding its physical-chemistry properties, using the same techniques used at pure membranes. Thus, by joining the excellent biocompatible properties of the BC and collagen in the same composite, we have, finally, a material with potential application in tissue repair, such as bones, tendons and skin, through the production of an efficient and practical that is the insertion *in situ* system.

Keywords: Bacterial Cellulose. Collagen. *In situ* addition

Lista de Abreviaturas e Siglas

C1 - Cultivo agitado no qual os meios eram inoculados e levados à agitação em seguida

C2 - Cultivo agitado no qual os meios eram inoculados e ficavam 72 horas em crescimento estático e depois eram levados à agitação

CB - Celulose Bacteriana

CB+Col - Compósito à base de celulose bacteriana e colágeno

COL - Colágeno

CS - Celulose Sintase

CV - Celulose Vegetal

DNS - Ácido Dinitrosalicílico

GP - Grau de Polimerização

DRX - Difractometria de Raios-X

EDS - Espectroscopia de Energia Dispersiva

e-PTFE - Politetrafluoretileno expandido

FAT - Fundação André Tosello

HS - Meio de cultura Hestrin e Schramm

IMA - Incremento Médio Anual

MEC - Matriz extracelular

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

OLED - Diodos orgânicos emissores de luz (“Organic Light Emission Diodes”)

PCL - Poli (ϵ -caprolactona)

PHB - Poli (β –hidroxibutirato)

PHB-V - Poli (β –hidroxibutirato-co-valerato)

ROG - Regeneração óssea guiada

TG - Termogravimetria

UDPG - Uridina difosfato-glicose

Lista de Figuras

Figura 1 - Visão esquemática dos componentes das fibras de celulose.	22
Figura 2 - Pesquisa de artigos realizada na Web of Science (fevereiro de 2011) com a palavra “Bacterial Cellulose”, em (A) número de Publicações e em (B) de citações no período.	24
Figura 3 – Pesquisa de artigos realizada na Web of Science (fevereiro de 2011) com as palavras “Bacterial Cellulose” e “Nanocomposites”, em (A) número de Publicações e em (B) de citações no período.	24
Figura 4 - Modelo hipotético da rota metabólica para a biossíntese de celulose por <i>G. xylinus</i> – Glicoquinase ATP (1); Fosfoglicomutase (2); Glicose 6-fosfato desidrogenase (3); Fosfoglicoisomerase (4); Frutoquinase ATP (5); Aldolase (6); Triose fosfato isomerase (7); Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (8); Fosfogliceratomutase (9); Enolase (10); Piruvatoquinase (11); Piruvato difosfato quinase (12); 6-fosfogliconato desidrogenase (13); Fosforibulose epimerase (14); Fosforibulose isomerase (15); Transacetolase (16); Transaldolase (17); Frutoquinase (18); Piruvato desidrogenase (19)	28
Figura 5 - Tipos de Biorreatores mais utilizados na produção de celulose bacteriana, a) Biorreator de Tanque Agitado e b) Biorreator Airlift;	30
Figura 6 - Organização hierárquica do colágeno. O desenho ilustra a estrutura de um tendão. a) mostra algumas estruturas com dimensões; b) e c) mostram interações entre fibras e moléculas respectivamente. A matriz entre as fibras é rica em proteoglicano (PG), e as ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno são indicadas por (C-L).	35
Figura 7 - Hierarquia estrutural do colágeno, começando com a sequência de aminoácidos a nível nanométrico, até as fibras colágenas e seu arranjo, de ordem micrométrica.	36
Figura 8 - Fluxograma das etapas relacionadas ao trabalho desenvolvido	42
Figura 9 - Grau de polimerização de celuloses de diferentes fontes	47
Figura 10 - Celulose Bacteriana a) membrana em destaque na placa e b) crescendo na superfície do meio de cultura, e c) membrana em destaque, mostrando certo grau de transparência e textura.	52

Figura 11- Curvas de crescimento de células livres em meios contendo 20 g/L de fonte de carbono.	53
Figura 12 - Curvas de crescimento de células livres em meios contendo 50 g/L de fonte de carbono	54
Figura 13 - Produção de celulose bacteriana em meios com 20 g/L de fontes de carbono e pH inicial 6,0 (a) e 4,5 (b).	55
Figura 14 - Produção de celulose bacteriana em meios com 50 g/L de fontes de carbono e pH inicial 6,0 (a) e 4,5 (b).	56
Figura 15 - Variação do pH em função do tempo na produção de CB contendo 20 g/L (a) e 50 g/L (b) de fontes de carbono e com pH inicial 6,0.	57
Figura 16 - Variação do pH em função do tempo na produção de CB contendo 20g/L (a) e 50 g/L (b) de fontes de carbono e com pH inicial 4,5	58
Figura 17 - Curvas consumo de carboidratos, em meios contendo 20g/L ou 50 g/L de fontes de carbono	59
Figura 18 - Difractogramas obtidos de CBs produzidas em diferentes fontes de carbono.	61
Figura 19 - Espectro Vibracional na região do infravermelho de amostra de celulose bacteriana produzida em meio contendo manitol	62
Figura 20 - Análise Termogravimétrica comparativa entre CB produzida, Celulose Vegetal e CB comercial	64
Figura 21 - Micrografia eletrônica de varredura de celulose bacteriana liofilizada (aumento 10000X)	65
Figura 22 - Micrografia eletrônica de varredura de celulose bacteriana liofilizada com maior aproximação(aumento 30000X)	65
Figura 23 - Micrografia eletrônica de varredura de celulose bacteriana produzida com Glicose como fonte de carbono, seca em estufa a 37°C. (Aumento 10000X)	66
Figura 24 - Micrografia eletrônica de varredura de celulose bacteriana produzida com Manitol como fonte de carbono, seca em estufa a 37°C. (Aumento 10000X)	66
Figura 25 - Micrografia eletrônica de varredura de celulose bacteriana produzida com Frutose como fonte de carbono, seca em estufa a 37°C. (Aumento 10000X)	67
Figura 26 - Teste de intumescimento de membranas produzidas em diferentes fontes de carbono : a) Frutose, b) Sacarose, c) Manitol e d) Glicose.	68

Figura 27 - <i>Pellets</i> formados no cultivo agitado C1. Em a) pellets no fundo e em b) meios após serem retirados do processo	69
Figura 28 - <i>Pellets</i> formados no cultivo agitado C1, após lavagem, em meios contendo: a) Glicose, b) Frutose, c) Manitol e d) Sacarose.	69
Figura 29 - Comparativo entre as membranas formadas nos cultivos: em a) cultivo agitado e em b) cultivo estático.	70
Figura 30 - Variação do pH nos cultivos agitados C1 e C2.	71
Figura 31 - Produção sob cultivo agitado C1 e C2 .	71
Figura 32 - Produção de nanocompósitos de CB+Col realizados em erlenmeyers (a) e material lavado e seco após produção (b).	75
Figura 33 - Difractogramas de raios-x das amostras de: CB pura, e colágeno em concentrações de 1, 3 e 5% (v/v).	76
Figura 34 - Espectros vibracionais na região do infravermelho de amostras de: a) CB pura, b) CB+Col 1%, c) CB+Col 2%, d) CB+Col 3%, e) CB+Col 4%, f)CB+Col 5%.	77
Figura 35 - Micrografia eletrônica de varredura do compósito CB+Col com 1% de colágeno (Aumento 10.000 vezes).	78
Figura 36 - Micrografia eletrônica de varredura transversal do compósito CB+Col com 1% de colágeno (Aumento 10.000 vezes).	79
Figura 37 - Micrografia eletrônica de varredura do compósito CB+Col com 3% colágeno (Aumento 10.000 vezes)	79
Figura 38 - Micrografia eletrônica de varredura do compósito CB+Col, com 3% de colágeno (Aumento 10.000 vezes).	80
Figura 39 - Micrografia eletrônica de varredura do compósito CB+Col, com 5% de colágeno (Aumento 10.000 vezes)	80
Figura 40 - Micrografia eletrônica de varredura do compósito CB+Col, com 5% de colágeno (Aumento 10.000 vezes).	81
Figura 41 - Curvas termogravimétricas comparando a perda de massa da CB e dos compósitos CB+Col de 1% a 5%.	82
Figura 42 - Teste de intumescimento dos compósitos (comparativo): a) Manitol, b) CB+Col 5%, c) CB+Col 3%, e d) CB+Col 1%.	83
Figura 43 - Medida de ângulo de contato de amostra de CB pura.	84
Figura 44 - Medida de ângulo de contato de amostra de CB+Col 5%.	85

Lista de Tabelas

Tabela I - Comparativo das propriedades da celulose vegetal (CV) e da celulose bacteriana (CB)	23
Tabela II - Aplicações da Celulose Bacteriana	25
Tabela III - Maiores produções de Celulose Bacteriana encontradas na literatura	31
Tabela IV - Composição básica dos meios de cultura utilizados nos experimentos	43
Tabela V - Frequência das vibrações características da celulose comparadas a uma proteína	63
Tabela VI - Produção de CB após 240 horas e variação de pH nos cultivos C1	72
Tabela VII - Produção de CB após 240 horas e variação de pH nos cultivos C2	73

Sumário

1 - Introdução	20
1.1 - Celulose Bacteriana - Características e aplicações	21
1.1.1 Um pouco sobre a biossíntese da celulose bacteriana	26
1.1.2 Avanços na produção de celulose bacteriana	27
1.2 - Colágeno	34
1.3 - Nanocompósitos	38
2 - Objetivos	41
3 - Materiais e Métodos	42
3.1 - Preparo das membranas de celulose bacteriana	43
3.1.1 - Obtenção da curva de consumo de carboidratos	44
3.1.2 - Obtenção da curva de crescimento	45
3.2 - Caracterização das membranas de celulose bacteriana produzidas	45
3.2.1 - Difractometria de raios-X	45
3.2.2 - Espectroscopia Vibracional na Região do infravermelho	45
3.2.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura.	46
3.2.4 - Análise Termogravimétrica.	46
3.2.5 - Grau de Polimerização	46
3.2.6 - Teste de Intumescimento	49
3.2.7 - Ângulo de Contato	49
3.3 - Produção de Celulose Bacteriana em cultivo agitado	50

3.4 - Adição de colágeno <i>in situ</i>	50
4 - Resultados e Discussão	52
4.1 - Produção de CB	52
4.1.2 - Curva de Crescimento	53
4.1.3 - Produção de CB	54
4.1.4 - Variação do pH	57
4.1.5 - Quantificação de Açúcares – DNS	59
4.1.6 - Grau de Polimerização	60
4.1.7 - Difractometria de Raios-X- DRX	60
4.1.8 - Espectroscopia Vibracional na região do IV	61
4.1.9 - Análise Térmica	63
4.1.10 - Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	64
4.1.11 - Teste de Intumescimento	67
4.2 Produção de Celulose Bacteriana em cultivo agitado	69
4.3 - Produção dos compósitos à base de CB e Colágeno <i>in situ</i>	74
4.3.1 - Caracterização dos compósitos à base de CB e colágeno produzido <i>in situ</i>	75
4.3.1.1 - Difractometria de raios-X.	75
4.3.1.2 - Espectroscopia Vibracional na região do IV	77
4.3.1.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura.	78
4.3.1.4 - Análise Térmica	81
4.3.1.5 - Teste de Intumescimento	82
4.3.1.6 - Ângulo de Contato	83

5 - Conclusões	86
-----------------------	-----------

Referências	88
--------------------	-----------

Anexo 1 - Adições <i>in situ</i> durante a produção de celulose bacteriana	
---	--

1. Introdução

A celulose bacteriana (CB), sintetizada principalmente pela bactéria Gram-negativa, *Gluconacetobacter xylinus*, anteriormente denominada *Acetobacter xylinum*, apresenta numerosas aplicações em diferentes setores (CZAJA, *et al*, 2006), o que pode ser visto na Tabela II. É quimicamente pura, hidrofílica e com cristalinidade superior à celulose vegetal. Essas propriedades, aliadas à estrutura tridimensional nanométrica, conferem um amplo leque de aplicações que vão desde a indústria de papel e têxtil até a indústria eletrônica. Na área médica destaca-se a aplicação como substituto temporário da pele no tratamento de queimaduras e feridas de difícil cicatrização. A CB é ainda uma excelente matriz para incorporação de colóides metálicos ou dielétricos, como por exemplo, os colóides de prata e ouro que são muito promissores em termos de aplicação, devido às suas propriedades ópticas (FINK, *et al.*, 1998; CAI *et al.*, 2009).

No caso da aplicação em biomateriais, o uso de colágeno tipo I bovino inserido na CB merece destaque, pois pode aumentar as características relacionadas à biocompatibilidade e propriedades osteocondutoras (WIEGAND *et al.*, 2006). Atualmente tem crescido muito o interesse no desenvolvimento de *scaffolds* ou membranas à base de CB tanto para regeneração tecidual quanto para regeneração óssea. Outras aplicações como compósitos também têm sido relatadas (SENA, 2006; WAN *et al.*, 2007), incluindo a adição de hidroxiapatita, para aumentar a biocompatibilidade do biomaterial na reconstrução óssea. EVANS e colaboradores (2003) inseriram paládio na CB, para obtenção de célula combustível. Outros autores citam a inserção de pectina (CHANLIAUD & GIDLEY, 1999) e carboximetilcelulose (SEIFERT *et al.*, 2004) entre outros, mostrando a versatilidade dos compósitos baseados em CB.

É vasta a literatura que trata das diferentes aplicações da CB (EICHHORN *et al.*, 2010) já que é um polímero com grande potencial de uso, mas com deficiências quanto à sua produção em escala industrial (SHODA & SUGANO, 2005). Autores têm sugerido a necessidade de aumentar a produtividade industrial da CB não só por meio do melhoramento genético da *Gluconacetobacter xylinus*, que é o microrganismo com a maior capacidade de produção deste biopolímero, mas também em melhorias dos meios de cultura e das metodologias de extração e (PECORARO *et al.*, 2008; KLEMM *et al.*, 2005)

1.1. Celulose Bacteriana – Características e aplicações

A celulose é um homopolissacarídeo linear formado por unidades de β -D-glicopirranose unidas em cadeias longas, não ramificadas, por ligações glicosídicas β (1 $\rightarrow$ 4) (Figura 1). É considerado o biopolímero mais abundante no mundo, com uma produção estimada de 10^{14} toneladas por ano e de grande importância econômica (ASTLEY *et al.*, 2001). Ela pode ser encontrada nas diferentes formas de vida como em plantas verdes, fungos, protozoários, e seres procariontes (KLEMM *et al.*, 2005) e dividida em dois grupos: 1. Grupo da celulose pura, obtida diretamente de seu estado natural, no qual se encontra a celulose bacteriana; 2. Grupo da celulose complexa, que inclui a maior parte da celulose presente na natureza, componente fundamental da parede celular de plantas superiores, que contêm outros componentes como lignina, pectina e hemicelulose (CZAJA *et al.*, 2006).

Atualmente acredita-se que a CB, um dos biopolímeros mais promissores, possa se tornar um dos produtos biotecnológicos mais importantes tanto para área da saúde quanto para o setor industrial, pois pode ser obtida em larga escala e baixo custo a partir

de rotas biossintéticas por meio de bactérias de alguns gêneros como: *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes* e a forma de obtenção desta, a torna livre de impurezas além de diminuir o custo final do produto (CZAJA *et al.*, 2006).

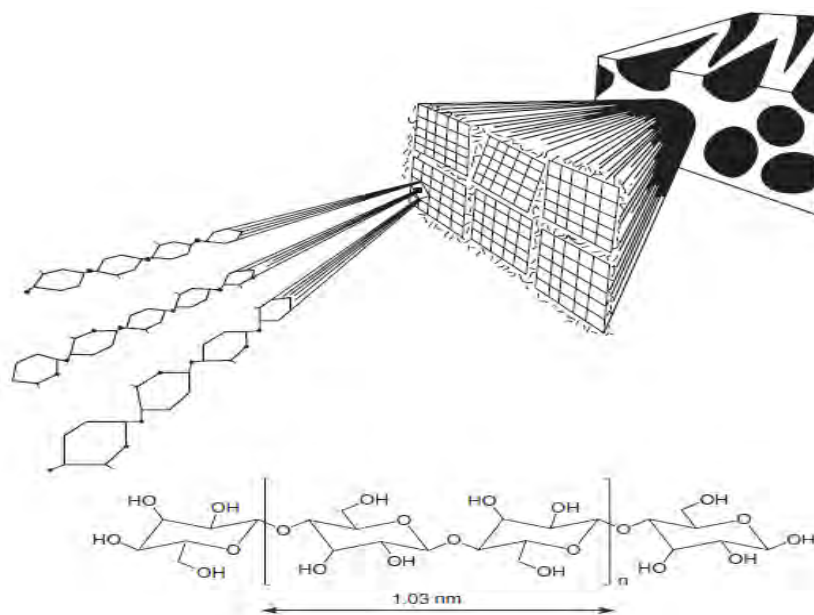


Figura 1 – Visão esquemática dos componentes das fibras de celulose (PECORARO *et al.*, 2009)

A membrana formada durante a síntese resulta numa estrutura tridimensional constituindo um sistema de nanofibras (3-8 nm), cujas fibras são orientadas uniaxialmente, o que não ocorre em celulose vegetal. Esta estrutura 3-D da CB resulta numa celulose cristalina (65-80%) quando comparado a celulose vegetal e com maior resistência mecânica (CZAJA *et al.*, 2006). Essas propriedades são conferidas pelas ligações de hidrogênio inter e intra-molecular que mantêm as cadeias de celulose unidas favorecendo uma alta retenção de água (Tabela I).

Tabela I - Comparativo das propriedades da celulose vegetal (CV) e da celulose bacteriana (CB) (PECORARO *et al.*, 2009; KLEMM *et al.*, 2005)

Propriedades	CV	CB
Cristalinidade	56-65%	65-79%
Grau de polimerização	300-1700	800-10000
Comprimento das fibras	1,4-4,0 X 10 ⁻² mm	70-80 mm
Modulo de Young	5,5-12,6 GPa	15-30 GPa
Conteúdo de água	60%	98,50%

Industrialmente a celulose é muito usada na produção de papel, na indústria madeireira, como emulsificador, agente dispersante, agente gelificante, entre outras. Atualmente a madeira do eucalipto tem sido uma das principais fontes industriais de celulose sendo composta por celulose (40 a 45%), lignina (25 a 30%), hemiceluloses (30%) e extrativos (até 4%) (ROWELL, 2005).

A bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, anteriormente denominada *Acetobacter xylinum* (YAMADA *et al.*, 1997), foi descrita pela primeira vez no final do século XIX (BROWN, 1886), quando uma análise microscópica de uma manta formada na superfície do caldo de fermentação do vinagre, revelou a presença de bactérias distribuídas por toda área superficial da mesma. O mecanismo de cristalização das microfibrilas em *G. xylinus* pode dar origem a duas aloformas de celulose: a celulose I, constituída por microfibrilas que se orientam de forma paralela e a celulose II, composta por microfibrilas que se orientam de forma antiparalela (KENNEDY *et al.*, 1995; SJOSTROOM, 1981).

A celulose bacteriana possui a mesma fórmula molecular que a celulose vegetal, mas suas fibras em dimensões nanométricas dão à CB propriedades distintas. Entre essas propriedades destacam-se a alta resistência mecânica e à tração, a possibilidade de inserção de materiais para obtenção de compósitos, e mais recentemente, essas inserções têm sido

feitas “*in situ*”, durante o cultivo da bactéria *G. xylinus* (EICHHORN *et al.*, 2010), o que tem expandido muito o interesse pelo uso deste polímero nos últimos anos (Figuras 2 e 3).

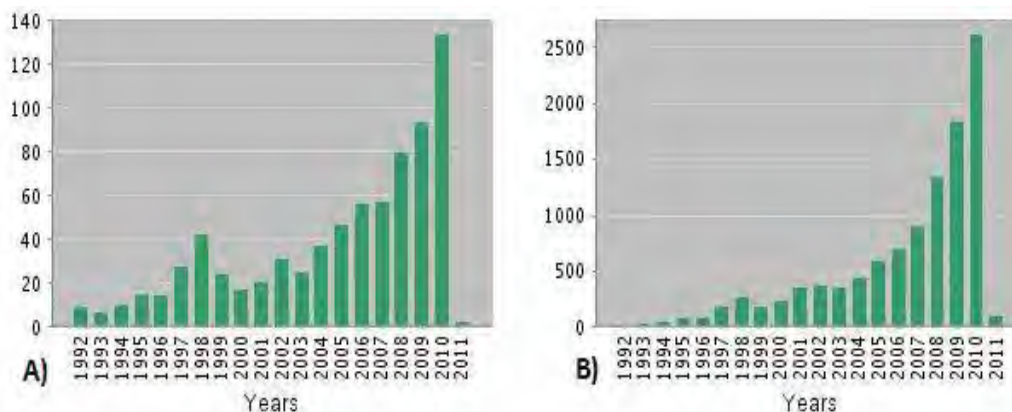


Figura 2: Pesquisa de artigos realizada na Web of Science (fevereiro de 2011) com a palavra “Bacterial Cellulose”, em (A) número de Publicações e em (B) de citações no período.

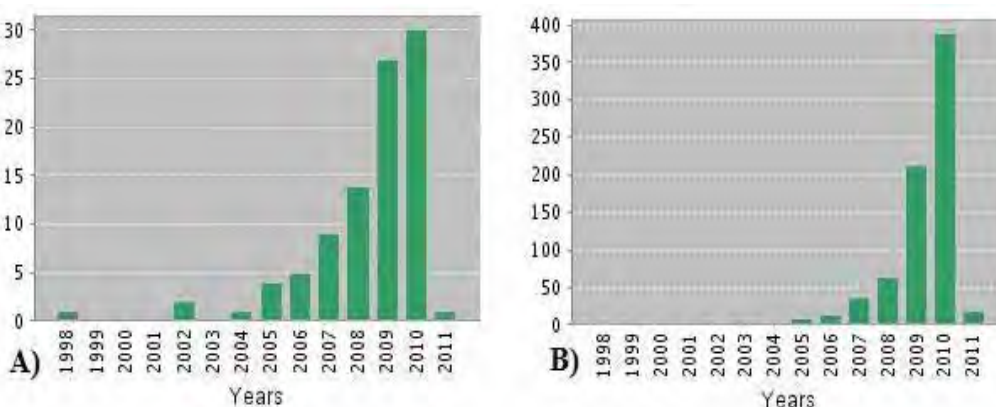


Figura 3: Pesquisa de artigos realizada na Web of Science (fevereiro de 2011) com as palavras “Bacterial Cellulose” e “Nanocomposites”, em (A) número de Publicações e em (B) de citações no período.

Entre as diversas aplicações biotecnológicas da membrana de CB, alguns exemplos seriam em regeneração tecidual como o Biofill da empresa brasileira Bionext (JONAS & FARAH, 1998), nos biomateriais da norte-americana Xylos (CZAJA *et al.*, 2006), o implante vascular artificial Basyc (KLEMM *et al.*, 2006), no diafragma para

fonos de ouvido da multinacional japonesa Sony (YAMANAKA *et al.*, 2005), mais recentemente na utilização como substrato para OLEDs (LEGNANI *et al.*, 2008), e como base para compósitos pela inserção de: prata (SANTA MARIA *et al.*, 2009), fosfato (BARUD *et al.*, 2007), pectina (CHANLIAUD & GIDLEY, 1999), amido (GRANDE *et al.*, 2009), termoplásticos BROWN, 2007), ouro em condutividade elétrica (PINTO *et al.*, 2007) e biosensores (ZHANG *et al.*, 2010), sílica (BARUD *et al.*, 2008), entre outros (BARUD *et al.*, 2009). Outras aplicações podem ser visualizadas na Tabela II.

