



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FELIPE RAVELLY ALVES DE SOUZA

**OBTENÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA A PARTIR DE
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COM POTENCIAL PARA
FORMULAÇÃO DE EMBALAGENS BIOATIVAS**

RECIFE
2021

FELIPE RAVELLY ALVES DE SOUZA

**OBTENÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA A PARTIR DE
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COM POTENCIAL PARA
FORMULAÇÃO DE EMBALAGENS BIOATIVAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Produção de compostos bioativos e enzimas industriais.

Orientador(a): Prof^a. Dra Thayza Christina Montenegro Stamford.

Co-Orientador(a): Prof^a Dra. Michelle Galindo de Oliveira

RECIFE
2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Souza, Felipe Ravelly Alves de
Obtenção de celulose bacteriana a partir de resíduos agroindustriais com potencial para formulação de embalagens bioativas / Felipe Ravelly Alves de Souza - 2021.

65 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford.
Coorientadora: Profa. Dra. Michelle Galindo de Oliveira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Recife, 2021.
Inclui referências.

1. Resíduos industriais. 2. Resíduos agrícolas. 3. Biotecnologia. I. Stamford, Thayza Christina Montenegro (orientadora). II. Oliveira, Michelle Galindo de (coorientadora). III. Título.

6284458

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-015-2022

FELIPE RAVELLY ALVES DE SOUZA

**OBTENÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA A PARTIR DE RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS COM POTENCIAL PARA FORMULAÇÃO DE
EMBALAGENS BIOATIVAS**

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal
de Pernambuco, como requisito à
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Aprovada em: 29/04/2021

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Thayza Christina Montenegro Stamford
UFPE

Prof^a. Dr^a. Norma Buarque de Gusmão
UFPE

Prof^a. Dr^a. Lúcia Raquel Ramos Berger
UFAPE

Recife, 29 de abril de 2021.

Ao meu Pai (*in memoriam*), José Ronaldo, e ao seu
sonho de “ver um filho doutor”.

À minha Mãe, Maria Eliete, por ser um exemplo
de Mãe, de mulher e de pessoa. Minha fonte de
inspiração.

À minha Vó, Maria Pereira, por ser uma
segunda Mãe e sempre me incentivar a correr
atrás dos meus objetivos.

Dedico-lhes

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao cosmos, pelas energias, coragem e à sensação de estar trilhando o caminho certo;

À minha família, em especial aos meus Pais, José Ronaldo (*in memoriam*) e Maria Eliete, e a minha Vó, Maria Pereira, pelo afeto e incentivo;

À minha orientadora Thayza Stamford, por ser um exemplo de pessoa e de profissional, por sua paciência e prestatividade;

Ao Prof. Dr. Wagner, Prof.a. Dr^a. Mônica, Prof. Dr. André Lavorante e a Me. Danielle, pelo acolhimento e suporte no desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Rafael Barros e Prof. Emmanuel, por terem cedido os resíduos industriais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE, pelo apoio inicial na produção da celulose.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa, o que tornou possível minha total dedicação ao mestrado;

À Klayton Cabral da Silva, secretário do Programa de pós-graduação em Biotecnologia-PPGBIOTEC, por todo auxílio e atenção;

À coordenação e aos professores do PPGBIOTEC pela oportunidade, conselhos, orientações e por todos os ensinamentos que me permitiram galgar rumo à sociedade científica;

E por fim, mas não menos importante, aos meus amigos e colegas, por tornarem os dias bons em dias melhores e os dias difíceis em suportáveis;

A todos Esses, gratidão...