Tabela II – Aplicações da Celulose Bacteriana

Área	Aplicação
Cosméticos	Estabilizador de emulsões como cremes tônicos, condicionadores, polidores de unhas.
Indústria Têxtil	Roupas para esportes, tendas e equipamentos de camping.
Mineração e Refinaria	Esponjas para coleta de vazamento de óleo, materiais para absorção de toxinas.
Tratamento de lixo	Reciclagem de minerais e óleos.
Purificação de esgotos	Purificação de esgotos urbanos, ultra-filtração de água.
Comunicações	Diafragmas para microfones e fones estéreos.
Indústria de Alimentos	Celulose comestível (“nata de coco”).
Indústria de Papel	Substituição artificial de madeira, papéis especiais.
Medicina	Pele artificial temporária para queimaduras e úlceras, componentes de implantes dentários.
Laboratórios	Imobilização de proteínas de células, técnicas cromatográficas, meio para cultura de tecidos.
Eletrônica	Materiais opto-eletrônicos (telas de cristal líquido, suporte para OLED).
Energia	Membranas célula combustível (paládio).

1.1.1. Um pouco sobre a Biossíntese da Celulose Bacteriana

G. xylinus é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família Acetobacteriaceae (CLEENWERCK *et al.*, 2009), aeróbia estrita que realiza a oxidação incompleta de diversos açúcares e alcoóis, tendo como hábitat natural frutos e vegetais em processo de decomposição. A produção de celulose bacteriana (CB) por *G. xylinus* pode ser obtida em laboratório utilizando cultivos tanto em meios sólidos como líquidos. Para a bactéria, a CB funciona como mecanismo de flotação, permitindo ao microrganismo permanecer em uma interface ar/líquido para obter oxigênio com maior facilidade para seu crescimento. Além de atuar como barreira física que protege a bactéria da radiação ultra-violeta, a CB aumenta a capacidade de colonizar substratos e seu caráter higroscópico permite a retenção de umidade prevenindo a desidratação do substrato (WILLIAMS & CANNON, 1989).

Devido sua complexidade a *G. xylinus* tem sido considerada um organismo modelo para o estudo da biossíntese de celulose (CHAVEZ-PACHECO *et al.*, 2004). A síntese de celulose por *G. xylinus* constitui um complexo processo que envolve três etapas principais. A primeira refere-se à polimerização dos resíduos de glicose em cadeias β_{1-4} -glucana (ROSS *et al.*, 1991; SAXENA & BROWN, 2005). A segunda etapa corresponde à secreção extracelular das cadeias lineares e a terceira corresponde à organização e cristalização das cadeias de glucanas, por meio de ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals dispostas hierarquicamente em tiras, resultado desse processo é a formação de uma estrutura tridimensional resistente denominada microfibrila. A CB produzida por *G. xylinus* apresenta duas características particulares: sua polaridade unidirecional e sua espessura variável (CHAVEZ-PACHECO *et al.*, 2004).

A biossíntese da CB (Figura 4) depende de duas vias anfibólicas importantes, a via das pentoses e o ciclo de Krebs (ROSS *et al.*, 1991; CHAVEZ-PACHECO *et al.*, 2004). *G.*

xylinus é incapaz de metabolizar a glicose anaerobicamente devido à carência da fosfofrutoquinase-1, enzima responsável pela catálise da reação de fosforilação da frutose-6-fosfato gerando frutose-1,6-difosfato, o que inviabiliza a glicólise. Assim, a síntese da celulose em *G. xylinus* resulta de um *pool* metabólico de hexose fosfato que é sustentada diretamente pela fosforilação de hexoses exógenas e indiretamente pela via das pentoses e gliconeogênese. A conversão da hexose fosfato em celulose é direta, não dependendo, necessariamente, de clivagens intermediárias do esqueleto carbônico (ROSS *et al.*, 1991).

A síntese de celulose por *G. xylinus* se dá a partir da glicose transportada do meio externo para o citoplasma da bactéria ou de fontes internas. A conversão da glicose transportada do meio externo para o citoplasma bacteriano é catalisada por quatro enzimas, sendo elas: Glicoquinase, que é a enzima responsável pela fosforilação do carbono 6 da glicose, a Fosfoglicomutase que catalisa a reação de isomerização da glicose-6-fosfato para glicose-1-fosfato, a UDPG-pirofosforilase (glicose-1-fosfato uridililtransferase) que sintetiza a UDP-glicose (UDPG) e a Celulose Sintase (CS) que produz a celulose a partir de UDP-glicose. A síntese da celulose, a partir de fontes endógenas, se dá a partir da gliconeogênese que, em *G. xylinus*, ocorre a partir do oxalacetato, via piruvato, devido a um mecanismo de regulação não comum das enzimas oxalacetato descarboxilase e a piruvato fosfato quinase, que converte o piruvato a fosfoenolpiruvato (SWISSA *et al.*, 1980; KRYSTYNOWICZ *et al.*, 2005). A reação de síntese de CB constitui um processo oneroso para a célula, consumindo cerca de 10% do ATP gerado no metabolismo bacteriano, assim, a energia empregada para a síntese da CB é proveniente do metabolismo aeróbio (ROSS *et al.*, 1991). Existem diferentes propostas quanto ao substrato utilizado pela CS. Uma hipótese propõe a ligação da UDP-glicose a lipídios da membrana plasmática (MATTHYSSE *et al.*, 1995; HAN & ROBYT, 1998). Outra hipótese considera que o precursor solúvel interage diretamente com a CS (BROWN & SAXENA, 2000).

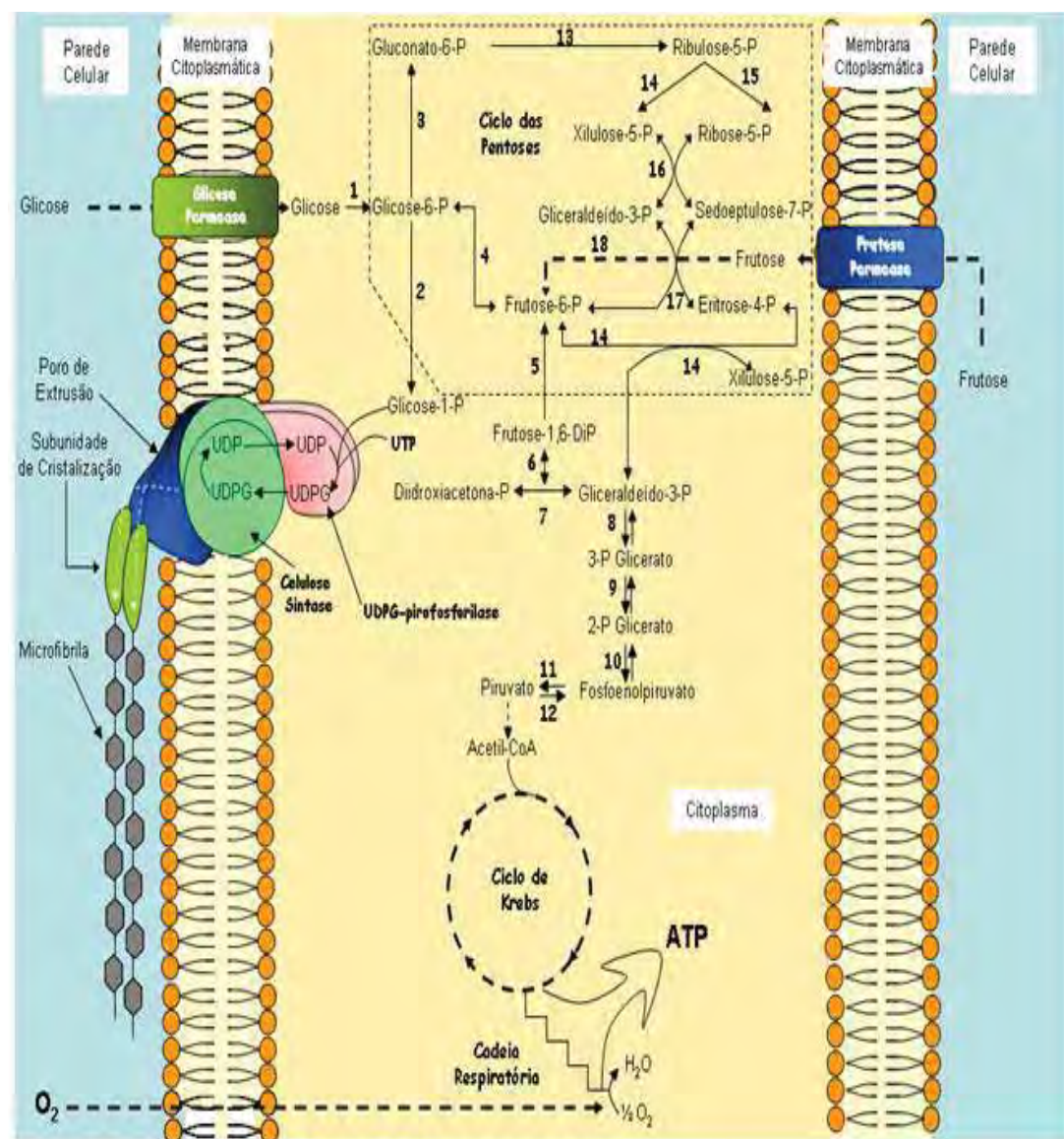


Figura 4 – Modelo hipotético da rota metabólica para a biossíntese de celulose por *G. xylinus* – Glicoquinase ATP (1); Fosfoglicomutase (2); Glicose 6-fosfato desidrogenase (3); Fosfoglicoisomerase (4); Frutoquinase ATP (5); Aldolase (6); Triose fosfato isomerase (7); Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (8); Fosfogliceratomutase (9); Enolase (10); Piruvatoquinase (11); Piruvato difosfato quinase (12); 6-fosfogliconato desidrogenase (13); Fosforibulose epimerase (14); Fosforibulose isomerase (15); Transacetolase (16); Transaldolase (17); Frutoquinase (18); Piruvato desidrogenase (19)
 Fonte: DONINI *et al.*, (no prelo).

A celulose sintase (CS) é um complexo protéico constituído de três (AxCcSAB, AxCcSC e AxCcSD) ou quatro (AxCcSA, AxCcSB, AxCcSC e AxCcSD) subunidades protéicas codificadas por genes existentes em um operon *bcs* cromossomal. AxCcSA e AxCcSAB apresentam um motivo constituído por D,D,D,Q-X-X-R-W, completamente conservado em glicosiltransferases (KAWANO *et al.*, 2002). Através da análise funcional da CS, verifica-se que a subunidade A desse complexo, com 83kDa, apresenta atividade catalítica. A subunidade B, de 90kDa, aumenta a velocidade de síntese da celulose, associando-se a um regulador alostérico positivo, o ácido cíclico diguanílico (c-di-GMP). As subunidades C (138kDa) e D (17kDa) parecem apresentar atividade estrutural. Tem sido hipotetizado que a subunidade C encontra-se relacionada com a formação de poros de extrusão da celulose e a subunidade D parece estar relacionada com o processo de cristalização, pois cepas mutantes do gene que codifica para a produção da subunidade D ainda são capazes de produzir celulose II (SAXENA *et al.*, 1994).

1.1.2. Avanços na produção de celulose Bacteriana

A formação da membrana de CB pode ocorrer não apenas em meio estático, mas também em cultivos dinâmicos, ou seja, agitados, como em biorreatores ou em frascos com agitação (Figura 5). Nestes casos o material produzido tem baixa resistência mecânica, e se apresentam na forma de *pellet* ou como um emaranhado de fibras. Apesar disso, estes métodos têm sido utilizados como meio alternativo para aumentar a produção de CB para fins industriais.

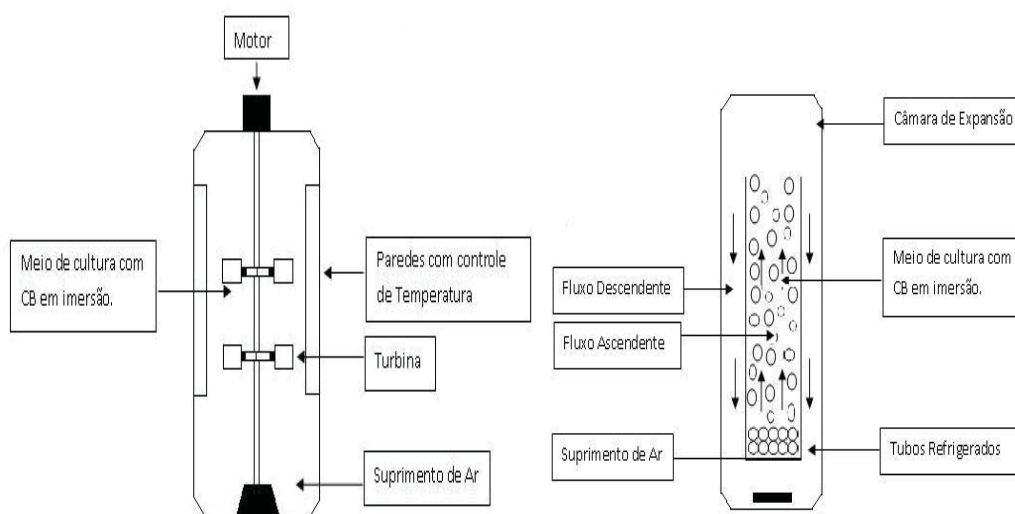


Figura 5: Tipos de Biorreatores mais utilizados na produção de celulose bacteriana.
a) Biorreator de Tanque Agitado e b) Biorreator Airlift;

Durante a formação da membrana é possível inserir diversos materiais no próprio meio de cultura, para o desenvolvimento de compósitos à base de CB (CZAJA *et al.*, 2006). Esta forma de obtenção de compósitos pode ser considerada uma inserção *in situ*, pois acontece durante o cultivo de *Gluconacetobacter xylinus*, que insere materiais na sua rede de fibras através da difusão dos mesmos no meio, o que leva à formação de estruturas com qualidades adicionais. As adições *in situ* vêm sendo bastante utilizadas, a exemplo da hidroxiapatita (WAN *et al.*, 2007) e colágeno (LUO *et al.*, 2008) em regeneração óssea guiada e nanotubos de carbono (JUNG *et al.*, 2008; YAN *et al.*, 2008) que possui diversas aplicações tecnológicas. Essa possibilidade de inserção de materiais nas fibras de CB, não só através do cultivo, mas também com a membrana *in natura*, levaram recentemente à uma multiplicação das pesquisas com a CB. Além disso, as fibras em escala nanométrica da CB explicam a alta resistência mecânica, que durante a dinâmica de sua biossíntese, através da automontagem de camadas formadas pela sobreposição de fibras oriundas dos poros de *G. xylinus* (HIRAI *et al.*, 2004;

HORNUNG *et al.*, 2009), formam uma resistente trama que através de sua manipulação e utilização, abrem diversas possibilidades de inovações tecnológicas e aplicações comerciais e científicas (KLEMM *et al.*, 2005). Podem-se encontrar maiores detalhes e exemplos a respeito das inserções feitas *in situ* na Tabela apresentada no anexo I.

Existe atualmente, um grande interesse com relação ao aumento substancial da produtividade da CB. Diversos autores têm trabalhado sobre este enfoque, utilizando diferentes formas de cultivo como em biorreatores e cultivos agitados, em contraste com o cultivo tradicional de meio de estático, além de variações nas condições de suplementação. A maior produtividade encontrado na literatura foi de 15,3 g/L em 50 horas de cultivo, outros resultados estão listados na Tabela III.

Tabela III. Maiores produções de Celulose Bacteriana encontradas na literatura.

Bactéria	Fonte de Carbono	Suplementação	Tempo de Cultivo (horas)	Produção (g/L)	Ref.
<i>G. xylinus</i> BRC 5	Glicose	Etanol e oxigênio	50	15,3	HWANG <i>et al.</i> , 1999
<i>G. xylinus</i> BPR 2001	Melaço	-	72	7,82	COLVIN & WITTER, 1983
<i>G. xylinus</i> BPR 2001	Frutose	Agar e oxigênio	72	14,1	YAMANAKA & SUGIYAMA, 2000
<i>G. xylinus</i> BPR 2001	Frutose	Agar	56	12	YAMANAKA & SUGIYAMA, 2000
<i>G. xylinus</i> ssp. <i>sucrofermentans</i>	Vários	Ácido Acético	101	28,4	VANDAMME <i>et al.</i> , 1998
<i>G. xylinus</i> ssp. <i>sucrofermentans</i> BPR 2001	Frutose	Oxigênio	52	10,4	WITHNEY <i>et al.</i> , 2006
<i>Acetobacter</i> SP A9	Glicose	Etanol e oxigênio	192	15,2	SON <i>et al.</i> , 2001
<i>G. xylinus</i> ssp. <i>sucrofermentans</i> BPR 2002	Frutose	Agar e oxigênio	44	8,7	MIKKELSEN <i>et al.</i> , 2009

Quase que a totalidade da produção mundial de celulose para usos comerciais é feita pela obtenção através das plantas. Para a obtenção da celulose vegetal (CV) é necessário a sua separação de outros compostos como hemicelulose e lignina, através de reações extremamente poluentes que ao serem realizadas produzem compostos como os organoclorados, entre outros, igualmente nocivos ao meio ambiente (BELLOTE, *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2001). Em contraste à obtenção da CV, a celulose bacteriana tem processos de *downstream* e *upstream* simples, não contendo qualquer composto indesejado, com economia de produção, que após a eliminação de *G. xylinus*, e o processo de desidratação, pode ser prontamente utilizada (JONAS & FARAH, 1998). Têm-se, com isso, um produto com elevada aplicabilidade industrial, mais versátil, econômico e também ecologicamente sustentável, tanto pela diminuição de impacto ambiental ao eliminar da produção os efluentes tóxicos, como também pela não utilização de terras agricultáveis para a produção de madeira, aumentando assim, a disponibilidade de áreas para a produção de alimentos.

Apesar de todas essas qualidades, ainda não existe uma planta de produção de CB em grande escala, devido à falta de otimização do cultivo, dos meios de cultura e metodologias de extração, o que tem resultado em uma produção incompatível com a demanda por celulose.

Diante das inúmeras aplicações da CB e do seu caráter sustentável e a atual perspectiva de mercado para com a celulose e seus derivados (MATTOS & VALENÇA, 2000), é oportuna uma comparação de produtividades entre celulose bacteriana e vegetal. Neste caso, considerando 1 hectare de eucalipto com Incremento Médio Anual (IMA) de 50 m³, e uma densidade média de aproximadamente 500 kg por m³, têm-se uma produção de 25 toneladas por hectare por ano. Com um plantio de 7 anos com um teor de aproximadamente 45% de celulose, tem-se em torno de 80 toneladas de celulose

por hectare após 7 anos de cultivo (GOMIDE *et al.*, 2005). A mesma produção seria alcançada com a celulose bacteriana a uma produção hipotética de 15 gramas por litro em 50 horas (média de 0,3 gramas por hora), em um biorreator de 500 m³. Tem-se, neste caso, uma produção de celulose bacteriana equivalente a 1 hectare de eucalipto em sete anos, produzida em aproximadamente 22 dias. Soma-se a isso a obtenção de um produto puro e ecologicamente sustentável.

Um novo enfoque na otimização da produção de CB seria a biologia molecular da bactéria, através do mapeamento do seu genoma, abrindo novas perspectivas pela manipulação da via metabólica de CB ou via clonagem de seus genes em outros microrganismos com maior potencial de produção. NOBLES e BROWN (2008) clonaram genes de *G. xylinus* na cianobactéria *Synechococcus leopoliensis*, mimetizando a produção de celulose, e obtiveram bons resultados. Estes podem ser levados à escala industrial, principalmente na utilização da celulose como substrato para a produção de biocombustíveis de segunda geração, como o etanol de celulose, devido à semi-cristalinidade do material, que pode ser usada como alvo para enzimas hidrolíticas, que atacam preferencialmente a fase amorfa da celulose (KARLSSON & ALBERTSSON, 1998). ISHIDA e colaboradores (2002) bloquearam a produção de ácido acético através de uma mutação na linhagem de *G. xylinus* BPR 2001, dando o nome de EP1 para a linhagem mutante, para avaliar o produção de celulose. O resultado foi uma diminuição na produção de celulose em comparação com a linhagem não transformada. De fato o meio sem acetona, tornou-se heterogêneo, diminuindo a aeração e a razão de oxigênio solúvel, o que mostra que a acetona tem importância no cultivo pela diminuição de viscosidade e conseqüente aumento da aeração e da difusão de substratos no meio. Estes exemplos mostram algumas das possibilidades a serem

alcançadas pela biotecnologia atual, que em ritmo crescente, pode contribuir com novos avanços neste campo (LUO *et al.*, 2008).

1.2 Colágeno

Os polímeros fibrosos são os principais componentes estruturais dos tecidos, sendo extremamente importantes e versáteis, desde organismos unicelulares até animais e plantas. Exemplos destes polímeros são os polissacarídeos como a celulose e a quitina, elementos estruturais de plantas e cutículas de insetos respectivamente e uma ampla variedade de proteínas estruturais, como o colágeno, queratina, actina e miosina. A importância estrutural destes materiais decorre, principalmente, de suas propriedades mecânicas, sendo estas mais resistentes na direção paralela às fibras, do que na perpendicular, consistindo em propriedades anisotrópicas. A estrutura dos materiais constituídos de tais fibras é dotada de montagens hierárquicas, que privilegiam suas características mecânicas e visam um aumento na resistência à tração, evidenciado pela elevação do módulo de Young (WEINER & WAGNER, 1998; FRATZL, 2007).

O colágeno é a principal proteína fibrosa insolúvel na matriz extracelular (MEC) e no tecido conjuntivo, sendo a proteína mais abundante no reino animal. No homem, o colágeno representa mais de 30% de sua proteína total, sendo que existem em torno de 28 tipos diferentes e com variadas funções. Tem importância na indústria alimentícia, na produção de gelatina, que constitui um alimento de baixo índice calórico e nutricional. Contudo entre 80 e 90% do colágeno corporal são constituídos principalmente por aqueles dos tipos I, II, e III, cujas moléculas unem-se em um sistema empacotado para formar finas fibrilas (FRATZL, 2008). O colágeno do tipo I é encontrado na pele, tendão, osso e dentina; o do tipo II, na cartilagem e corpo vítreo e o do tipo III na pele,

músculo e vasos sendo que, freqüentemente acompanha o do tipo I (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). O colágeno do tipo I é a proteína animal mais abundante, e este é o principal constituinte orgânico da matriz óssea, e também está presente na pele e outros tecidos; suas fibrilas possuem enorme resistência à tensão, as quais podem ser estiradas sem que se rompam, até o seu limite de resistência. (FRATZL, 2008). Estas fibrilas medem aproximadamente 50 nm de diâmetro e vários micrometros de comprimento estando empacotadas lado a lado paralelamente em feixes, chamadas fibras de colágeno (Figura 6).

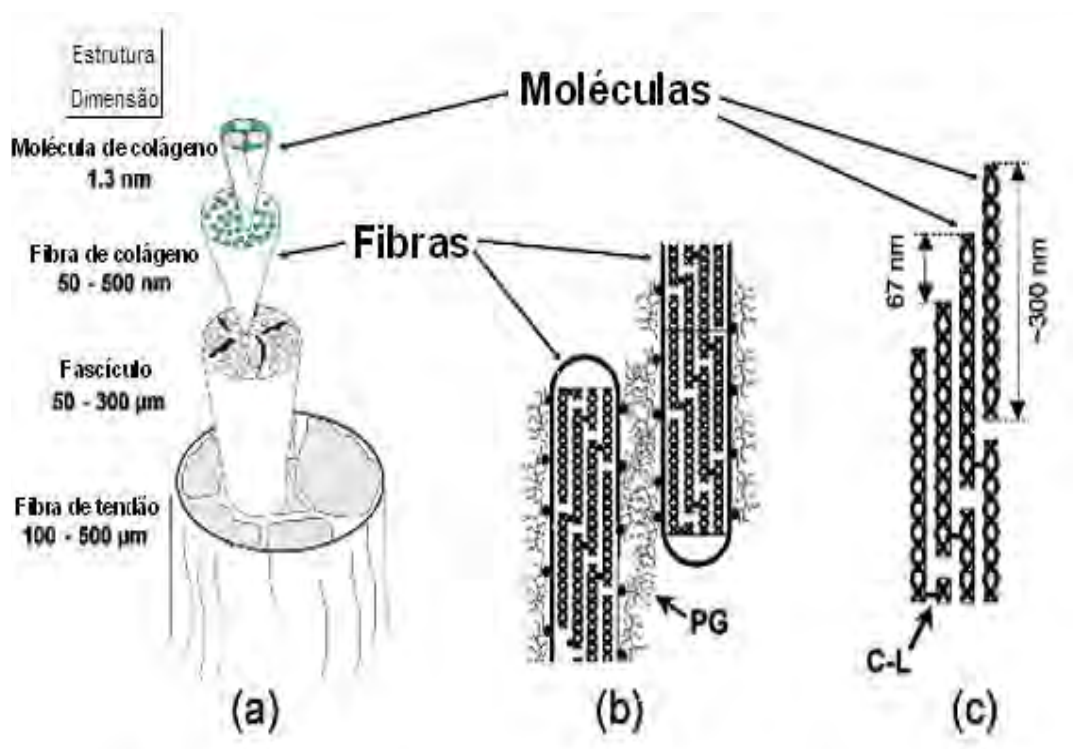


Figura 6 – Organização hierárquica do colágeno. O desenho ilustra a estrutura de um tendão. a) mostra algumas estruturas com respectivas dimensões; b) e c) mostram interações entre fibras e moléculas respectivamente. A matriz entre as fibras é rica em proteoglicano (PG), e as ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno são indicadas por (C-L). Fonte: BUEHLER, 2006.

A estrutura do colágeno é uma tripla hélice constituída de uma sequência repetitiva de três aminoácidos, glicina-prolina-X (onde x é qualquer aminoácido), formando as fibrilas colágenas, que são os blocos de construção básicos dos mais variados e complexos tecidos e que formam as fibras colágenas, e que têm algumas centenas de nanômetros de espessura (Figura 7). A aparência do conjunto seria a de uma corda, ou seja, em espiral, proporcionando grande resistência estrutural (BUEHLER, 2006).

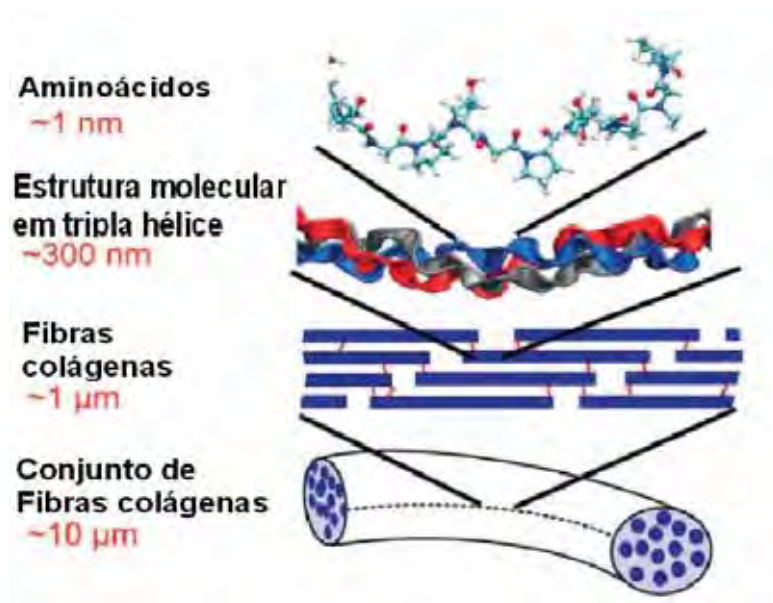


Figura 7 – visão esquemática da hierarquia estrutural do colágeno, começando com a sequência de aminoácidos a nível nanométrico, até as fibras colágenas e seu arranjo, de ordem micrométrica. Fonte: BUEHLER, 2006.

A família de moléculas protéicas colágenas é ampla e possui importantes funções no corpo humano, a análise de tais moléculas, com pequenas diferenças, permite a elucidação de doenças e a produção de culturas de células fora do organismo, fruto dos conhecimentos em biologia celular e bioquímica contemporâneos. As pequenas diferenças entre as famílias são justificadas pela complexa síntese do

colágeno, que permite a formação de novas moléculas por defeitos, e que a pressão seletiva se encarrega por selecionar quais serão propagadas (BUEHLER, 2006). Alguns destes defeitos são os causadores de doenças, decorrentes da produção diminuída ou excessiva de colágeno. Dentre estas enfermidades está a síndrome de Ehler Danlos, que é um exemplo de baixa produção, levando à fragilidade da pele, tendões e ligamentos, que acabam por ocasionar graves lesões, pois se rompem facilmente. Já a produção excessiva do colágeno pode levar à esclerose múltipla progressiva, atingindo uma ampla variedade de tecidos, haja vista a versatilidade do colágeno, mas neste caso, impossibilitando os movimentos e até dificultando a fala (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

As membranas de colágeno quando não mineralizadas são normalmente frágeis (baixa resistência mecânica) dificultando sua manipulação clínica. A grande vantagem é que possuem excelente afinidade celular, estimulando a quimiotaxia de fibroblastos e agindo como suporte de migração dessas células (osteocondução). Outras vantagens são: boa adaptação a superfícies ósseas, principalmente de raízes dentárias e efeito hemostático (DUSKOVA *et al.*, 2006). Quando embebidas na matriz óssea são gradualmente metabolizadas pela remodelação óssea, ou ainda, podem ser incorporadas parcialmente na matriz óssea. A reabsorção do colágeno ocorre paralelamente a neoformação óssea, bem como, junto à neoformação de tecidos periodontais como cemento e ligamentos periodontais. Este tipo de membrana, quando aplicada na regeneração óssea guiada (ROG) em cirurgias periodontais, resulta em regeneração em um período de 6 a 8 semanas, dependendo da resistência do material e sua reabsorção pode variar de 4 a 6 meses (HÜRZELER *et al.*, 1998).

As membranas de colágeno desenvolvidas nos últimos anos têm apresentado características físico-químicas ideais para adesão dos tecidos, sendo que o osso

neoformado é protegido contra o crescimento de tecido conjuntivo dentro da região do defeito; apesar de impedir infiltração celular, esta membrana é permeável para nutrientes, e a degradação ocorre através de reações enzimáticas sem irritar os tecidos adjacentes. Os resultados revelam que esta membrana possui adequada resistência mecânica, pois consegue favorecer a manutenção do espaço a ser regenerado, semelhante às membranas não reabsorvíveis. Estudos com membrana de colágeno em ROG têm relatado resultados satisfatórios *in vivo*, por exemplo, a taxa de regeneração óssea possui efetividade similar às membranas de e-PTFE (Politetrafluoretileno expandido), isto devido ao advento de membranas de colágeno com boa resistência mecânica.

1.3. Nanocompósitos

Milhares de materiais são conhecidos e estão disponíveis para o design e manufatura de produtos para diversas aplicações, as quais dependem de características como rigidez, força, densidade e temperatura de fusão. Neste contexto, a classe dos materiais compósitos tem sido bastante estudada nos últimos anos, sendo de grande interesse econômico e industrial (MANO & MENDES, 1999). Com a utilização desses materiais procura-se evidenciar em cada um, as melhores propriedades de cada constituinte.

Um material compósito pode ser definido como um material multifase exibindo uma combinação de resultados que o torna superior a cada fase de sua composição. As propriedades finais do material compósito devem ser melhores que dos materiais constituintes (MAZUNDAR, 1991).

A aplicação de materiais poliméricos como matrizes para compósitos tem aberto novas e inovadoras possibilidades, com materiais cada vez mais elaborados. Isso se deve à um progresso no conhecimento das correlações entre estrutura e propriedades e da influência que cada condição exerce sobre as características do produto acabado. De fato, os materiais poliméricos possuem diferenças estruturais relacionadas ao processo de produção, que estão intimamente ligadas ao seu desempenho, sendo estas diferenças mais evidentes do que nos metais ou nas cerâmicas (CALLISTER, 2007). Além disso, os polímeros têm sido utilizados em compósitos, pois são mais estáveis e de menor custo de produção, comparando-se com os metais, por exemplo. A possibilidade de uso em compósitos leva à uma ampla gama de utilização passando pela área eletrônica, até as embalagens biodegradáveis e ecologicamente amigáveis, como por exemplo o PHB (Poli (β -hidroxibutirato), o Poli (β -hidroxibutirato-co-valerato), o PCL (Poli (ϵ -caprolactona), que são base para a produção de compósitos biodegradáveis além de suas blendas (BERTOLINI, 2007).

O conceito de compósitos não foi inventado pelos seres humanos, eles são encontrados na natureza, como por exemplo, a madeira que é um compósito de fibras de celulose em uma matriz de lignina; o casco dos invertebrados, como as ostras e diatomáceas também são exemplos de compósitos, com isso pode-se tirar proveito dessa alternativa e lançar mão do uso de sistemas biomiméticos que são materiais que mimetizam a natureza, fazendo sinteticamente o que a evolução cunhou em milhares de anos (CALLISTER, 2007).

Há pouco mais de cinquenta anos o termo compósito foi pela primeira vez citado industrialmente em projetos estruturais, na indústria aeronáutica e aeroespacial. Atualmente, compósitos tem sido aplicados nas mais diversas áreas tais como: indústria automobilística, marinha, construções civis, área médica, entre outras. Tipicamente um

material compósito é formado por fibras reforçadas em uma matriz de resina. Os reforços podem ser fibras, partículas, e as matrizes podem ser polímeros, cerâmicas, e metais, já as fibras podem ser contínuas, longas ou curtas, compósitos obtidos através de matrizes poliméricas são mais comuns e são largamente usados em várias indústrias. Dependendo do tipo de aplicação (estrutural ou não estrutural), seleciona-se determinada fibra. Para aplicações estruturais, fibras contínuas ou fibras longas são recomendadas; visto que para aplicações não-estruturais, as fibras curtas são as mais recomendadas (CALLISTER, 2007).

Já os nanocompósitos são uma classe de materiais relativamente nova e que possuem dimensões entre 1 a 100 nm, são estruturados a nível nanométrico, e com isso possuem características distintas dos compósitos com dimensões superiores (complementos intercalados). A obtenção de nanocompósitos orgânico-inorgânicos através da intercalação de polímeros em argilas, por exemplo, têm recebido grande interesse, devido à grande aplicabilidade, como dissipadores de carga eletrostática, protetores de radiação eletromagnética entre outras aplicações. Este exemplo ilustra uma variedade de materiais que podem ser obtidos via intercalação, dependendo da natureza do íon, uma variedade de polímeros, polares e apolares, pode ser adicionada. Atualmente uma ampla variedade de nanocompósitos tem sido estudada, e há um grande esforço para produzir novos materiais, e com isso aplicá-los nas mais diferentes áreas. Dentre estes materiais estão biosensores, OLEDs, papéis eletrônicos, polímeros condutores, materiais para proteção contra radiação e, mais recentemente compósitos à base de celulose bacteriana e hidroxiapatita contendo fatores de crescimento (SASKA *et al.*, no prelo).

2. Objetivos

O presente trabalho visa basicamente a produção de celulose bacteriana em cultivos estático e agitado, e aplicar o método de inserção *in situ* na produção de compósitos à base de Celulose Bacteriana e Colágeno, visando aplicações biomédicas.

Especificamente:

1. Estudo sistemático da produção de membranas de CB em 3 condições de cultivo: estático, agitado e estático com posterior agitação;
2. Avaliação de diferentes fontes de carbono e condições do processo de produção da CB com o objetivo de aumento na produtividade;
3. Inserção *in situ* de colágeno tipo I a fim de se obter um material compósito à base de Celulose Bacteriana, com aplicação biomédica mais ampla;
4. Caracterização físico-química e morfológica dos materiais produzidos.

3. Materiais e Métodos

Durante o desenvolvimento do trabalho, foram realizadas medidas relativas à:

- Comportamento da cepa produtora de CB em diferentes condições;
- Avaliação quantitativa e qualitativa da produção de Celulose Bacteriana;
- Caracterização da celulose bacteriana pura;
- Produção, caracterização e avaliação dos compósitos CB + Col.

Para tanto, foram realizadas medidas de massa seca, curva de crescimento em diferentes fontes de carbono, avaliação da variação de pH, curva de consumo de carboidratos, grau de polimerização, além de observações quanto ao caráter morfológico e estrutural dos materiais através da microscopia eletrônica de varredura. O Fluxograma representado na Figura 8 mostra as etapas desenvolvidas.

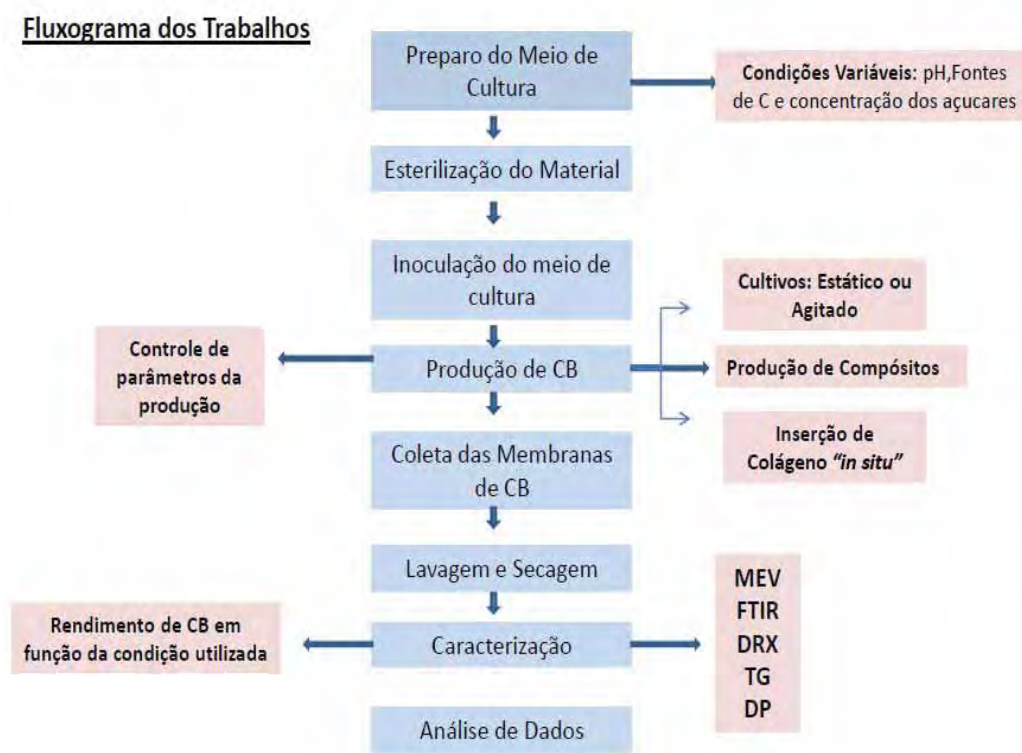


Figura 8. Fluxograma das etapas relacionadas ao trabalho desenvolvido

3.1. Preparo das membranas de Celulose Bacteriana

A produção da CB foi realizada pela bactéria *G. xylinus* linhagem ATCC 23769, cedida pela Fundação André Tosello (FAT), Campinas, estado de São Paulo. A cepa utilizada foi liofilizada e reativada em meio contendo como fonte de carbono o manitol (2%), segundo especificações fornecidas pela FAT. Todo o trabalho posterior de produção de CB e modificação de meio de cultura foi realizado partindo desta cultura pura.

O meio escolhido para uso no trabalho foi o proposto por HESTRIN e SCHRAMM (1954) (HS), devido à sua ampla utilização na literatura. Partindo deste meio, foram feitas algumas modificações como: variação na fonte de carbono utilizando glicose, frutose, sacarose e manitol (20 ou 50 gramas por litro), variação na concentração do pré-inóculo e variação do pH inicial (4,5 ou 6) (Tabela IV)

Tabela IV – Composição básica dos meios de cultura utilizados nos experimentos

Schramm e Hestrin Modificado	
Composição	(g/L)
Fonte de Carbono	20 ou 50
Peptona	5
Extrato de levedura	5
Fosfato disódico anidro	2,7
Ácido cítrico monoidratado	1,5
(pH - 4,5 ou 6,0)	

Durante os testes comparativos foram utilizadas membranas comerciais cedidas pela empresa BIONEXT® Produtos Biotecnológicos. Estas membranas são produzidas pela bactéria *G. xylinus*, em bandejas de 30x50 cm, com tempo de cultivo de 96 horas a 28°C, utilizando o meio de cultura HS. A membrana formada na superfície do meio é

retirada manualmente, tratada com hidróxido de sódio 0,5 mol/L à 60°C por 2 horas, e lavada exaustivamente para retirada de células microbianas e estabilização de pH. Em seguida as membranas são esterilizadas em autoclave à 121°C por 15 minutos e secas à 37°C por 5 dias. As membranas obtidas durante este trabalho foram todas tratadas da mesma forma.

3.1.1. Obtenção da curva de consumo de carboidratos

O consumo de açúcar foi determinado através de medidas colorimétricas, utilizando-se o método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico - 1g; tartarato de sódio e potássio - 30g; NaOH 1 mol/L - 40mL, e o volume completado a 100mL), que baseia-se no poder redutor de açúcares, originando um composto colorido, 3-amino 5-nitro salicílico, que absorve luz em 546 nm (MILLER, 1959).

Para a dosagem da glicose e frutose, 0,5 mL de cada uma das amostras obtidas em cada um dos meios e adequadamente diluídas, foram transferidos a diferentes tubos de ensaio, adicionando-se em seguida 1,0 mL do reagente DNS e 2,0 mL de H₂O. Os tubos foram transferidos para banho de água a 100°C por 5 minutos, para desenvolvimento da reação colorida. Após resfriamento em banho de gelo, as leituras foram realizadas a 546 nm, contra um branco onde a amostra era substituída por 0,5 mL de água. Como padrão foi utilizado uma solução de glicose, de concentração conhecida.

Na dosagem de sacarose, a 200 µL de cada uma das amostras, adequadamente diluídas, foram adicionados 150 µL de água e 100 µL de HCl 6 mol/L. No tubo contendo o branco, foi utilizada água em substituição à amostra. As soluções obtidas foram incubadas a 60°C por 7 minutos para hidrólise da sacarose. Após esse período, foram adicionados 0,5 mL de NaOH 2,4 mol/L para neutralização e 1,0 mL do reagente

DNS, seguindo com incubação a 100°C por 5 minutos. Em seguida foram transferidos para um banho de gelo para resfriamento. As leituras de absorbância foram realizadas a 546 nm. Como padrão, utilizou-se uma solução de glicose com concentração conhecida.

3.1.2 - Obtenção da Curva de Crescimento

A curva de crescimento foi obtida indiretamente pela determinação da densidade ótica do meio de cultivo. Esta análise foi realizada medindo-se a concentração de células livres através da absorbância do meio, utilizando-se um comprimento de onda de 600 nm, e o meio de cultura antes da inoculação como referência (zero), sendo o crescimento celular observado por esta diferença ao longo do cultivo.

3.2. Caracterização das membranas de celulose bacteriana produzidas

3.2.1. Difratometria de raios-X.

Os difratogramas de raios X foram obtidos utilizando-se um difratômetro Siemens Kristalloflex, com filtro de níquel e radiação Cu K α , de 4 a 70°, tempo de contagem de 2 segundos, para determinação da estrutura cristalina e a fração percentual de cristalinidade das amostras.

3.2.2. Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho.

Os espectros vibracionais na região do infravermelho, para as amostras sólidas foram obtidos em um espectrômetro FT-IR, modelo Spectrum 2000 da Perkin Elmer.

Foram preparadas pastilhas de KBr (1:1000), contendo as amostras previamente trituradas. Espectro de amostra de celulose bacteriana foi realizado sob as seguintes condições: porcentagem de transmitância (%T) com um acúmulo de 32 varreduras, com resolução de 2 cm^{-1} , na faixa de absorção de $4000\text{-}350\text{ cm}^{-1}$.

3.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura.

As micrografias foram realizadas para verificar a estrutura fina da morfologia da superfície das amostras. Estas micrografias foram obtidas no microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo JEOL JSM-7500F. Cada amostra foi colocada em um suporte de cobre, recoberta com uma fina camada de ouro com espessura de 1nm, fazendo-se incidir sobre elas, corrente de 40 mA durante 60 segundos.

3.2.4 – Análise Termogravimétrica.

As curvas de TG foram obtidas utilizando-se um equipamento TA-Instruments usando uma célula SDT. As amostras foram aquecidas em cadinho de alumina desde 50°C a 400°C sob atmosfera de nitrogênio com fluxo contínuo de 70 mL/min com razão de aquecimento de 10°C/min .

3.2.5. Grau de Polimerização

A molécula de celulose varia em comprimento e pode haver centenas ou milhares de unidades de glicose por molécula. A massa molecular varia muito (de

50.000 a 2.500.000) dependendo da origem da celulose. O comprimento da cadeia é expresso em termos de grau de polimerização GP, dado pela expressão:

$$GP = (\text{Massa molecular da Celulose} / \text{massa molecular de uma unidade glicosídica})$$

O grau de polimerização varia entre 100 e 12.000 unidades de glicoses (Figura 9). Algodão e outras plantas fibrosas têm GP variando entre 800 e 10.000 unidades de glicose, dependendo do tratamento empregado, valores similares a esses são observados para a celulose bacteriana (LETHIO, 2001; WADDA & OKANO, 2001).

Tipo de Celulose	Grau de Polimerização
Celulose nativa (celulose I)	3.500---12.000
Linter de algodão purificado	1.000---3.000
Polpas de madeiras comerciais	600---1.500
Celulose regenerada (celulose II)	200---600

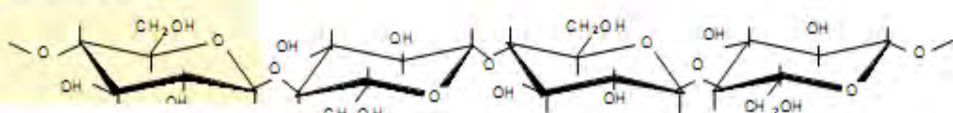


Figura 9 – Grau de polimerização de celuloses de diferentes fontes

Modificações na molécula de celulose podem ser conseguidas explorando-se a reatividade dos diversos grupos hidroxilas presentes na mesma, empregando reações de derivatização, que consiste na introdução de outras estruturas moleculares capazes de gerar outros funcionais tais como éteres e ésteres. Como exemplo pode-se citar alguns

derivados da celulose como a carboximetilcelulose (CMC), Hidroxipropilcelulose (HPC), acetato de celulose que tem sido largamente usado na indústria alimentícia. Em se tratando de derivatização, dois fatores devem ser considerados: os grupos funcionais presentes, assim como as interações físicas entre as cadeias.

Cada unidade de glicose presente na estrutura da celulose tem três grupos de hidroxilas reativos, e as reatividades diferem-se entre si. O grupo (C1-OH) é redutor, pois é formado por ligação hemiacetal intramolecular, enquanto o grupo (C4-OH) é um grupo alcoólico não redutor. A hidroxila (C6-OH) é a mais reativa, seguida pela hidroxila ligada ao carbono 2 (C2-OH). Como a hidroxila ligada ao carbono 3 (C3-OH) está fortemente mais envolvida em ligações de hidrogênio sua reatividade é inferior às demais.

A determinação do grau de polimerização tem por objetivo avaliar o tamanho da cadeia do polímero e com isso elucidar algumas características estruturais do material, e de sua cadeia, e conseqüentemente a capacidade e derivatização e outras propriedades físico-químicas. O teste utilizado foi feito por análise viscosimétrica, utilizando um viscosímetro de Ostwald em solução de Cuproetilenodiamina, empregando a equação:

$$GP = 10 \log^{(0,75(\eta_{sp}-\ln \eta_{rel})^{1/2})/0,905}$$

Onde , η_{sp} é a viscosidade específica, η_{rel} é a viscosidade relativa.

$\eta_{rel} = t_{solução}/t_{solvente}$,

$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1$.

3.2.6. Teste de Intumescimento

As amostras de CB e CB-COL obtidas foram confeccionadas sob a forma de membranas quadradas (15 mm de lado), as quais foram imersas separadamente em água deionizada a temperatura ambiente por 420 minutos. As membranas foram removidas nos tempos determinados, inicialmente 1 mim, 5 mim, seguida de medidas a cada 5 mim até 30 mim e depois medidas a cada 15 min até totalizarem 180 mim. O excesso de água superficial era rapidamente removido com papel filtro e pesadas imediatamente. O grau de intumescimento das amostras foi realizado em triplicata.

O conteúdo de água nas membranas intumescidas foi calculado pela seguinte equação:

$$\text{Intumescimento (\%)} = [(M_i - M_s) / M_i] \times 100$$

onde M_s é o peso da membrana seca e M_i é o peso da membrana intumescida.

3.2.7. Ângulo de Contato

O ângulo de contato foi medido por um equipamento OCA15 Dataphysics equipado com uma câmera CCD. O método utilizado para realizar as medidas foi o de gotejamento utilizando água ultrapura (tensão superficial: 72,30 mN/m); a gota foi dispensada por uma seringa com uma agulha de 0,5 mm de diâmetro, com um volume de 10 μ L, numa velocidade de gotejamento de 1 μ L/s sobre as superfícies das amostras. As imagens das gotas capturadas foram analisadas empregando o software SCA20. Desta forma, o ângulo de contato formado pela gota na superfície da amostra foi mensurado. As medidas foram realizadas imediatamente após o gotejamento (T=0s) e após 10s (T=10s).

3.3. Produção de Celulose Bacteriana em cultivo agitado

Após determinadas as melhores condições no cultivo na forma de cultivo estática foi testada o modo de cultivo com agitação, sendo realizada com auxílio de Shaker da marca Nova Ética fixo em 120 rpm (rotações por minuto). Todo o procedimento realizado com as membranas de CB no modo estático, como lavagem, secagem e pesagem, foram mantidos para as membranas de CB de cultivo agitado. Portanto, o meio de cultura preparado e inoculado em erlenmeyers de 250 mL foi levado para o Shaker, variando o tempo de inoculação até a agitação. Sendo assim, foram feitos 2 grupos, testando diferentes fontes de carbono, concentração de pré-inóculo e tempo até a agitação, ou os meios eram inoculados e levados à agitação (C1), ou ficavam 72 horas em crescimento estático e depois eram levados à agitação (C2) Nesses cultivos foi utilizado o pH inicial de 4,5 e 50 g/L de fontes de açúcar.

3.4 Adição de colágeno *in situ*

O método de inserção *in situ* caracteriza-se por sua praticidade na produção de compósitos. É realizado através da adição de materiais ou interferentes durante o processo de polimerização. No caso da produção de compósitos à base de celulose bacteriana, estas adições são justificadas pela rapidez na produção. Os materiais obtidos foram caracterizados visando aplicação na área biológica.

Neste caso, as membranas de celulose foram produzidas em meio estático (Figura 32a), nas condições descritas anteriormente, em meio contendo manitol como

fonte de carbono. Colágeno tipo I (Col I) de cauda de ratos (Sigma-Aldrich Co) foi adicionado ao meio na concentração de 1 a 5% (v/v), para produção de bio-nanocompósitos denominados CB+Col.

4. Resultados e Discussão

4.1. Produção de CB

A linhagem utilizada, ATCC23769, adquirida da fundação André Tosello, foi inoculada e cultivada como descrito em Materiais e Métodos, e logo após 24 horas já era possível observar a formação de uma manta de celulose na superfície do meio de cultura, a exemplo do demonstrado na Figura 10b. Este cultivo foi o ponto de partida para os demais experimentos.

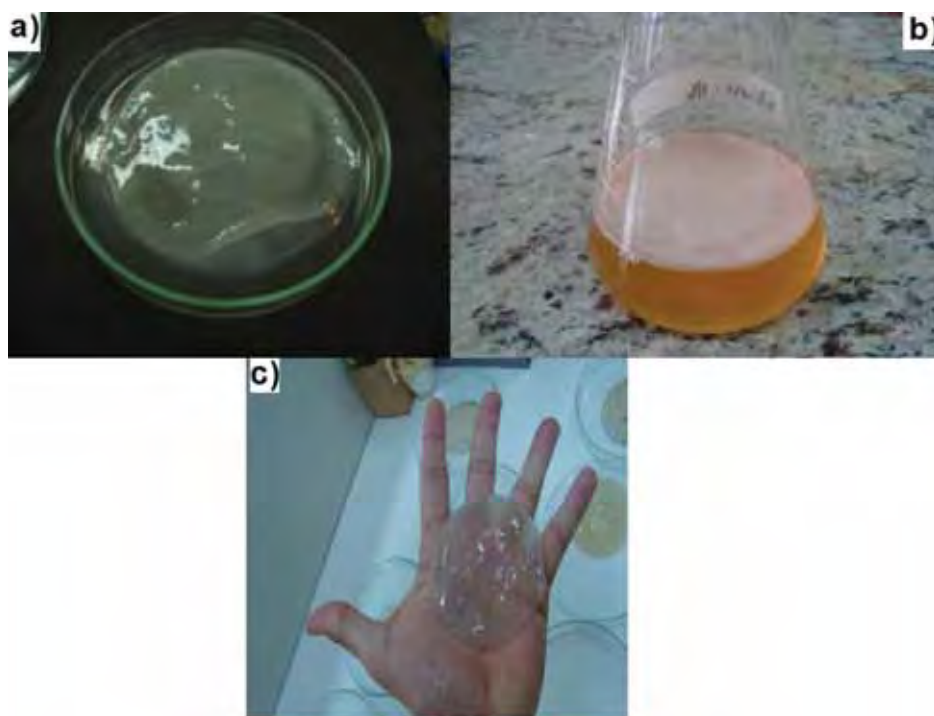


Figura 10. Celulose Bacteriana a) membrana em destaque na placa; b) em crescimento na superfície do meio de cultura; c) membrana em destaque, mostrando a transparência.

As membranas produzidas em meio estático formam-se na interface ar-meio, como uma forma do microrganismo obter maior aporte de oxigênio.

4.1.2. Curva de Crescimento

O meio de cultura ideal para o crescimento das cepas escolhidas foi determinado empiricamente pela determinação da densidade óptica do mesmo. Este método leva em consideração o aumento do número de células livres, detectadas opticamente, e nesse caso, comparadas com o meio inicial.

Durante o cultivo, foi obtida a maior densidade óptica para o meio contendo glicose (Figuras 11 e 12) que, provavelmente, ocorre devido ao maior número de vias metabólicas existentes neste microrganismo, que se encarregam de transformá-la em energia para as suas atividades, inclusive reprodutivas, através de um metabolismo oxidativo.

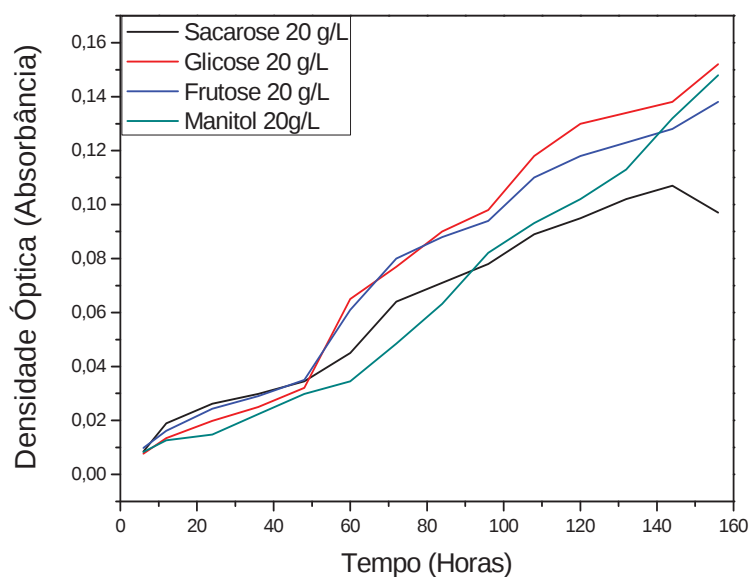


Figura 11. Curvas de crescimento de células livres em meios contendo 20 g/L de fonte de carbono.

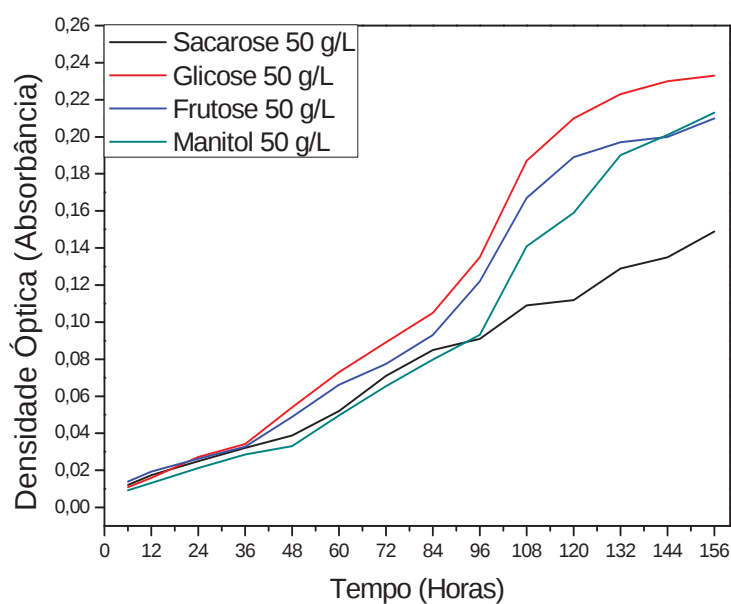


Figura 12. Curvas de crescimento de células livres em meios contendo 50 g/L de fonte de carbono

4.1.3. Produção de CB

A produtividade da CB, em gramas por litro (Figuras 13a e 13b, e 14a e 14b), foi obtida pesando-se as membranas obtidas, após secagem prévia, para retirada de toda água residual. A melhor produtividade, mesmo não sendo esperada (devido aos resultados do uso da glicose como fonte de carbono no crescimento celular e na curva de consumo de carboidratos), foi com o manitol na concentração de 50 g/L e pH = 4,5, alcançando a produção de 1,52 g/L de CB no período de 120 horas, seguido da glicose na mesma concentração e pH e no mesmo período de cultivo, que levou à uma produção de 1,36 g/L (Figura 14b). Apesar dos ensaios de densidade óptica indicar o meio contendo glicose como o mais adequado para o crescimento do microrganismo, foi o meio contendo o manitol que resultou em maior produtividade de celulose.

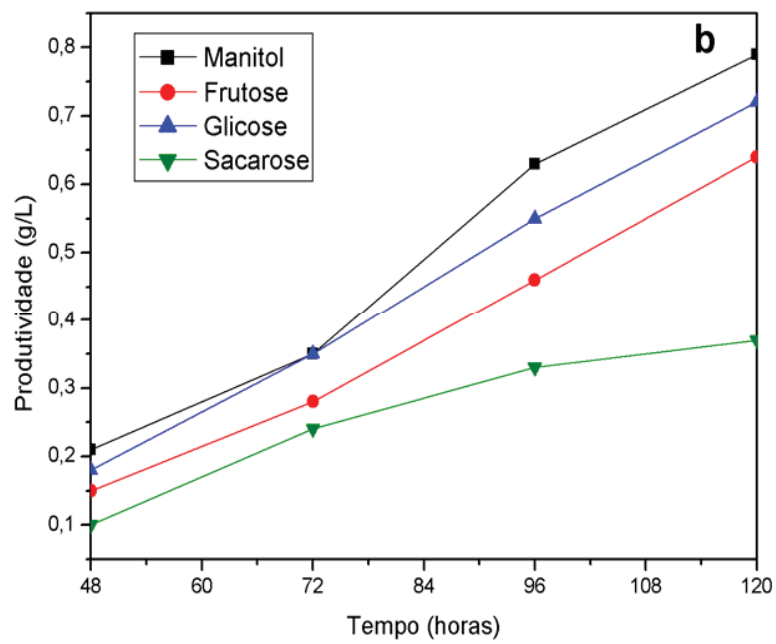


Figura 13. Produção de celulose bacteriana em meios contendo 20 g/L de fontes de carbono e pH inicial 6,0 (a) e 4,5 (b).

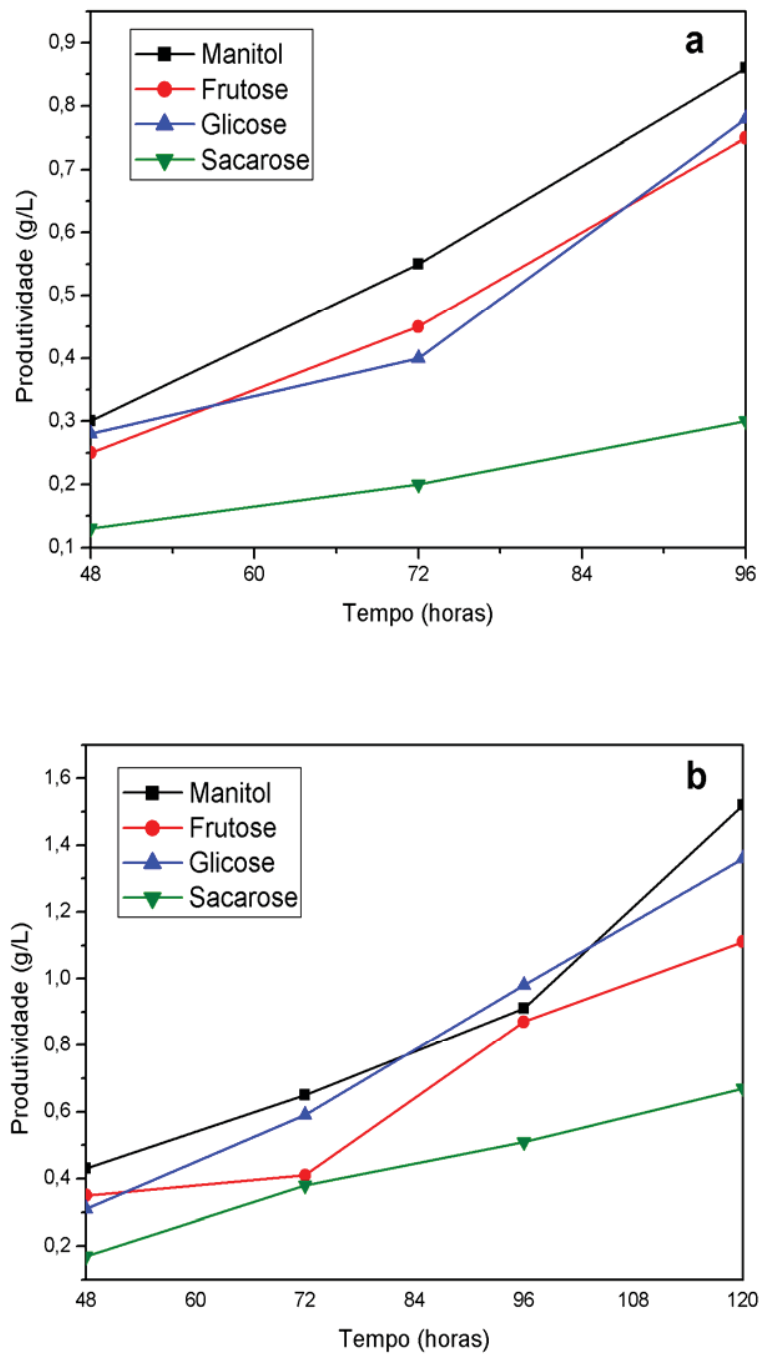


Figura 14. Produção de celulose bacteriana em meios contendo 50 g/L de fontes de carbono e pH inicial 6,0 (a) e 4,5 (b).

4.1.4. Variação do pH

De uma maneira geral, observou-se uma melhor produtividade quando o processo era iniciado em meio mais ácido (Figuras 13b e 14b), o que demonstra que o metabolismo do microrganismo pode ter uma dependência relativa de íons H^+ . Além disso, durante a produção de celulose bacteriana, a bactéria *G. xylinus* produz naturalmente o ácido acético, o que contribui com a diminuição do pH do meio (Figuras 15 e 16) e, possivelmente com a maior produtividade.

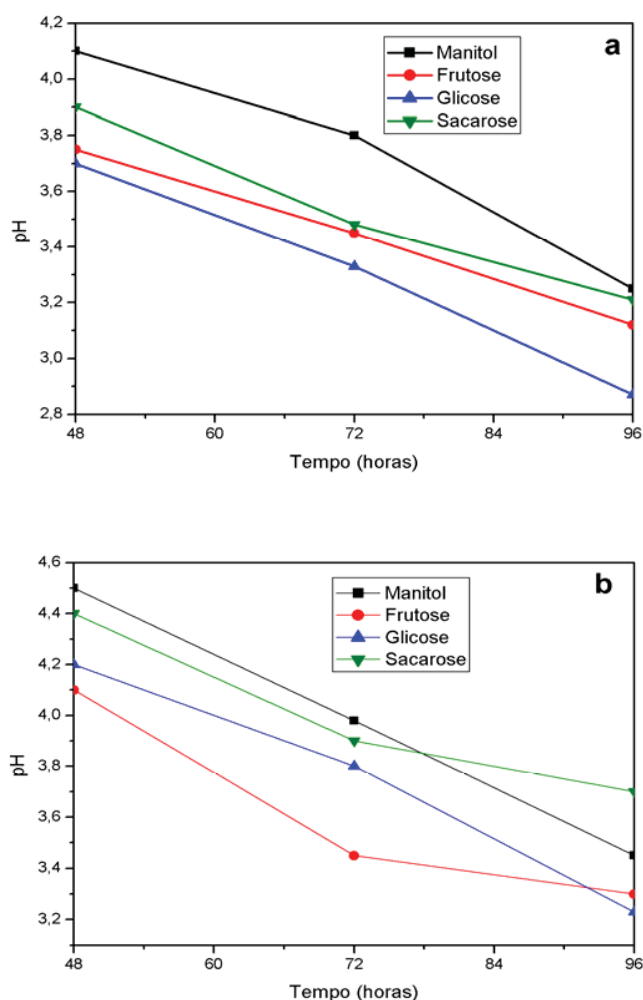


Figura 15. Variação do pH em função do tempo de produção de CB contendo 20 g/L (a) e 50 g/L (b) de fontes de carbono e com pH inicial 6,0.

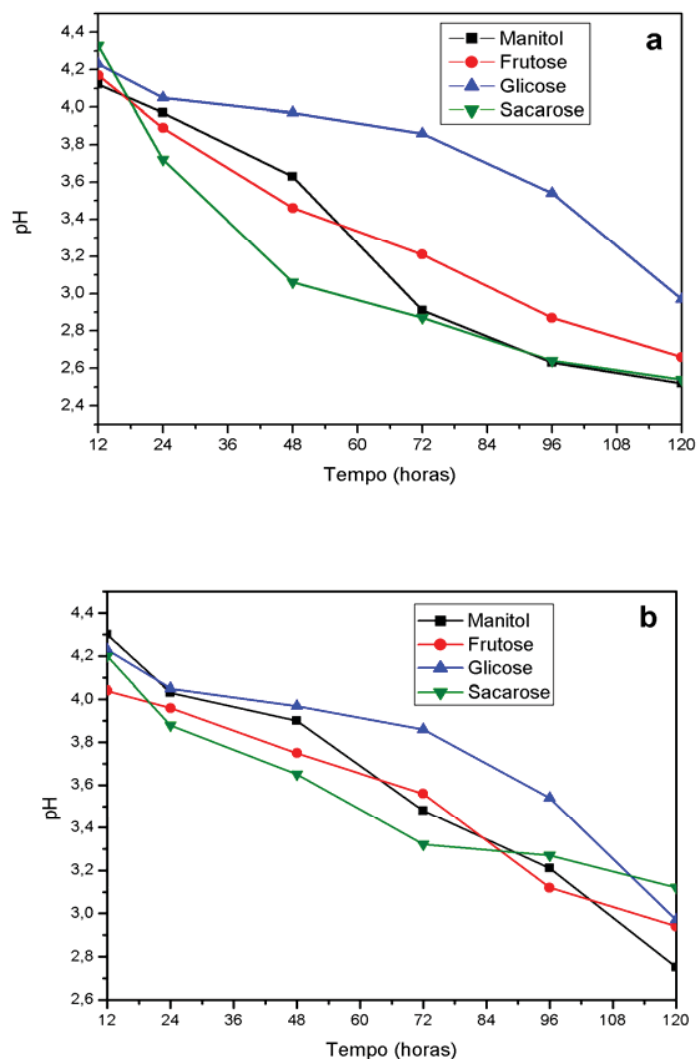


Figura 16. Variação do pH em função do tempo de produção de CB contendo 20 g/L (a) e 50 g/L (b) de fontes de carbono e com pH inicial 4,5.

A variação do pH foi acompanhada durante o cultivo, resultando em uma queda acentuada com o decorrer do tempo, independentemente da fonte de carbono utilizada, porém com uma tendência de estabilização para a concentração de 50 g/L. A variação do pH do meio foi gradual com o pH inicial de 4,5, o que deve contribuir com a extrusão das nanofibras de celulose. Além disso, um pH mais baixo seleciona os

microrganismos que podem conviver com a *G. xylinus*, ou seja, o abaixamento do pH diminui as chances de competição com microrganismos indesejáveis.

4.1.5. Quantificação de Açúcares

A quantificação de açúcares via método DNS, visa estudar o comportamento do microrganismo frente às várias fontes de carbono utilizadas (açúcares redutores), estabelecendo assim um padrão de afinidade, através da análise da variação no meio indiretamente por absorbância.

Na Figura 17 esta representada uma comparação entre os meios de cultura empregados em diferentes concentrações da fonte de carbono, 20 g/L ou 50 g/L. Observa-se uma maior afinidade pela glicose, haja vista o metabolismo aeróbio-oxidativo de *G. xylinus*. Apesar disso neste teste não foi possível quantificar o manitol, devido ao fato do método identificar apenas açúcares redutores.

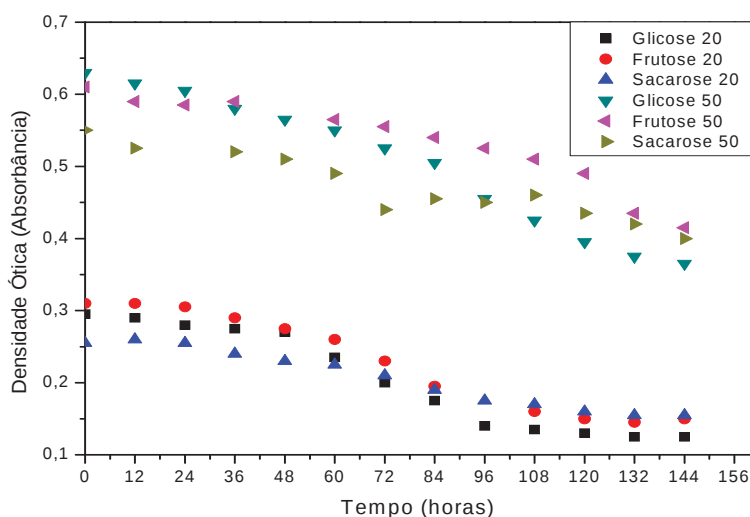


Figura 17. Curvas consumo de carboidratos, em meios contendo 20g/L ou 50 g/L de fontes de carbono.

4.1.6. Grau de Polimerização

O grau de polimerização para a celulose bacteriana produzida neste trabalho, independentemente do meio de cultura utilizado, foi 900, um valor cerca de 2,4 vezes inferior àquele obtido pela celulose bacteriana comercial (2200), o que mostra que o material produzido possui cadeia menor, o que resulta em uma maior facilidade e rapidez no processo de degradação biológica (KARLSSON & ALBERTSSON, 1998), o que seria uma propriedade interessante para aplicação em regeneração tecidual pois o material pode ser absorvido pelo organismo mais rapidamente.

4.1.7. Difratometria de Raios-X- DRX

A técnica de difração de raios-x é muito útil na investigação da estrutura fina dos materiais, como também em análises químicas, medidas de tamanhos de partículas, determinação do grau de cristalinidade e orientação de cristais (CULLITY, 1978).

Na Figura 18 observam-se a difração da CB, principalmente em dois ângulos, 15 e 22,5 graus. Cada pico difratado corresponde às fases I α e I β , devido à sobreposição dos planos 100I α , 110I α e 010I α em 15° e dos planos 110I α e 200I β em 22,5° - sobreposição (SUGIYAMA *et al*, 1991; ANTOINETTE, 1997; SARKO, 2010).

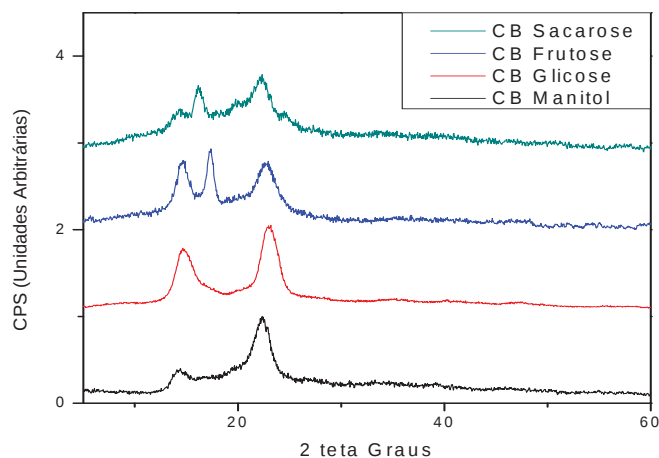


Figura 18. Difratogramas obtidos de CBs produzidas em diferentes fontes de carbono.

4.1.8. Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho.

O Espectro vibracional na região do infravermelho (FTIR) obtido para a celulose bacteriana produzida em meio de manitol está representado na Figura 19, como exemplo, já que as demais amostras apresentaram o mesmo perfil. As principais atribuições que caracterizam o polímero de celulose são: 3500 cm^{-1} – estiramento O-H; 2900 cm^{-1} - estiramento C-H de alcanos e estiramento assimétrico C-H₂; 2700 cm^{-1} - estiramento simétrico C-H₂; 1400 cm^{-1} - deformação C-H₂; 1340 cm^{-1} - deformação O-H e $1320\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$ deformação C-O (ZHABANKOV, 1966; SUGIYAMA *et al*, 1991; ONDO, 1997). As demais atribuições estão apresentadas na Tabela V.

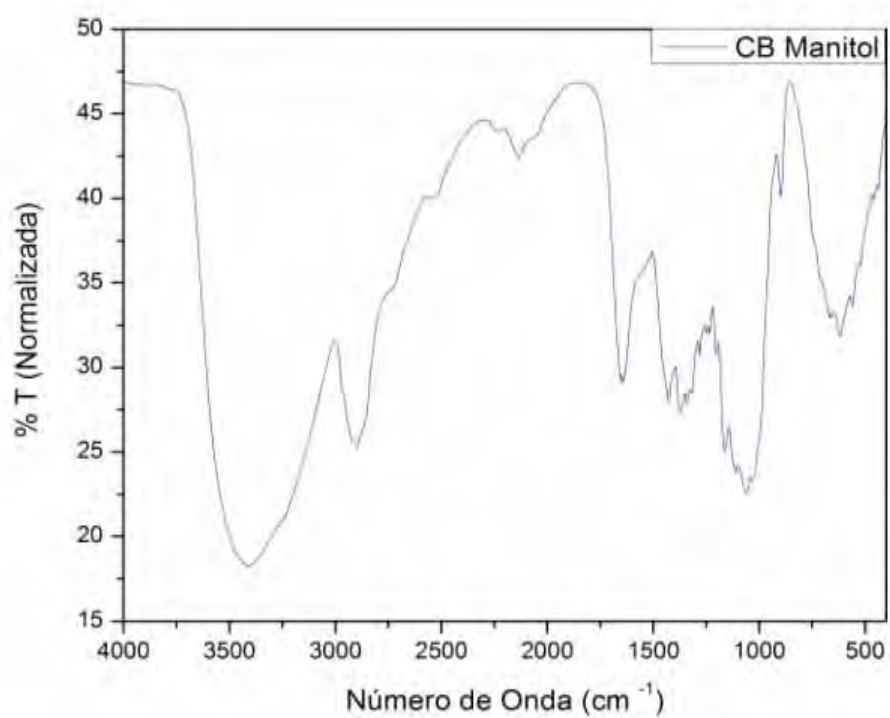


Figura 19. Espectro vibracional na região do infravermelho de amostra de Celulose bacteriana produzida em meio contendo manitol.

Tabela V. Frequência das vibrações características da celulose comparadas a uma proteína. (ZHABANKOV, 1966; ONDO, 1997)

Número de onda (cm ⁻¹)		Vibração
Celulose	Proteína	
~3500	~3500	estiramento O-H
	3330-3280 (m)	estiramento N-H (amida)
2960 – 2850	2960 - 2850	estiramento C-H de grupos CH ₂ e CH ₃
1660-1650 (s)	1660-1650 (s)	deformação H-O-H de água adsorvida / estiramento C=O (amida I)
	1550-1540 (s)	deformação N-H (amida II)
1430		deformação de CH ₂ ou deformação no plano OH
	1425-1390 (w)	estiramento simétrico COO ⁻
1330		deformação C-H (CH ₃) ou deformação no plano OH
	1420 e 1300-1200	aparecem duas bandas de deformação, devido ao acoplamento da deformação angular no plano da ligação O-H e a deformação de C-O
~1168		estiramento assimétrico nas ligações C-O-C
1040		estiramento simétrico de álcool primário C-O
~890		ligações β-glicosídicas entre unidades de glicose

4.1.9. Análise Térmica

Na análise termogravimétrica de celulose bacteriana produzida, assim como a comercial e a vegetal, observa-se que no intervalo de temperatura próximo a 40°C – 80°C ocorre uma pequena perda de massa (5 a 6%) devido à perda de água superficial adsorvida nas nanofibrilas da celulose. Ao redor de 330°C houve uma importante perda de massa devido à degradação das amostras de celulose, sejam elas de origem bacteriana ou vegetal. Essa degradação inclui processos de despolimerização e decomposição das unidades glicosídicas seguido pela formação de resíduos carbonáceos, que correspondem a cerca de 10% do resíduo para a CB comercial e a

celulose vegetal (BARUD *et al.*, 2007). A CB produzida teve estabilidade térmica semelhante ao produto comercial e apresentou menor perda de massa ao final da análise (Figura 20).

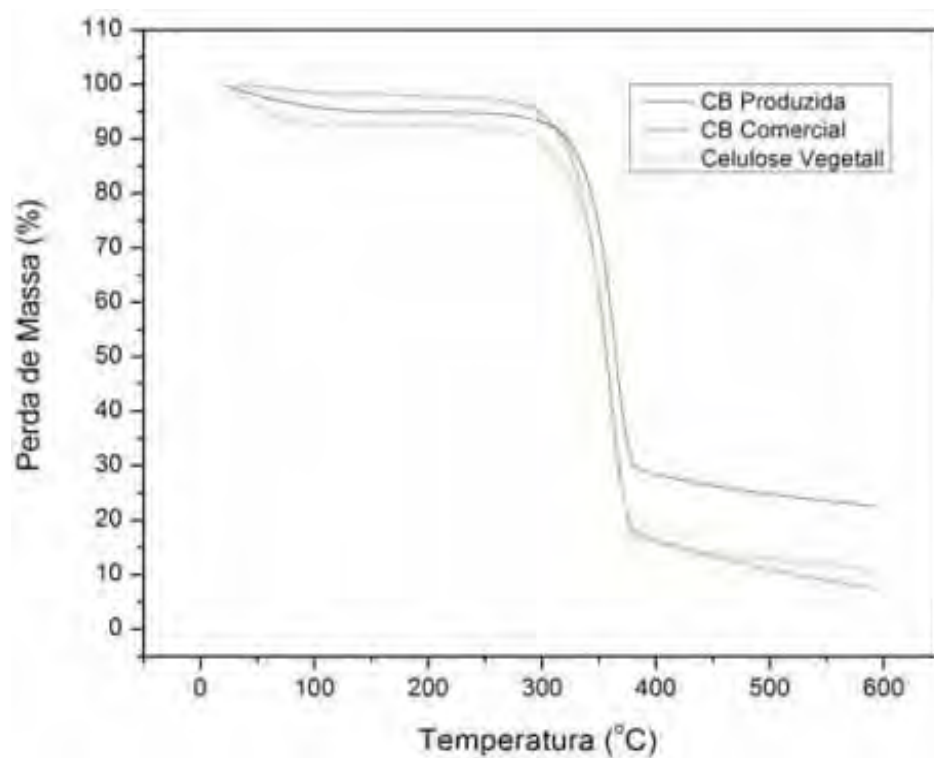


Figura 20. Análise Termogravimétrica comparativa entre CB produzida, Celulose Vegetal e CB comercial

4.1.10. Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A microscopia eletrônica é muito útil na avaliação morfológica da ultraestrutura dos materiais, As estruturas apresentadas nas Figuras 21 e 22 mostram uma micrografia típica da membrana de celulose bacteriana seca, onde é possível observar um agregado

de cadeias de celulose numa estrutura ultrafina formada por nanofibras longas e contínuas (sistema nanométrico), o que difere a CB da celulose vegetal,

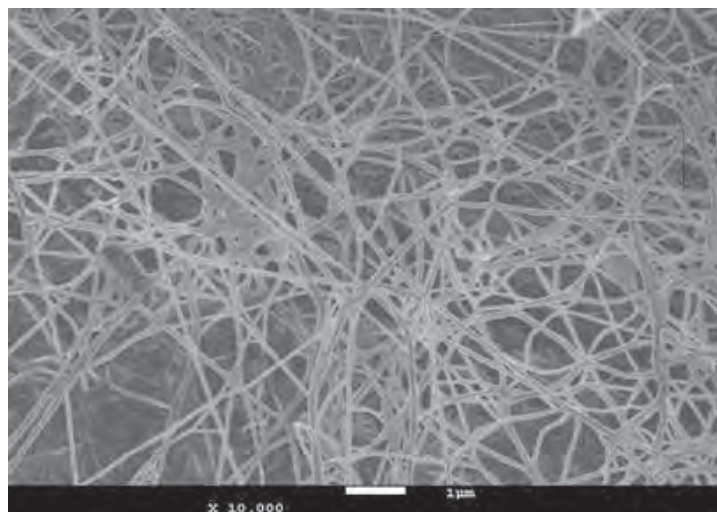


Figura 21. Micrografia eletrônica de varredura de celulose bacteriana liofilizada (aumento 10000X)

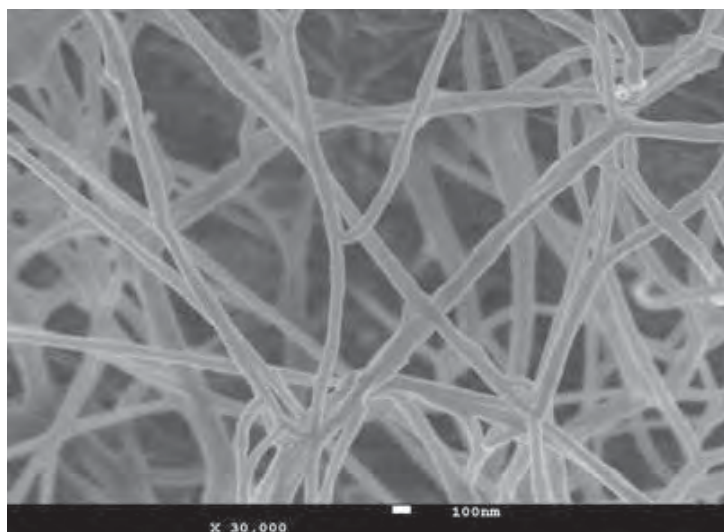


Figura 22. Micrografia eletrônica de varredura de celulose bacteriana liofilizada com maior aproximação (aumento 30000X)

As microscopias eletrônicas das amostras de CB produzidas mostraram que as mesmas possuem aparência compacta, e se diferenciam entre si em função da fonte de carbono utilizada (Figuras 23, 24 e 25).

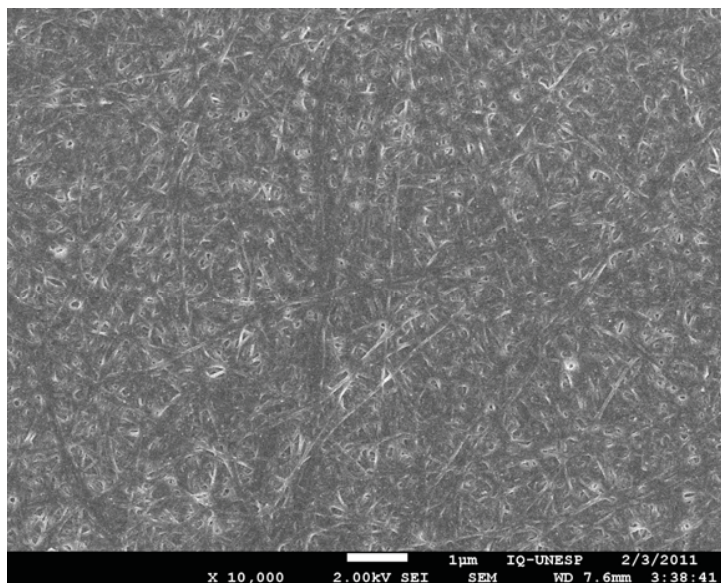


Figura 23. Micrografia eletrônica de varredura de celulose bacteriana produzida com Glicose como fonte de carbono, seca em estufa a 37°C. (Aumento 10000X)

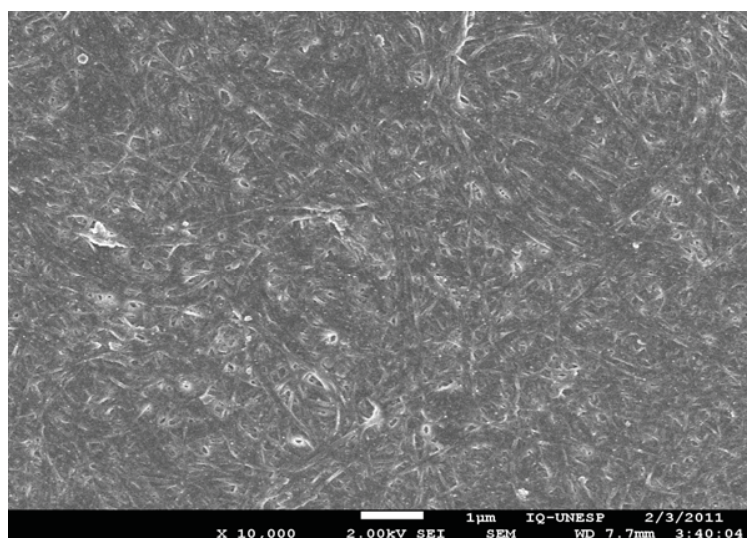


Figura 24. Micrografia eletrônica de varredura de celulose bacteriana produzida com manitol como fonte de carbono, seca em estufa a 37°C. (Aumento 10000X)

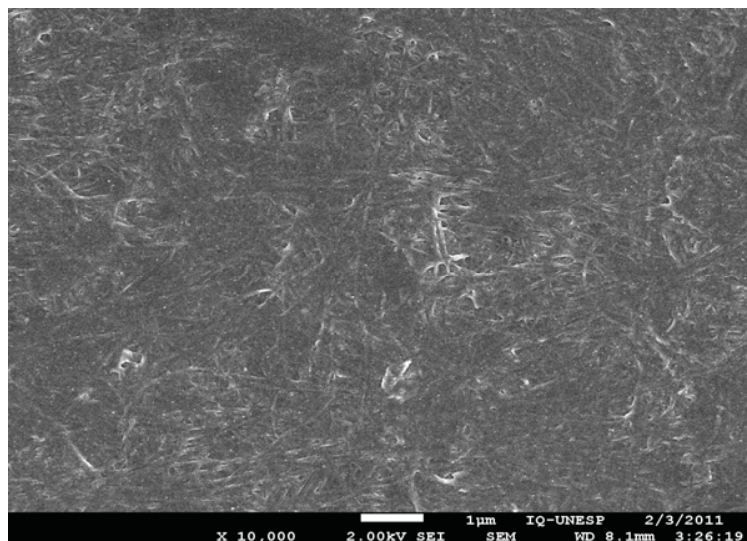


Figura 25. Micrografia eletrônica de varredura de celulose bacteriana produzida com Frutose como fonte de carbono, seca em estufa a 37°C. (Aumento 10000X)

É possível notar, no aumento de 10 mil vezes que, as membranas feitas em meio contendo glicose e manitol, possuem essa rede sem uma direção definida, possuindo nanofibras em todas as direções. Por outro lado, a membrana produzida em frutose apresenta-se menos emaranhada e este fato pode explicar os resultados referentes à maior produção em glicose e manitol à possivelmente a maior densidade, e à maior resistência mecânica nas duas primeiras

4.1.11. Teste de Intumescimento

A Figura 26 apresenta as curvas de Intumescimento para a membrana de celulose pura e seca produzida em diferentes fontes de carbono, utilizando água deionizada como agente de intumescimento.

Os resultados do teste mostraram a alta capacidade de adsorção de água pelas membranas de CB, variando de 4 a 8 a taxa de ganho de massa depois da imersão em água deionizada por 3 horas, de acordo, portanto, com resultados já descritos na literatura (GEORGE *et al.*, 2005; RAMBO *et al.*, 2008). Destaque para a membrana produzida em meio contendo frutose que apresentou maior hidrofiliidade. A capacidade em adsorver grande quantidade de água é bem conhecida na celulose bacteriana, fato que explica, em parte, sua aplicação como curativo interno ou externo. A adsorção de moléculas de água se deve ao fato da cadeia de celulose bacteriana possuir muitos grupos hidroxila que promovem pontes de hidrogênio. Um fato a ser considerado neste experimento é que a CB diminui a taxa de adsorção d'água conforme sucessivos processos de secagem e umedecimento são executados. Por este fato é que na maioria das aplicações da CB a utilizam na forma *never dried*, que é a celulose que nunca foi seca, de modo a resultar em um maior grau de intumescimento possível, ou seja, em torno de 99% de água (m/m).

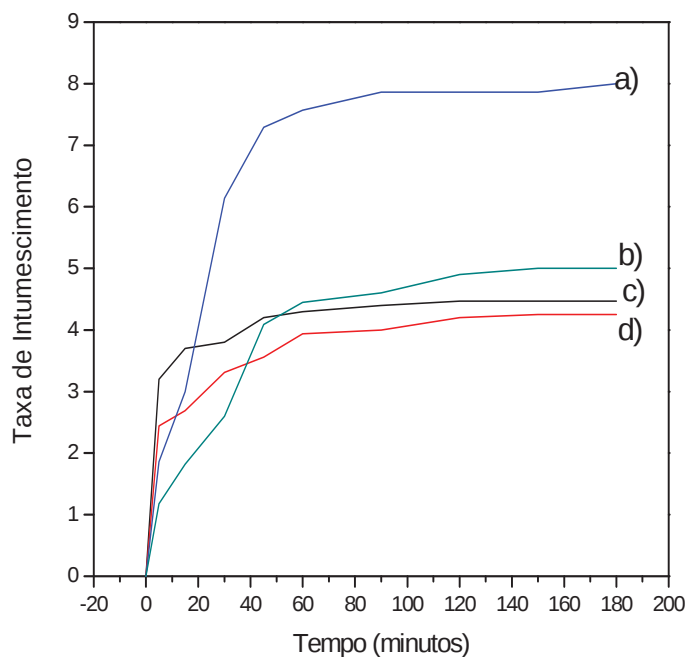


Figura 26. Teste de intumescimento de membranas produzidas em diferentes fontes de carbono: a) Frutose, b) Sacarose, c) Manitol e d) Glicose.

4.2. Produção de Celulose Bacteriana em cultivo agitado

Os meios levados à agitação logo após a inoculação acabaram formando *pellets* (Figuras 27 e 28), estruturas em forma de esferas que podem não ser desejáveis para a produção de *scaffolds*, um dos objetivos deste trabalho. Porém, este meio de cultivo foi útil no aumento da produção de CB, provavelmente em decorrência do aumento no aporte de oxigênio.

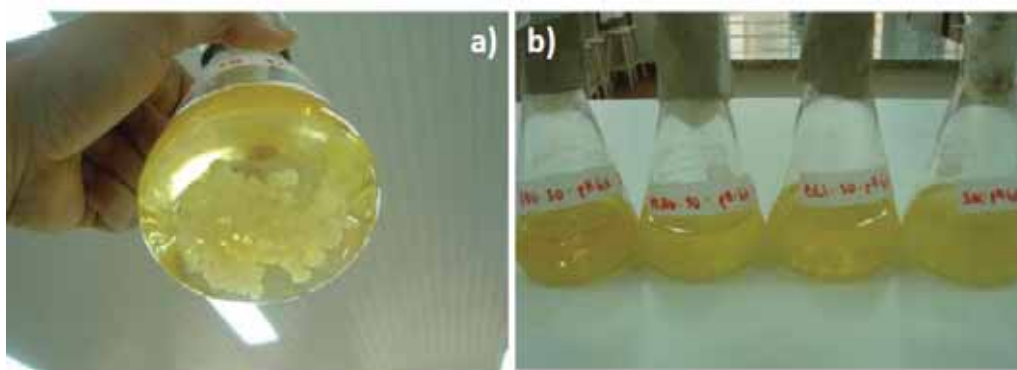


Figura 27. *Pellets* formados no cultivo agitado C1. Em a) pellets no fundo e em b) meios após serem retirados do processo.

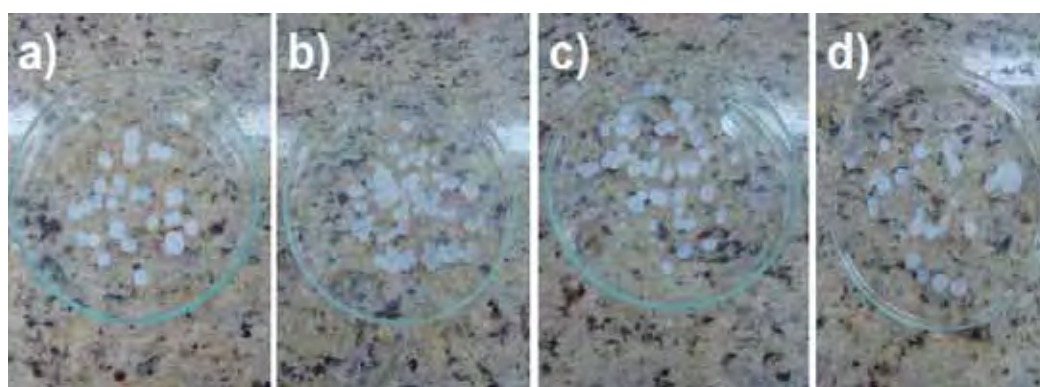


Figura 28. *Pellets* formados no cultivo agitado C1, após lavagem, em meios contendo: a) Glicose, b) Frutose, c) Manitol e d) Sacarose.

Por outro lado, os meios que ficaram em cultivo estático durante 3 dias e levados posteriormente à agitação foram os que deram os melhores resultados, com um pico de produção de 5,47 g/L após 240 horas utilizando manitol como fonte de carboidratos. As membranas resultantes desta forma de cultivo preencheram todo espaço ocupado inicialmente pelo meio, no erlenmeyer, mostrando um crescimento uniforme e estável (Figura 29a).

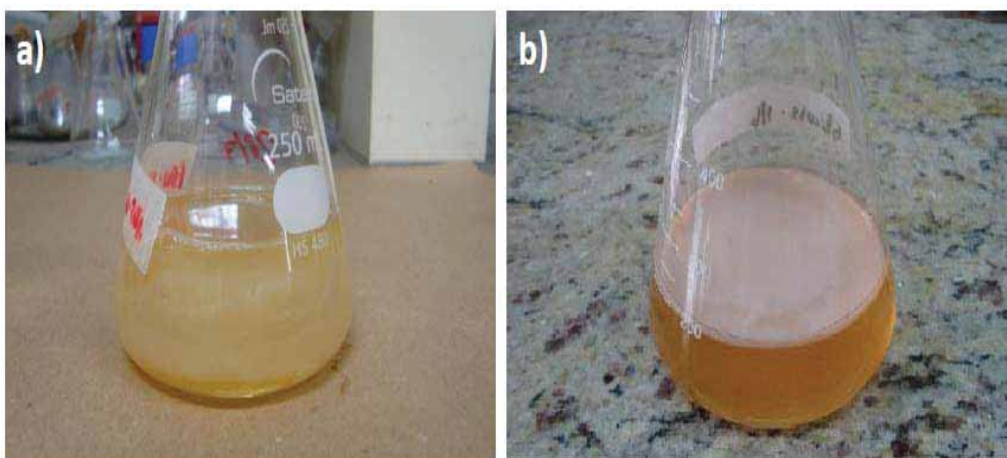


Figura 29. Comparativo entre as membranas formadas nos cultivos: a) cultivo agitado e em b) cultivo estático.

As **Figuras 30 e 31**, mostram a variação na produtividade e no pH sob cultivo agitado, respectivamente. O cultivo agitado mostrou que as células sob agitação tendem a produzir maior quantidade de celulose e tem ligeira variação no pH, quando comparado ao modo estático.

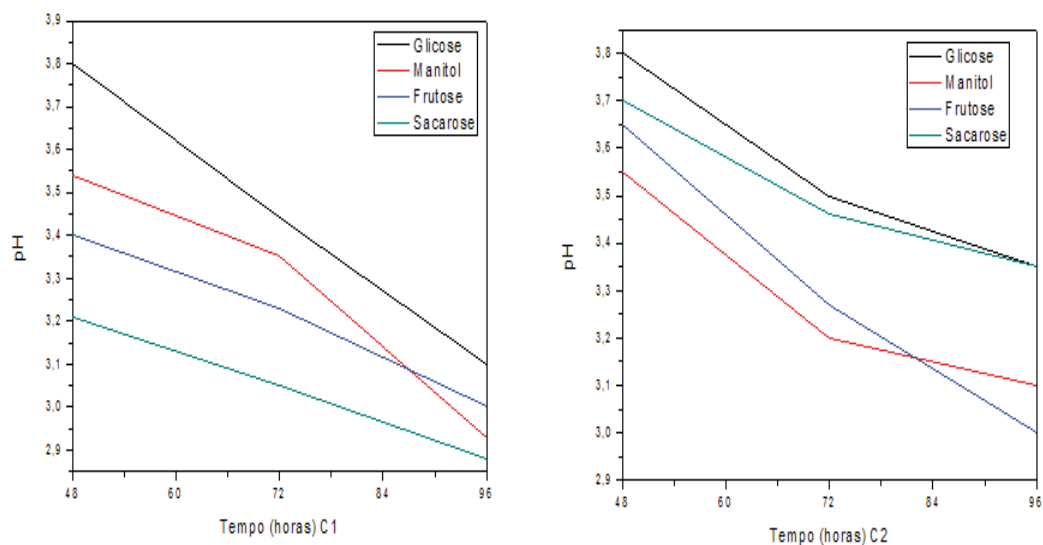


Figura 30 – Variação do pH nos cultivos agitados C1 e C2.

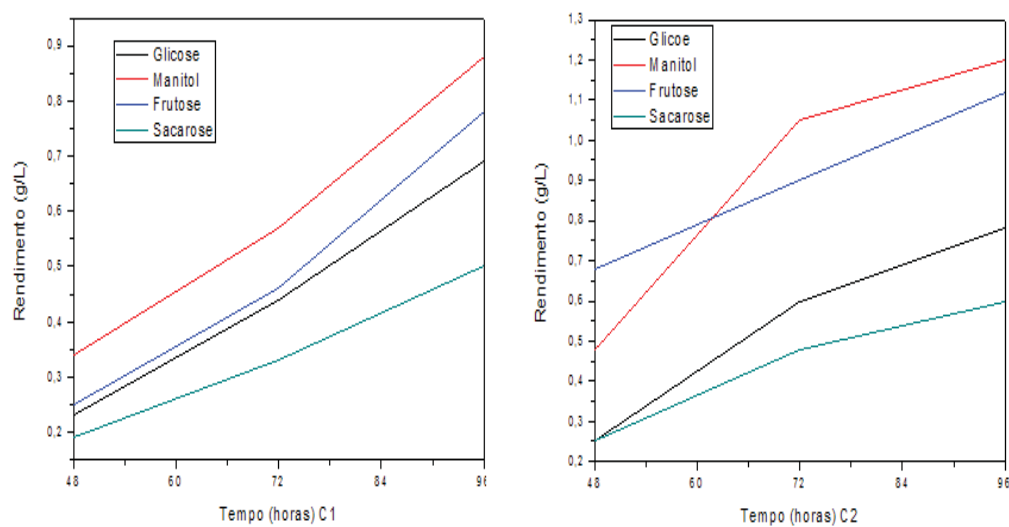


Figura 31. Produção sob cultivo agitado C1 e C2

Nas Tabelas VI e VII, a seguir, pode-se avaliar a produção de celulose e a variação de pH, empregando os cultivos C1 e C2, respectivamente, após um período de 240 horas.

Tabela VI – Produção de CB após 240 horas e variação de pH nos cultivos C1.

Agitado 10% PI

HS Modificado - Sacarose 50 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,52	0,4

Agitado 10% PI

HS Modificado - Sacarose 20 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,1	0,56

HS - Glicose 50 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3	1,12
HS Modificado - Frutose 50 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,1	1
HS Modificado - Manitol 50 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	2,9	1,2

HS - Glicose 20 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,43	0,85
HS Modificado - Frutose 20 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,54	0,8
HS Modificado - Manitol 20 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,1	0,94

Agitado 20% PI

HS Modificado - Sacarose 50 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,2	1,05
HS - Glicose 50 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,1	1,23
HS Modificado - Frutose 50 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240		1,56
HS Modificado - Manitol 50 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,23	1,85

Agitado 20% PI

HS Modificado - Sacarose 20 g/L		
Tempo	pH	Produção (g/L)
240	3,2	0,8
HS - Glicose 20 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,1	1,03
HS Modificado - Frutose 20 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3	1,25
HS Modificado - Manitol 20 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3	1,67

Tabela VII - Produção de CB após 240 horas e variação de pH nos cultivos C2.

Aagitado 10% PI

HS Modificado - Sacarose 50 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,6	2,15
HS - Glicose 50 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,65	2,5
HS Modificado - Frutose 50 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,7	3,2
HS Modificado - Manitol 50 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,4	3,43

Aagitado 10% PI

HS Modificado - Sacarose 20 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3	1,8
HS - Glicose 20 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,4	1,98
HS Modificado - Frutose 20 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,43	2,1
HS Modificado - Manitol 20 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,2	2,32

Aagitado 20% PI

HS Modificado - Sacarose 50 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,15	3,3
HS - Glicose 50 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,3	3,13
HS Modificado - Frutose 50 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,5	3,8
HS Modificado - Manitol 50 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,32	5,47

Aagitado 20% PI

HS Modificado - Sacarose 20 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,3	2,43
HS - Glicose 20 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3	2,98
HS Modificado - Frutose 20 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	2,9	3,3
HS Modificado - Manitol 20 g/L		
Tempo	Δ pH	Produção (g/L)
240	3,1	3,45

Os resultados mostram novamente um melhor desempenho do meio contendo manitol como fonte de carbono, que atingiu uma produção máxima de 5,47 g/L. Também é possível notar que no cultivo agitado as células podem ter produzido menor quantidade de ácido acético, o que manteve o meio de cultura em um pH ligeiramente superior ao dos cultivos estáticos. Também foi notada a importância da concentração do pré-inóculo e das concentrações dos carboidratos, ambos determinantes na produtividade final, sendo que houve melhor produção utilizando 20% de pré-inóculo e 50 g/L da fonte de açúcar.

4.3. Produção do Compósito à base de Celulose Bacteriana e Colágeno *in situ*

Num primeiro momento notou-se que a velocidade de formação da membrana de celulose bacteriana foi maior na presença de colágeno. A manta que cresce naturalmente na interface ar-líquido é mais espessa e uniforme comparada a que cresce em meio na ausência de colágeno. Com isso, percebe-se que não é a velocidade da formação da manta que tem se alterado, pois o aumento aparente na formação das membranas se justifica devido à adsorção das fibras de colágeno, ocupando os poros da superfície da CB e ao interagir com grupos hidroxila diminui a hidrofiliabilidade do material final, no caso o compósito desejado.

As membranas de CB+Col produzidas foram autoclavadas por 15 minutos a 121°C, e secas por 5 dias a 37°C (Figura 32b) e caracterizadas.

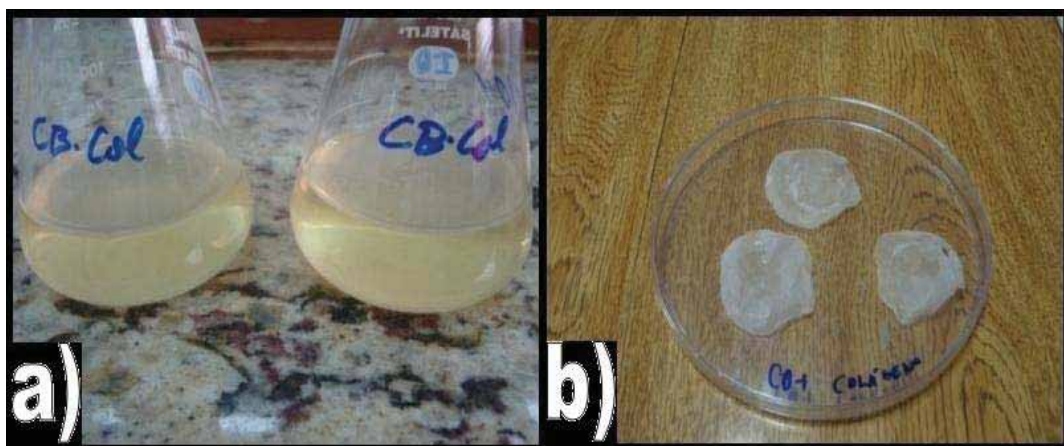


Figura 32. Produção de nanocompósitos de CB+Col realizados em erlenmeyers (a) e material lavado e seco após produção (b)

4.3.1. Caracterização dos compósitos à base de Celulose Bacteriana e colágeno

4.3.1.1. Difractometria de raios-X.

A Figura 33 mostra um comparativo entre os difratogramas de raios-x de celulose bacteriana, colágeno e do compósito CB+colágeno 1%. Observa-se a difração em 15 e 22,5° na celulose bacteriana pura. Para o colágeno, observa-se, um amplo pico em torno de 22°, e no caso do compósito CB+Col, picos de difração em 14,5°, 16,85° e 22,85°.

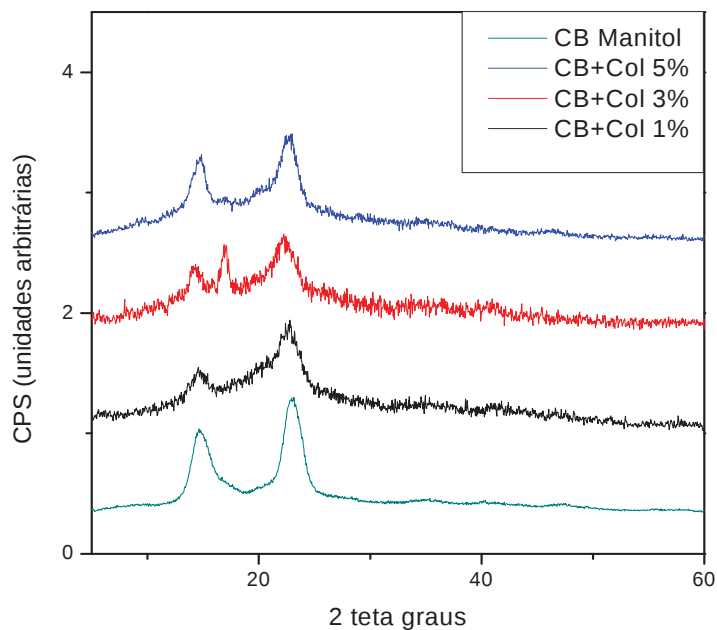


Figura 33. Difratomogramas de raios-x das amostras de: CB pura e colágeno em concentrações de 1, 3 e 5% (v/v).

Os picos apresentados na CB pura, correspondentes às fases Ia e Ib, são decorrentes da sobreposição das reflexões dos planos 100Ia, 110Ib e 010Ia em 15° e dos planos 110Ia e 200Ib em 22,5° (sobreposição), sendo que o padrão largo dos picos indica a presença de regiões amorfas (SUGIYAMA *et al*, 1991; ANTOINETTE, 1997; SARKO, 2010). O padrão de colágeno puro apresentou um pico largo no alcance 2θ de 15° a 35°, que são característicos deste biopolímero praticamente amorfo. No compósito foram encontrados picos em 14,5°, 16,85° e 22,85°, que não estão relacionados a uma simples somatória de CB+Col, mas à diferenças no padrão estrutural que devem ser elucidados futuramente.

4.3.1.2. Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho.

Os espectros vibracionais na região do infravermelho, FTIR, para as amostras de CB e CB+Col, de 1% a 5% (v/v) estão representados na Figura 34. O colágeno é caracterizado por apresentar bandas típicas para proteínas na região compreendida entre 1656 e 1547 cm^{-1} , referentes ao estiramento C=O amida I e à deformação N-H para amida II, respectivamente. Nos espectros de CB+Col é possível encontrar uma banda típica em 1545 cm^{-1} (assinalada nos espectros da Figura 34) correspondendo à deformação N-H para amida II, o que não é encontrado na celulose bacteriana pura, o que evidencia a incorporação do colágeno à celulose bacteriana.

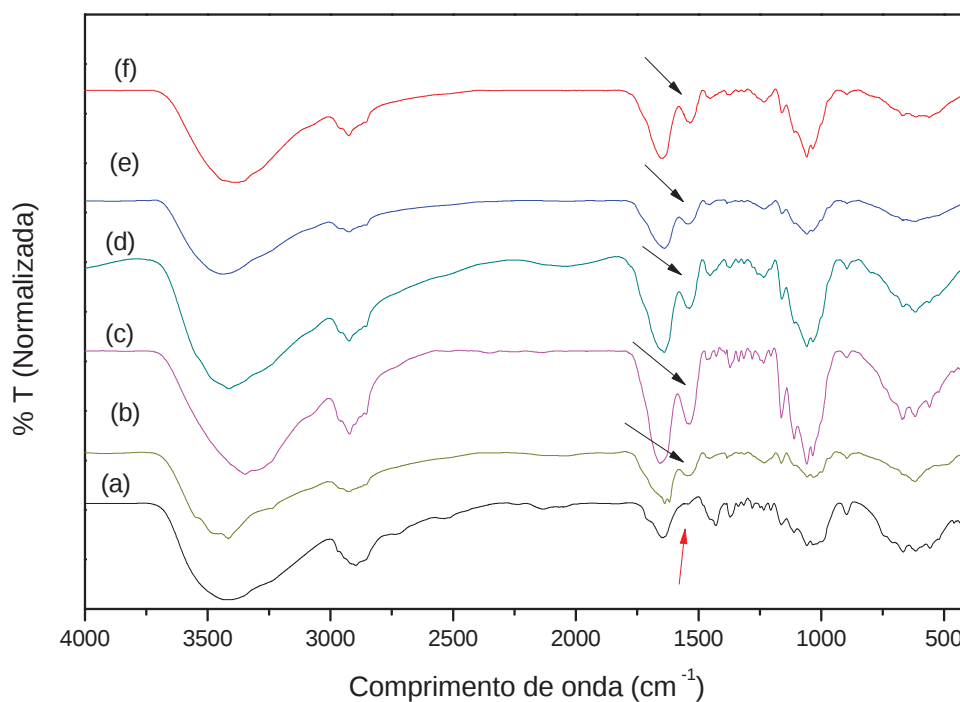


Figura 34. Espectros vibracionais na região do infravermelho de amostras de: a) CB pura, b) CB+Col 1%, c) CB+Col 2%, d) CB+Col 3%, e) CB+Col 4%, f) CB+Col 5%.

4.3.1.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

As micrografias dos materiais obtidos mostram sua estrutura morfológica. É possível notar uma diferença em relação às micrografias da CB pura, devido à presença do colágeno, que está entremeado nas camadas de CB, evidenciando a formação de um compósito, isto pode ser visto tanto nas imagens de superfície, quanto nas imagens transversais. Foram realizadas micrografias dos compósitos com 1, 3 e 5% de colágeno (Figuras 35 a 40).

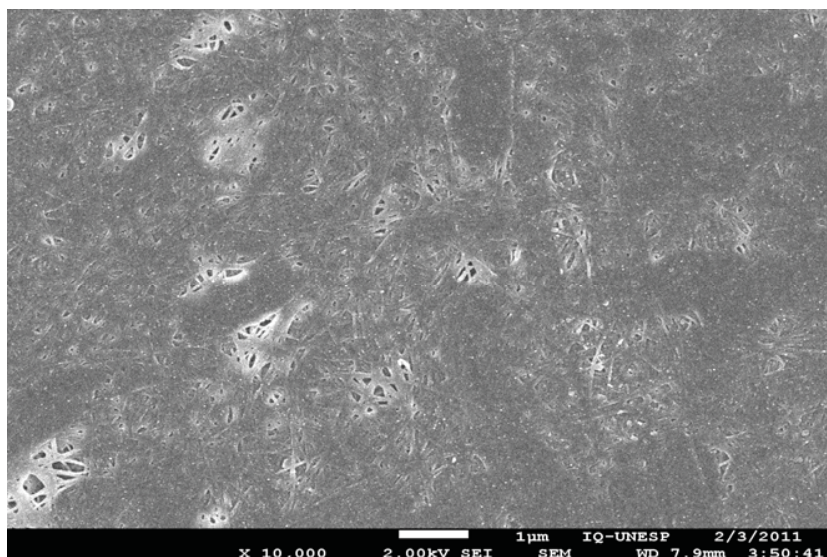


Figura 35. Micrografia eletrônica de varredura do compósito CB+Col com 1% de colágeno (Aumento 10.000 vezes)

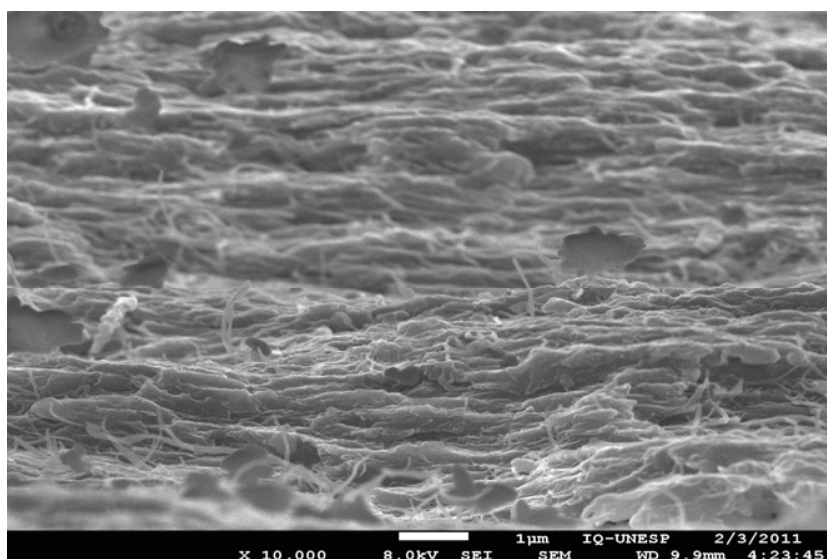


Figura 36. Micrografia eletrônica de varredura transversal do compósito CB+Col com 1% de colágeno (Aumento 10.000 vezes)

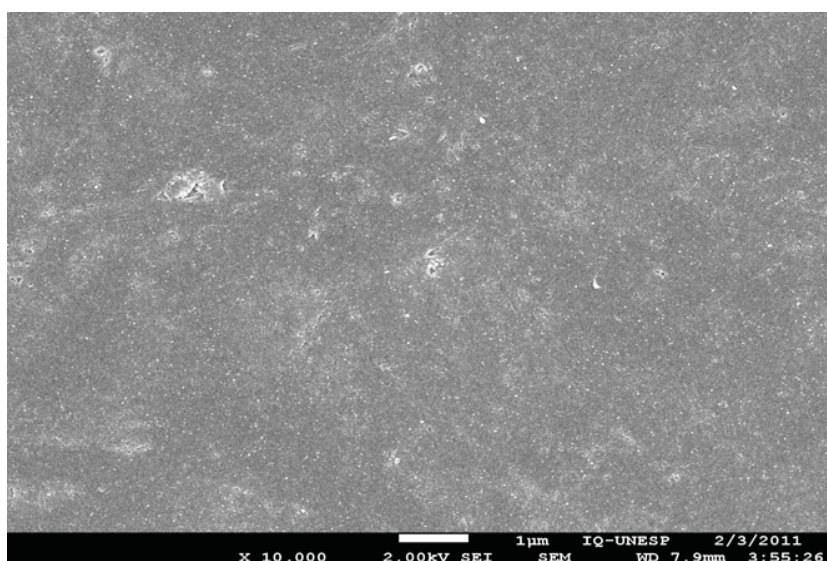


Figura 37. Micrografia eletrônica de varredura do compósito CB+Col com 3% colágeno (Aumento 10.000 vezes)

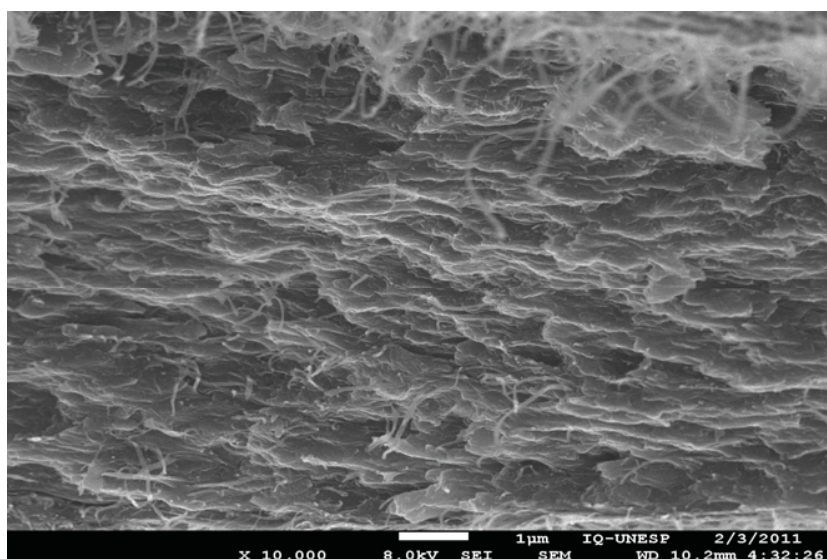


Figura 38. Micrografia eletrônica de varredura **transversal** do compósito CB+Col, com 3% de colágeno (Aumento 10.000 vezes)

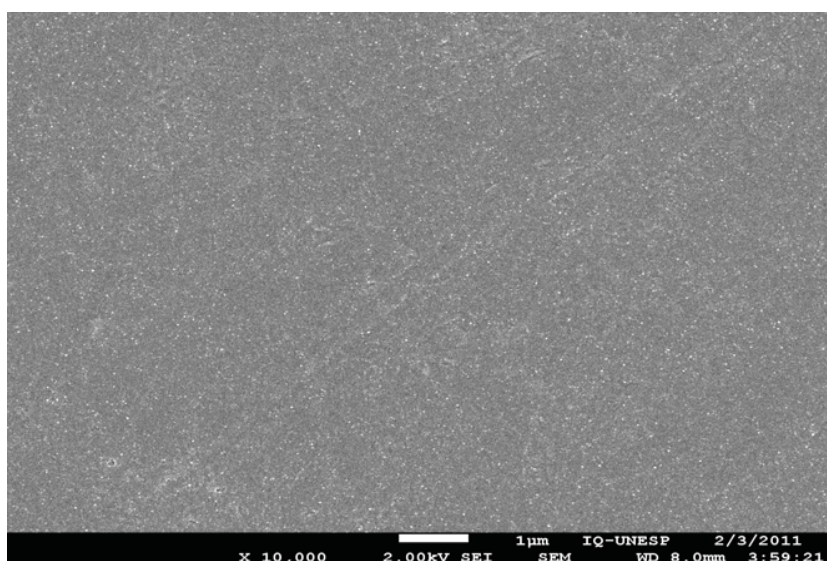


Figura 39. Micrografia eletrônica de varredura do compósito CB+Col, com 5% de colágeno (Aumento 10.000 vezes)

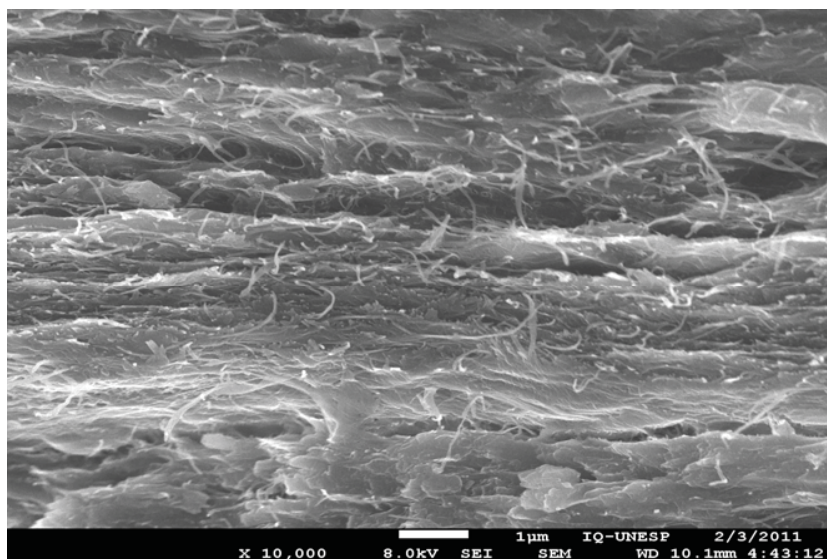


Figura 40. Micrografia eletrônica de varredura transversal do compósito CB+Col, com 5% de colágeno (Aumento 10.000 vezes)

4.3.1.4. Análise Térmica

As curvas termogravimétricas representadas na Figura 42 mostram que, inicialmente, independentemente da amostra, há uma redução suave de massa (5 a 10%), dos materiais, devido à perda de água. Como já descrito anteriormente, entre 250° e 350°C, a decomposição das membranas leva a uma considerável perda de massa (cerca de 60 a 70%). Para a membrana de CB pura observam-se resíduos carbônicos de aproximadamente 20%. Para os diferentes compósitos de CB+Col, a massa residual foi dependente da quantidade de colágeno adicionado *in situ* (entre 20 e 40%). A inserção de fibras de colágeno no interior da celulose resultou em um decréscimo na sua estabilidade (caracterizado por T_{onset}) o que pode estar relacionado com o rompimento das ligações de hidrogênio entre as cadeias glicosídicas e a diminuição na cristalinidade da celulose.

A CB pura caracteriza-se por possuir boa estabilidade térmica, e o colágeno o inverso. Portanto, devido a inserção do colágeno às fibras de celulose, os compósitos produzidos apresentaram um decaimento mais acentuado em suas curvas termogravimétricas, independente da concentração de colágeno utilizada, não apresentando linearidade com a perda de massa observada.

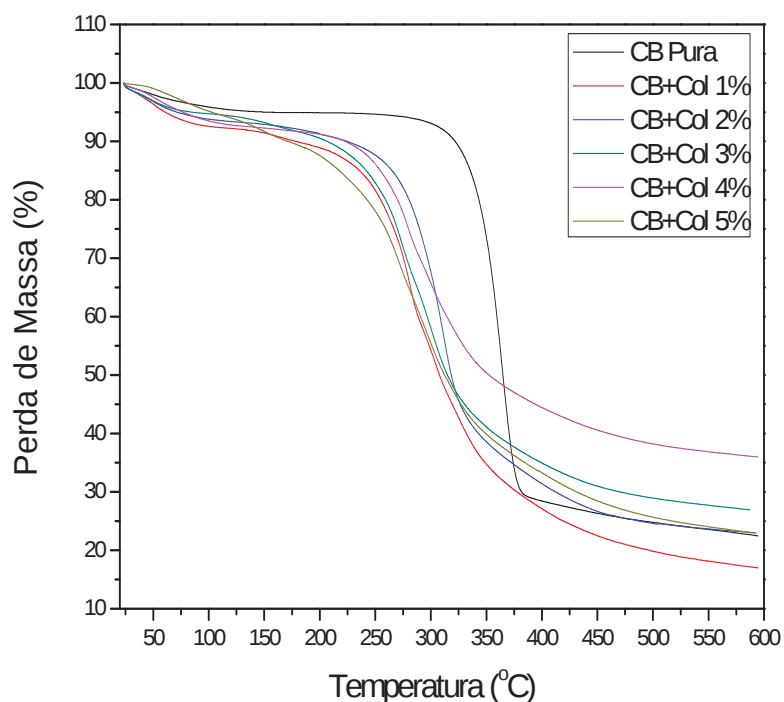


Figura 41. Curvas termogravimétricas comparando a perda de massa da CB e dos compósitos CB+Col de 1% a 5%.

4.3.1.5. Teste de Intumescimento

A Figura 43 apresenta as curvas de intumescimento para a membrana de celulose pura e seca (a) e dos compósitos contendo colágeno (b, c, d), utilizando água deionizada como agente de intumescimento.

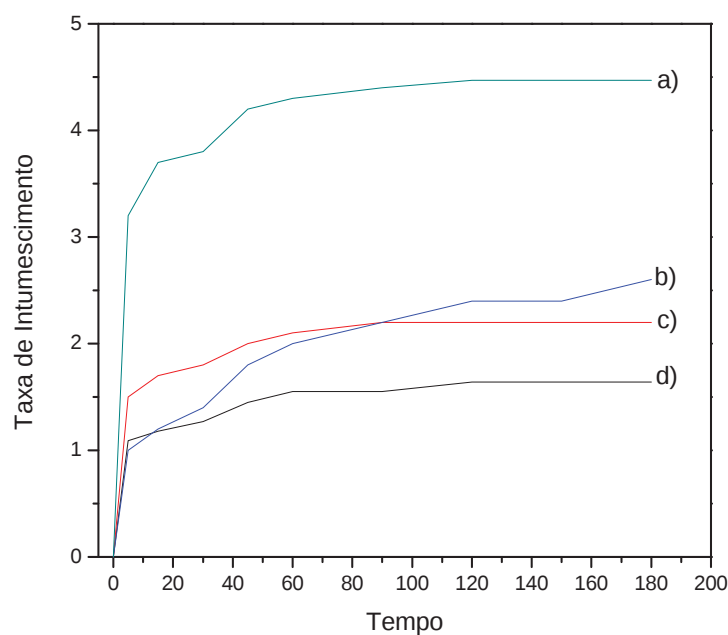


Figura 42. Teste de intumescimento dos compósitos (comparativo): a) Manitol, b) CB+Col 5%, c) CB+Col 3%, e d) CB+Col 1%,

Os resultados do teste mostraram uma menor capacidade de adsorção de água pelos compósitos, quando comparados com a membrana de CB pura. A taxa de ganho de massa variou entre 1,64 e 2,6, após imersão em água deionizada por 3 horas, ou seja, valores entre 40 e 60% menores que a CB pura, porém ainda dentro da faixa descrita por alguns autores, que descrevem taxas na faixa de 1,7 a 10 de ganho de massa para a celulose (GEORGE *et al.*, 2005; RAMBO *et al.*, 2008).

4.3.1.6. Teste de Ângulo de Contato

O ângulo de contato é uma propriedade de superfície resultante de interações intermoleculares que determina a hidrofilicidade da superfície das amostras. As medidas de ângulo de contato (Figuras 43 e 44) mostraram que tanto a CB pura, quanto os

compósitos apresentaram uma superfície bastante hidrofílica, tornando difícil de realizar as medidas, mesmo utilizando o recurso de filmagem.

Como não houve a formação de um ângulo de contato entre a gota e a superfície das amostras, foi aferido o tempo necessário para absorção da água, que foi de 18 segundos para a CB pura e de 26 segundos para o compósito CB+Col 5%. Este resultado mostra que a incorporação do colágeno, aumenta a hidrofobicidade da CB, tanto quanto maior o grau de incorporação, de acordo portanto com o teste de intumescimento. Este resultado se deve, provavelmente ao preenchimento dos poros da CB e às interações intermoleculares do compósito, diminuindo a disponibilidade dos grupos hidroxilas da celulose para interagir com as moléculas de água.

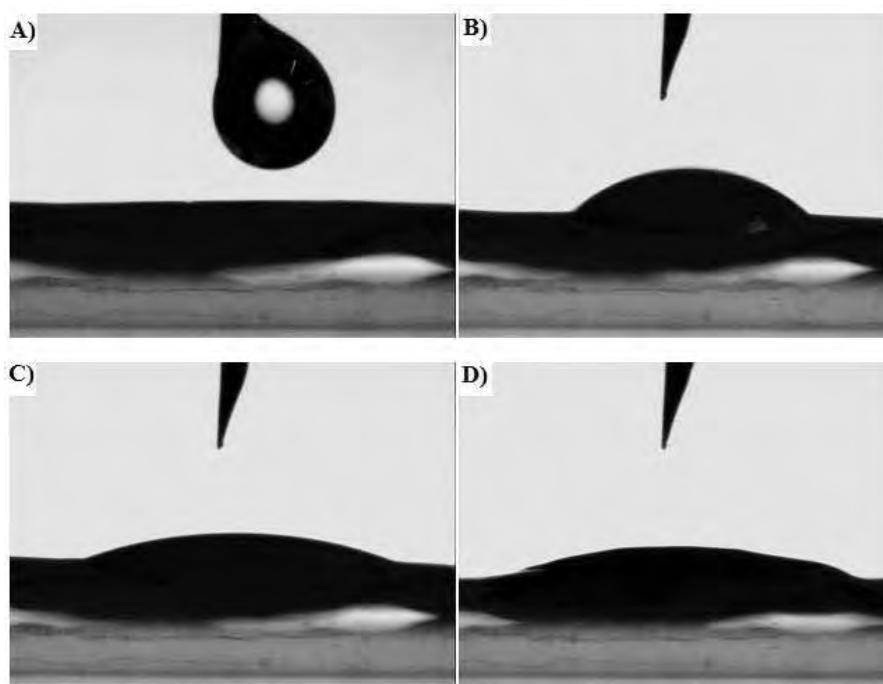


Figura 43. Medida de ângulo de contato de amostra de CB pura. Sequência de a) a d) mostrando como ocorreu a medida, na qual a gota séssil não foi formada.

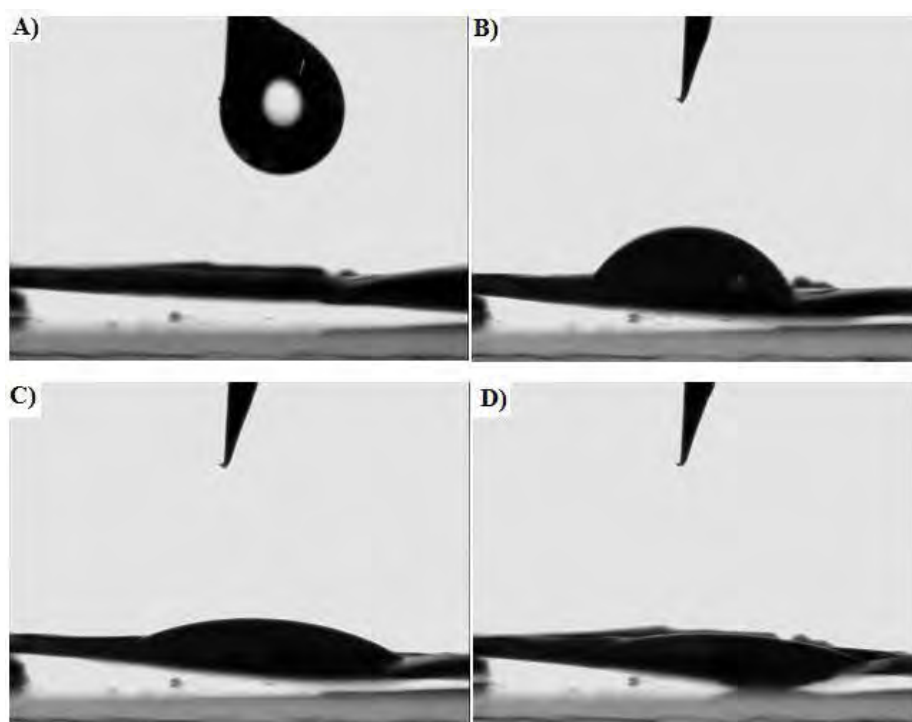


Figura 46. Medida de ângulo de contato de amostra de CB+Col 5%. Sequência de a) a d) mostrando como ocorreu a medida, na qual a gota séssil não foi formada.

5. Conclusões

Partindo das propriedades osteocondutoras da CB, da alta resistência mecânica do colágeno e da biocompatibilidade de ambos obtemos um compósito que pode ser utilizado como *scaffold* em regeneração tecidual. A Celulose Bacteriana produzida de maneira convencional (estática), apresentou maior produtividade empregando manitol como fonte de carbono e iniciando a inoculação em pH 4,5. O emprego do método agitado não é adequado para a produção de Celulose Bacteriana para fins de uso na área biomédica, pois a estrutura em forma de esferas (*pellets*), não é adequada para a produção de *scaffolds* para engenharia tecidual.

Comparativamente, maior produtividade de CB (5,47 g/L) empregando o método agitado foi observado, quando precedido de agitação por 72 h. Independentemente do método utilizado na produção de CB, o manitol foi a melhor fonte de carbono, resultando sempre em maior produtividade. Mas, apesar dos resultados encontrados, temos que notar que ao se trabalhar com um organismo vivo, percebe-se que mesmo utilizando as mesmas condições em dois cultivos, pode-se obter uma resposta completamente diferente, o que aconteceu em alguns testes realizados, o que mostra que a utilização do manitol, como melhor fonte em outros cultivos ou com outras cepas, pode não o mais eficiente, haja vista que o mecanismo do metabolismo do manitol em *G. xylinus* não tem sido bem elucidado.

Compósitos à base de celulose bacteriana e colágeno foram obtidos utilizando o método de adição *in situ*, em meio agitado, variando a quantidade de colágeno de 1 a 5% (v/v) no meio de cultura, o que foi comprovado a partir das técnicas de MEV, FT-IR, DRX, entre outras. Os compósitos obtidos, independentemente do teor de colágeno inserido, apresentaram menor estabilidade térmica e menor hidrofiliabilidade, quando comparada à celulose bacteriana pura, porém a aplicação dos mesmos como *scaffolds* é

extremamente interessante devido às amplas propriedades biológicas de ambos os materiais utilizados no compósito.

Com isso, o processo é promissor e novos estudos sobre a produção de compósitos *in situ* pode ser realizada futuramente em novos trabalhos, e os materiais a serem adicionados caberá ao objetivo proposto e da criatividade, de modo que esta pesquisa mostrou ser possível tal realização, sendo que a adição *in situ* mostrou-se ser considerada uma forma prática de se produzir nanocompósitos.

Referências

- ANTOINETTE, C. O. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, p. 173-207, 1997.
- ASTLEY, O. M.; CHANLIAUD, E.; DONALD, A. M. E.; GIDLEY, M. J. Structure of *Acetobacter* cellulose composites in the hydrated state. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 29, p. 193-202, 2001.
- ASTLEY, O. M.; CHANLIAUD, E.; DONALD, A. M.; GIDLEY, M. J. Tensile deformation of bacterial cellulose composites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 32, p. 28-35, 2003.
- BAE, S.; SHODA, M. Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 1366-1371, 2004.
- BAE, S. O. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 45-51, 2005.
- BAE, S.; SUGANO, Y.; SHODA, M. Improvement of bacterial cellulose production by addition of agar in a jar fermentor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, p. 33-38, 2004.
- BARUD, H. S.; ASSUNÇÃO, R. M. N.; MARTINES, M. A. U.; DEXPERT-GHYS, J. Bacterial cellulose–silica organic–inorganic hybrids. **Journal Sol-Gel Science and Technology**, v. 46, p. 363-367, 2008.
- BARUD, H. S.; LEGNANI, C.; QUIRINO, W. G.; CAIUT J. M. A.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Finas e flexíveis. **Revista Fapesp**, v. 164, p. 70-74, 2009.
- BARUD, H. S.; RIBEIRO, C. A.; CRESPI, M. S.; MARTINES, M. A.; DEXPERT-GHYS, J.; MARQUES, R. F.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Thermal characterization of bacterial cellulose-phosphate composite membranes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, p. 815-818, 2007.
- BELLOTE, A. F. J.; SILVA, H. D. da; FERREIRA, C. A.; ANDRADE, G. C. Resíduos da indústria de celulose em plantios florestais. **Boletim de Pesquisa Florestal**: Embrapa, v. 37, p. 99-108, 1998.
- BERTOLINI, A. C. (Ed). **Biopolymers technology**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2007. 197 p.
- BROWN, A. J. On an acetic ferment which forms cellulose. **Journal of Chemical Society**, v. 49, p. 432-432, 1886.
- BROWN, E. E. **Bacterial cellulose/thermoplastic nanocomposites**. 2007. 125 f. Dissertation (Master in Chemical Engineering) - Chemical Engineering Department, Washington State University, Washington, 2007.

BROWN, E. E.; LABORIE, M. P. G. Bioengineering bacterial cellulose/poly(ethylene oxide) nanocomposites. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 3074-3081, 2008.

BROWN, R. M. Jr.; SAXENA, I. M. Cellulose biosynthesis: a model for understanding the assembly of biopolymers. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 57-67, 2000.

BUEHLER, M. J. Nature designs tough collagen: explaining the nanostructure of collagen fibrils. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, v. 103, p. 12285-12290, 2006.

CAI, J.; KIMURA, S.; WADA, M.; KUGA, S. Nanoporous cellulose as metal nanoparticles support. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 87-94, 2009.

CALIL, V. L.; LEGNANI, C.; MOREIRA, G. F.; VILANI, C.; TEIXEIRA, K. C.; QUIRINO, W. G.; MACHADO, R.; ACHETE, C. A.; CREMONA, M. Transparent thermally stable poly(etherimide) film as flexible substrate for OLEDs. **Thin Solid Films**, v. 518, p. 1419-1423, 2008.

CALLISTER, W. D. **Materials science and engineering**: an introduction. New York: John Wiley & Sons, 2007. 975 p.

CHAVEZ-PACHECO, J. L.; MARTINEZ-YEE, S.; CONTRERAS-ZENTELLA, M.; ESCAMILLA-MARVÁN, E. Celulosa bacteriana en *Gluconacetobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones. **TIP**, v. 7, p. 18-25, 2004.

CHANLIAUD, E.; GIDLEY, M. J. *In vitro* synthesis and properties of pectin *Acetobacter xylinus* cellulose composites. **The Plant Journal**, v. 20, p. 25-35, 1999.

CLEENWERCK, I.; DE WATCHER, M.; GONZALEZ, A.; DE VUYST, L. ; DE VOS, P. Differentiation of species of the family *Acetobacteraceae* by AFLP DNA fingerprinting: *Gluconacetobacter kombuchae* is a later heterotypic synonym of *Gluconacetobacter hansenii*. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 1771-1786, 2009.

COLVIN, J. R.; WITTER, D. E. Congo red and calcofluor white inhibition of *Acetobacter xylinum* cell growth and of bacterial cellulose microfibril formation: Isolation and properties of a transient, extracellular glucan related to cellulose. **Protoplasma**, v. 116, p. 34-40, 1983.

COUSINS, S. K.; BROWN, R. M. X-ray diffraction and ultrastructural analyses of dye-altered celluloses support van der Waals forces as the initial step in cellulose crystallization. **Polymer**, v. 38, p. 897-902, 1997.

CULLITY, B. D. **Elements of x-rays diffraction**. [S.l]: Addison-Wesley, 1978, 555 p.

CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN, R. M. Jr. Microbial cellulose--the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27 , p. 145-151, 2006.

DO-MAN, K.; KIM, Y. M.; PARK, M. R.; PARK, D. H. Modification of *Acetobacter xylinum* bacterial cellulose using dextransucrase and alternansucrase. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 704-708, 1999.

DUSKOVA, M.; LEAMEROVA, E.; SOSNA, B.; GOJIS, O. Guided tissue regeneration, barrier membranes and reconstruction of the cleft maxillary alveolus. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 17, p. 1153-1160, 2006.

EICHHORN, S. J.; DUFRESNE, A.; ARANGUREN, M.; MARCOVICH, N. E.; CAPADONA, J. R.; ROWAN, S. J.; WEDER, C.; THIELEMANS, W.; ROMAN, M.; RENNECKAR, S.; GINDL, W.; VEIGEL, S.; KECKES, J.; YANO, H.; ABE, K.; NOGI, M.; NACAGAITO, A. N.; MANGALAM, A.; SIMONSEN, J.; BENIGHT, A. S.; BISMARCK, A.; BERGLUND, L. A.; PEIJS, T. Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. **Chemistry and Materials Science**, v. 45, p. 1-33, 2010.

EVANS, B. R.; O'NEIL, H. M.; MALYVANH, V. P.; LEE, I.; WOODWARD, J. Palladium-bacterial cellulose membranes for fuel cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, p. 917-923, 2003.

FINK, J.; KIELY, C. J.; BETHELL, D.; SCHIFFRIN, D. J. Self-organization of nanosized gold particles. **Chemistry of Materials**, v. 10, p. 922-926, 1998.

FRATZL, P. Biomimetic materials research: what can we really learn from nature's structural materials? **Journal of the Royal Society Interface**, v. 4, n. 15, p. 637-642, 2007.

FRATZL, P. (Ed.). **Collagen: structure and mechanics**. New York: Springer, 2008. 400 p.

GEORGE, J.; RAMANA, K. V.; SABAPATHY, S. N.; BAWA, A. S. Physico-mechanical properties of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) cellulose membrane. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1323-1327, 2005.

GOMIDE, J. L.; COLODETTE, J. L.; OLIVEIRA, R. C.; SILVA, C. M. Technological characterization of the new generation of Eucalyptus clones in Brazil for kraft pulp production. **Revista Árvore**, v. 29, p. 129-137, 2005.

GRANDE, C. J.; TORRES, F. G.; GOMEZ, C. M.; TRONCOSO, O. P.; MARTINEZ-PASTOR, J. Development of self-assembled bacterial cellulose–starch nanocomposites. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 1098-1104, 2009.

HAIGLER, C. H.; BROWN, R. M.; BENZIMAN, M. Calcofluor white ST Alters the *in vivo* assembly of cellulose microfibrils. **Science**, v. 210, p. 903-906, 1980.

- HAN, N. S.; ROBYT, J. F. The mechanism of *Acetobacter xylinum* cellulose biosynthesis: direction of chain elongation and the role of lipid pyrophosphate intermediates in the cell membrane. **Carbohydrate Research**, v. 313, p. 125-1333, 1998.
- HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochemical Journal**, v. 58, p. 345-352, 1954.
- HIRAI, A.; MASAKI, T.; HORII, F. TEM study of band-like cellulose assemblies produced by *Acetobacter xylinum* at 4 °C. **Cellulose**, v. 9, p. 105-113, 2004.
- HIRAI, A.; TSUJI, M.; YAMAMOTO, H.; HORII, F. *In situ* crystallization of bacterial cellulose III. Influences of different polymeric additives on the formation of microfibrils as revealed by transmission electron microscopy. **Cellulose**, v. 5, p. 201-213, 1998.
- HORNUNG, M.; BIENER, R.; SCHMAUDER, H. P. Dynamic modelling of bacterial cellulose formation. **Engineering Life Sciences**, v. 9, p. 342-347, 2009.
- HÜRZELER, M. B.; KOHAL, R. J.; NAGHSHBANDI, J.; MOTA, L. F.; CONRADT, J.; HUTMACHER, D.; CAFFESSE, R. G. Evaluation of a new bioresorbable barrier to facilitate guided bone regeneration around exposed implant threads. An experimental study in the monkey. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 27, p. 315-320, 1998.
- HWANG, J. W.; YANG, Y. K.; HWANG, J. K.; PYUN, Y. R.; KIM, Y. S. Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, p. 183-188, 1999.
- ISHIDA, T.; SUGANO, Y.; NAKAI, T.; SHODA, M. Effects of acetan on production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, p. 1677-1681, 2002.
- IWATA, T.; INDRARTI, L.; AZUMA, J. I. Affinity of hemicellulose for cellulose produced by *Acetobacter Xylinum*. **Cellulose**, v. 5, p. 215-228, 1998.
- JONAS, R.; FARAH, L. F. Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 101-106, 1998.
- JOSEPH, G.; ROWE, G. E.; MARGARITIS, A.; WAN, W. Effects of polyacrylamide on bacterial cellulose production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, p. 964-970, 2003.
- JUNG, R. ; KIM, H. S.; KIM, Y.; KWON, S. M. Electrically conductive transparent papers using multiwalled carbon nanotubes. **Journal of Polymer Sciences, Part B: Polymer Physics**, v. 46, p. 1235-1242, 2008.
- JUNQUEIRA L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 524 p.

- KARLSSON, S.; ALBERTSSON, A. C. Biodegradable polymers and environmental interaction. **Polymer Engineering and Science**, v. 38, p. 1251-1253, 1998.
- KAWANO, S.; TAJIMA, K.; KONO, H.; ERATA, T. Effects of endogenous endo- β -1,4-glucanase on cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*. **Journal of Biosciences and Bioengineering**, v. 94, p. 275-281, 2002.
- KENNEDY, J. F. (Ed.). **Cellulose and its derivatives** : chemistry, biochemistry and applications. New York: John Wiley & Sons, 1985. 551 p.
- KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN, A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie**, v. 44, p. 3358-3393, 2005.
- KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Sciences**, v. 26, p. 1561-1603, 2001.
- KRYSTYNOWICZ, A.; KOZIOLKIEWICZ, M.; WIKTOROWSKA-JEZIERSKA, A.; BIELECKI, S. Molecular basis of cellulose biosynthesis disappearance in submerged culture of *Acetobacter xylinum*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, p. 691-698, 2005.
- KUROSUMI, A.; SASAKI, C.; YAMASHITA, Y.; NAKAMURA, Y. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 333-335, 2009.
- LETHIO, J. **Functional studies and engineering of family 1 carbohydrate-binding molecules**. 2001. 57 f. Thesis (PhD in Biotechnology) - Department of Biotechnology, Royal Institute of Technology, Stockholm, 2001.
- LUO, H. ; XIONG, G. ; HUANG, Y. ; HE, F. Preparation and characterization of a novel COL/BC composite for potential tissue engineering scaffolds. **Material Chemistry and Physics**, v.110, p. 193-196, 2008.
- MATTOS, R. L. G.; VALENÇA, A. C. V. Celulose de mercado: novo ciclo de expansão. **BNDES Setorial**, v. 12, p. 93-103, 2000.
- MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução aos polímeros**. Rio de Janeiro: Edgard Blücher, 1999. 208 p.
- MATTHYSSE, A. G.; WHITE, S.; LIGHTFOOT, R. Mechanism of cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 1076-1081, 1995.
- MAZUNDAR, S. K. **Composite manufacturing**: material, product and process engineering. New York: CRC Press, 1991. 392 p.
- MIKKELSEN, D.; FLANAGAN, B. M.; DYKES, G. A.; GIDLEY, M. J. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 576-583, 2009.

MILLER, G. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

NOBLES, D. R.; BROWN, R. M. Transgenic expression of *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53582 cellulose synthase genes in the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis* strain UTCC 100. **Cellulose**, v. 15, p. 691, 2008.

ONDO, T. The assignment of IR adsorption bands due to free hidroxyl groups in cellulose. **Cellulose**, v. 4, p. 281-292, 1997.

PECORARO, E.; MANZANI, D.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Bacterial Cellulose from *Gluconacetobacter xylinus*: preparation and applications. In: BALDAGACEM, M. N.; GANDINI, A. **Monomers polymers and composites from renewable resources**. Amsterdam: Elsevier, 2008. v. 1, cap. 17, p. 369-383.

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

PINTO, R. J. B.; MARQUES, P.; MARTINS, M. A.; PASCOAL NETO, C.; TRINDADE, T. Electrostatic assembly and growth of gold nanoparticles in cellulosic fibres. **Journal of Colloidal Interface Sciences**, v. 312, p. 506-512, 2007.

POMMET, M.; JUNTARO, J.; HENG, J. Y. Y.; MANTALARIS, A. Surface modification of natural fibers using bacteria: depositing bacterial cellulose onto natural fibers to create hierarchical fiber reinforced nanocomposites. **Biomacromolecules**, v.9 n. 6, p. 1643-1651, 2008.

RAMBO, C. R.; RECOUVREUX, D. O. S.; CARMINATTI, C. A.; PITLOVANCIV, A. K.; ANTONIO, R. V.; PORTO, L. M. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, p. 549-554, 2008.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 55 , p. 35-58, 1991.

ROVEL, R. M. **Handbook of wood chemistry and wood composites**. London: Taylor & Francis, 2005. 512 p.

SANTA MARIA, L. C.; SANTOS, A. L. C.; OLIVEIRA, P. C.; BARUD, H. S.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Synthesis and characterization of silver nanoparticles impregnated into bacterial cellulose. **Material Letters**, v. 63, p. 797-799, 2009.

SANTOS, C. P.; REIS, I. N.; MOREIRA, J. E. B.; BRASILEIRO, L. B. Papel: como se fabrica. **Química Nova na Escola**, v. 14, p. 3-8, 2001.

SARKO, A. **Advances in solid state structural studies of celluloses**: a brief review. Disponível em: <<http://149.119.6.124/ce/confe>>. Acesso em: 3 maio 2010.

SAXENA, I. M.; BROWN, R. Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts. **Annals of Botany**, v. 96 p. 9-21, 2005.

SAXENA, I. M.; KUDLICKA, K.; OKUDA, K.; BROWN, R. M, Jr. Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (acs operon) of *Acetobacter xylinum*: implications for cellulose crystallization. **Journal Bacteriology**, v. 176, p. 5735, 1994.

SEIFERT, M.; HESSE, S.; KABRELIAN, V.; KLEEM, D. Controlling the water content of never dried and reswollen bacterial cellulose by the addition of water soluble polymers to the culture medium. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 42, p. 463-470, 2004.

SENA, L. A. **Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita-colágeno para aplicações biomédicas**. 2006. 95 f. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Departamento de Engenharia de Materiais e Metalurgia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

SHIRAI, A.; TAKAHASHI, M.; KANEKO, H.; NISHIMURA, S. I. Biosynthesis of a novel polysaccharide by *Acetobacter xylinum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 16, p. 297-300, 1994.

SHODA, M.; SUGANO, Y. Recent advances in bacterial cellulose production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 10, p. 1-8, 2005.

SJOSTROOM, E. **Wood chemistry: fundamental and applications**. New York: Academic Press, 1981. 1683 p.

SON, H.; HEO, M. ; KIM, Y.; LEE, S. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter sp.* A9 in shaking cultures. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 33, p. 1-5, 2001.

SUGIYAMA, J.; PERSSON, J.; CHANZY, H. Combined infrared and electron diffraction study of the polymorphism of native celluloses. **Macromolecules**, v. 24, p. 2461-2466, 1991.

SWISSA, M.; ALONI, Y.; WEINHOUSE, H.; BENIZMAN, M. Intermediary steps in *Acetobacter xylinum* cellulose synthesis: studies with whole cells and cell-free preparations of the wild type and a celluloseless mutant. **Journal of Bacteriology**, v. 143, p. 1142-1150, 1980.

THOMPSON, D. N.; HAMILTON, M. A. Production of bacterial cellulose from alternate feedstocks. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91, p. 503-513, 2001.

TOKOH, C.; TAKABE, K.; FUJITA, M.; SAIKI, H. Cellulose synthesized by *Acetobacter Xylinum* in the presence of acetyl glucomannan. **Cellulose**, v. 5, p. 249-261, 1998.

- VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S.; VANBAELEN, A.; JORIS, K.; DE WULF, P. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 93-99, 1998.
- WADDA, M.; OKANO, T. Localization of I α and I β phases in alga cellulose revealed by acid treatments. **Cellulose**, v. 8, p. 173-207, 2001.
- WAN, Y. Z.; HUANG, Y.; YUAN, C. D.; RAMAN, S.; ZHU, Y.; JIANG, H. J.; HE, F.; GAO, C. Biomimetic synthesis of hydroxyapatite bacterial cellulose nanocomposites for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 27, p. 855-864, 2007.
- WEINER, S.; WAGNER, H. D. The material bone: structure mechanical function relations. **Annual Review of Materials Science**, v. 28, p. 271-298, 1998.
- WIEGAND, C.; ELSNER, P.; HIPLER, U.; KLEEM, D. Protease and ROS activities influenced by a composite of bacterial cellulose and collagen type I *in vitro*. **Cellulose**, v. 13, p. 689-696, 2006.
- WILLIAMS, W. S.; CANNON, R. E. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 2448-2452, 1989.
- WHITNEY, S. E. C.; GOTHARD, M. G. E.; MITHCELL, J. T.; GIDLEY, M. J. Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. **Plant Physiology**, v. 121, p. 657-664, 1999.
- WITHNEY, S. E. C.; WILSON, E.; WEBSTER, J.; BACIC, A. Effects of structural variation in xyloglucan polymers on interactions with bacterial cellulose. **American Journal of Botany**, v. 93, p. 1402-1414, 2006.
- YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, p. 1244-1251, 1997.
- YAMANAKA, S.; SUGIYAMA, J. Structural modification of bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 7, p. 213-225, 2000.
- YAMANAKA, S.; WATANABE, K.; KITAMURA, N. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. **Journal of Materials Science**, v. 24, p. 3141-3145, 2005.
- YAN, Z.; CHEN, S.; WANG, H.; WANG, B. Cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of multi-walled carbon nanotubes. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 73-80, 2008.
- YU, X.; ATALLA, R. H. Production of cellulose II by *Acetobacter xylinum* in the presence of 2,6-dichlorobenzonitrile. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 19, p. 145-146, 1996.

ZHABANKOV, R. G. **Infrared spectra of cellulose and its derivatives**. New York: Consultants Bureau, 1966. 333 p.

ZHANG, T.; WANG, W.; ZHANG, D.; ZHANG, X.; YURONG, M.; ZHOU, Y.; QI, L. Biotemplated synthesis of solid nanoparticle-bacteria cellulose nanofiber nanocomposites and their application in biosensing. **Advanced Functional Materials**, v. 20, p. 1152-1160, 2010.

ZHOU, L. L.; SUN, D. P.; HU, L. Y.; LI, Y. W.; YANG, J. Z. J. Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. **Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 483-489, 2007.

Anexo 1 - Adições *in situ* durante a produção de celulose bacteriana

Bactéria	Meio (Composição)	Condições	Suplementos(s)	Resultados	Referência(s)
<i>G. xylinus</i>	—	—	Carboximetilcelulose	In vivo a gênese das fitas é diferente da formação da fita padrão. Fibrilas de pequeno diâmetro e conseqüentemente fitas de menor espessura. Agregados e película apresentam birrefringência, sobreposta e entrecruzada camadas de celulose contendo fibrilas orientadas paralelamente	HIRAI <i>et al</i> , 1998; HAIGLER <i>et al</i> , 1980; BAE & SHODA, 2004; BAE, 2005
<i>G. xylinus</i>	—	—	fosfoglicomanana	Orientação das fibrilas em paralelo e retardo da agregação das fibrilas	BAE & SHODA, 2004
<i>G. xylinus</i>	Calcofluor	—	Calcofluor White ST	Modificação da celulose pela ausência da união das fibrilas impedindo a cristalização, no entanto, a membrana torna se cristalina no estado seco	HAIGLER <i>et al</i> , 1980
<i>G. xylinus</i>		—	Hidroxietilcelulose metilcelulose	In vivo, alteração da formação das fitas ; modificação do tamanho das fibras e diâmetro menor	HIRAI <i>et al</i> , 1998
		—	Congo Red	Diminuiu a produção das fitas de CB no meio de cultura	COLVIN & WITTER, 1983

<i>G. xylinus</i>	Hestrim-Schramm	28° C por 7 dias em condições estáticas e sob agitação	N-acetilglicosamina (GlcNAc) e alguns sais de amônio.	Resultados satisfatórios utilizando 1.4% glicose e 0.6% GlcNAc	SHIRAI <i>et al</i> , 1994
<i>G. xylinus</i>	—	—	Xilana	A largura das fitas diminui devido ao controle da agregação das subunidades de fibrilas	BAE & SHODA, 2004
<i>G. xylinus</i>	Hestrim-Schramm	—	Xiloglicana	Modificação do tamanho das fibrilas e aumento da extensibilidade numa única direção	BAE & SHODA, 2004; ASTLEY <i>et al</i> , 2003; HIRAI <i>et al</i> , 1998
<i>G. xylinus</i>	—	—	2,6-diclorobenzonitrila (DCB), um herbicida que em determinadas concentrações, inibe a biossíntese de CB	Produção de celulose II na presença de DCB 12 mM	YU & ATALLA, 1996
<i>G. xylinus</i>	—	—	Tinopal	Intensifica as forças de Van der Waals na etapa inicial de cristalização da celulose	COUSINS & BROWN, 1997

<i>G. xylinus</i>			Complexos lignina-carboidratos, polissacarídeos hemicelulósicos : glicuronoxilana, arabinogalactana	Modificação da cristalinidade e resistência da CB com relação ao tratamento com bases fortes	IWATA <i>et al</i> , 1998
<i>G. xylinus</i> ATCC 10245	Hestrim-Schramm		0.2% acetil glicomanana (w/v) extraída da pinha	A presença de acetil glicomanana causa uma modificação das fibras tornando a rede mais frouxa, além da diminuição da fase Iá. Estes resultados são semelhantes utilizando CMC ou xiloglucana	TOKOH <i>et al</i> , 1998
<i>G. xylinus</i> ATCC 53524	–	–	Glicomanana, galactomanana	Indução da coalescência das fibrilas e redução drástica da cristalinidade	WHITNEY <i>et al</i> 1999
<i>G. xylinus</i> ATCC 10821	–	–	Dextrana sacarose e alternasacarose	Produção de celulose bacteriana solúvel e com uma nova estrutura	DO-MAN <i>et al</i> , 1999
<i>G. xylinus</i> ATCC 53524	Hestrim-Schramm	pH 6,2 a 30 °C a 50 rpm	Pectina (0,5%) com diferentes concentrações de cálcio	Há pouca afinidade da celulose pela pectina. Este fato explica a formação da camada média das plantas ricas em pectina e pobres em celulose. A rigidez e persistência nas propriedades mecânicas são devido às fibrilas de celulose mesmo na presença considerável da quantidade de pectina e cálcio	JOSEPH <i>et al</i> , 2003

<i>G. aceti</i> AJ12368	Modificado	-	Teinamicina e mecilinama	Síntese de fitas finas comparando com a CB pura	YAMANAKA & SUGIYAMA, 2000
			Cloranfenicol e Acido nalidixico	Síntese de fitas grossas e maiores comparando com CB pura	YAMANAKA & SUGIYAMA, 2000
<i>G. xylinus</i> 10821 e <i>G.</i> <i>xylinus</i> 23770	Hestrim-Schramm	pH 5.0 a 30°C por 14 dias	Efluentes alimentícios	Ambas as bactérias produzem celulose em todos os suplementos utilizados. A bactéria 23770 produziu 17% a mais de celulose em comparação como meio controle	THOMPSON & HAMILTON, 2001
<i>G. xylinus</i> BPR 2001	Naritomi modificado: frutose, CSL	pH 5 sob agitação a 175 rpm e biorreatores por 7 dias a 28 °C	Poliacrilamida 0-3%	Formação de esferas de CB com diferentes tamanhos	JOSEPH <i>et al</i> , 2003
<i>G. xylinus</i>	Hestrim-Schramm	Estático por 14 dias	CMC, PVA, MC: 0,5%, 1% e 2% (w/v)	Produção de flocos e aumento na produção de CB. O material obtido apresenta uma estrutura porosa e ocorre um aumento da capacidade de absorção de água (porem não é proporcional com o aumento da quantidade de CMC ou MC adicionada ao meio). Tais resultados são obtidos utilizando 0,5 % de MC, 2% de CMC e 0,5% de PVA	SEIFERT <i>et al</i> , 2003

<i>G. xylinus</i> BPR 2001 e EP1	CLS, Frutose, solução de vitaminas	Estático	Agar 0 - 1%(w/v)	BPR 2001: produção de CB de 8,0 g/l para 12,8 g /L com 0,4% de Agar. EP1:de 11,6 g/l para 5,5 g/l com 0,6% de agar. A produtividade está associada com o aumento da viscosidade do meio ocasionada pelo acetan (def: polímero similar a xantana, constituído de uma cadeia alternada de resíduos de glicose com uma cadeia pentasacarídea)	BAE <i>et al</i> , 2004
<i>G. xylinus</i> BPR 2001	CLS, frutose	—	Melaço	O melaço pode ser utilizado a uma concentração menor que 20 g/l para a produção de CB. Para a produção de CB é essencial a presença de frutose em qualquer proporção	BAE, 2005
<i>G. xylinus</i> ATCC 53524	Hestrin-Schramm	30 °C por 48 horas, estático e agitação a 50 rpm	Xiloglucana (0,5%)	Culturas estáticas resultaram maior incorporação de xiloglucana aos compósitos. Há uma alteração na razão entre as fases Iá e Iâ. Menor a massa molecular da xiloglucana utilizada, menor a quantidade incorporada nos compósitos. Quanto maior o peso molecular maior o entrecruzamento	BAE <i>et al</i> , 2004

<i>G. xylinus</i> ATCC 23769	Hestrin-Schramm	Estático e sob agitação a 500 rpm a 29 ⁰ C por 7 dias	Polióxido de etileno (PM 10 ⁵ g/mol) de 0,5%, 1%, 2%, 3% e 5%(w/w).	As nanofibras de CB tornam-se menores porem se agregam em largas fitas. Ha uma diminuição do ponto de fusão dos compósitos ocasionado pelo deposito da PEO bem como outro fator que contribui são restos celulares (bactérias). A PEO também favorece a fase cristalina correspondente a fase Iâ em relação a Iá da CB. O tratamento da CB é realizada com água ao invés de NaOH e não é eficiente para a remoção dos debris celulares somente na remoção de restos de meios de cultura. A lavagem com água, no entanto remove a PEO	BROWN & LABORIE, 2008
<i>G. xylinus</i> NUST4.1	Glicose, sacarose, CSL, (NH ₄) ₂ SO ₄ , KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ ·7H ₂ O com	pH 6,0 a 29°C	Alginate de sódio de 0 a 0,1%(w/v)	Frascos sob agitação: ocorre um aumento da produção de 3,7g/l para 6,0 com 0,04% de NaAlg. Realizado em bioreatores: de 1,09 g/l para 1,7g/l com 0,04% de NaAlg. apresenta uma estrutura porosa e presença de partículas (NaAlg) em sua superfície Ocorre também uma diminuição da fase Iá e a cristalinidade da CB que não aumenta com a adição de alginato por que há aumento na viscosidade do meio	ZHOU <i>et al</i> , 2007

<i>G. xylinus</i> isolada da nata de coco	Água de coco, sacarose, sulfato de amônio, ácido acético	Estático por 5 dias	Quitosana com peso molecular de 30 e 80 com grau de acetilação de 0,85	Quitosana deve ser utilizada a uma concentração < 75%(w/v), ou pode ocorrer inibição na produção. Aumento na densidade das fibras (não forma poros). Aumento da resistência mecânica e da capacidade de retenção hídrica proporcionais à quantidade de quitosana utilizada. Não apresentou atividade antimicrobiana. Não alterou a cristalinidade da CB	PHISALAPHONG & JATUPAIBOON, 2008
<i>G. xylinus</i> NBRC13693	controle: Hestrin- Schramm meio II; sucos de frutas; meio III sucos de frutas com fontes de nitrogênio	pH 6,0	sucos de laranja, pêra japonesa, uva, abacaxi e maçã filtrados e esterilizados	Produção de CB com todos os sucos porem com melhores resultados com a laranja. De vários componentes da laranja foi possível obter CB; de 100g de laranja obteve-se 0,65g/l de CB (peso seco)	KUROSUMI <i>et al</i> , 2009
<i>G. xylinus</i> X- 2	0,3%(w/w) de chá verde; 5 % (w/w) de sacarose;	—	2,2%(w/v) de colágeno tipo I	Alteração da estrutura cristalina da CB. Nanofibrilas de maior diâmetro e aspecto rugoso, melhor biocompatibilidade	LUO <i>et al.</i> , 2008

<i>G. xylinus</i> BPR 2001	Meio H-S modificado (substituição de glicose por frutose)	Agitação a 150 rpm a 30° C por 7 dias	Fibras naturais como o sisal	Ocorre deposição das nanofibrilas de CB sobre as fibras naturais dispostas de forma randômica. Isto por que ambos contem grande quantidade de grupos OH. Para melhorar a interação entre os dois polímeros as fibras eram previamente tratadas com acetona que removia os compostos hidrofóbicos para facilitar a penetração da CB. No entanto observa uma diminuição da força e modulo de Young resultado da separação das fibras, resultando em uma estrutura não coesiva. Nos bioreatores ocorre deposição de CB no interior das fibras, oposto do ocorre nos frascos sob agitação, na qual há o depósito na superfície das fibras naturais	POMMET <i>et al</i> , 2008
-------------------------------	---	--	---------------------------------	--	----------------------------