“A persistência é o caminho do êxito”

- Charles Chaplin

RESUMO

A celulose é um homopolímero linear, obtido principalmente a partir de matéria vegetal, largamente utilizado nas indústrias dos mais diversos segmentos. Suas aplicações podem ser ampliadas através das divergências nas propriedades físico-químicas e mecânicas encontradas na celulose de origem bacteriana, como a utilização para a produção de embalagens bioativas, que são materiais que podem interagir com os alimentos de maneira desejável sem provocar alterações nas suas propriedades físicas, químicas, nutricionais e organolépticas. Mediante o exposto, este trabalho tem como objetivo produzir e caracterizar celulose bacteriana a partir de resíduos agroindustriais utilizando a *Komagataeibacter hansenii* (ATCC 23769) e propor a formulação de uma embalagem bioativa composta pela associação desse polímero com a quitosana fúngica. Para isso, a celulose bacteriana foi produzida por *Komagataeibacter hansenii* em meio alternativo composto por resíduos industriais (milhocina e glicerol). A quitosana fúngica foi cedida pelo grupo de pesquisa do LaMAp, tendo sido produzida por *Aspergillus niger* crescido em meio de cultivo alternativo (resíduos agroindustriais vegetais). As embalagens bioativas foram preparadas através da formulação de uma solução aquosa de carboximetilcelulose (1%) e quitosana fúngica (1%) em ácido cítrico a 4%. No estudo da composição dos resíduos utilizados neste trabalho pode-se constatar que a glicerina bruta (ph 9,46; teor de cinzas $4,57 \pm 0,015$, umidade $42,17 \pm 0,2$; Material orgânica não glicerínica $20,5 \pm 0,05$ e concentração de glicerol de 53,26 %) e a milhocina (ph 4,17; açúcares totais 115,74 e redutores 12,36 mg/ml; teor de cinzas $7,06 \pm 0,015$, umidade 56,36 e proteínas totais $27,63 \pm 0,03\%$) possuem potencial para utilização na formulação de meios de cultivo de baixo custo para produção de celulose bacteriana, o primeiro atuando como fonte principal de carbono e o segundo como fonte de nitrogênio e de outros micronutrientes. Essa afirmação se justifica, pois, durante a produção de celulose bacteriana o meio de cultura alternativo proporcionou uma maior estabilidade no pH ao longo da fermentação e possibilitou uma obtenção de celulose aproximadamente duas vezes maior no meio alternativo, quando comparado com um meio anteriormente descrito. Através da análise da FTIR pode-se aferir que ambas as membranas, obtidas nos diferentes meios, apresentaram bandas em 3334, 2911, 1165 cm^{-1} e no intervalo entre 1028-1072 cm^{-1} , o que confirma a pureza da celulose bacteriana (CB) produzida. A embalagem bioativa formulada demonstrou uma procedibilidade satisfatória quanto a inibição do crescimento dos fungos *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer* e *Citeromyces siamensis*, com taxas de viabilidade celular inferiores a 20% durante as 96 horas de incubação. Diante do exposto, conclui-se que a utilização de resíduos (agro)industriais, como a milhocina e o glicerol, como substratos alternativos para a obtenção de celulose bacteriana possui um potencial promissor que influi diretamente no valor do produto final e com a preservação do meio ambiente, pois reutiliza materiais que outrora eram descartados na natureza. Além disso a formulação de embalagens bioativas a base de quitosana/carboximetilcelulose demonstrou um potencial de ação como agente de preservação que pode ser interessante para a indústria alimentícia.

Palavras-chave: Biopolímeros, celulose bacteriana, embalagem bioativa, química verde, resíduos industriais.

ABSTRACT

Cellulose is a linear homopolymer, mainly obtained from vegetable matter, widely used in industries in the most diverse segments. Its applications can be expanded through the divergences in the physical-chemical and mechanical properties found in cellulose of bacterial origin, such as the use for the production of bioactive packaging, which are materials that can interact with food in a desirable manner without causing changes in its properties physical, chemical, nutritional and organoleptic. Based on the above, this work aims to produce and characterize bacterial cellulose from agro-industrial residues using *Komagataeibacter hansenii* (ATCC 23769) and to propose the formulation of a bioactive packaging composed by the association of this polymer with fungal chitosan. For that, bacterial cellulose was produced by *K. hansenii* in an alternative medium composed of industrial residues (corn steep liquor and glycerol). The fungal chitosan was provided by the LaMAp research group, having been produced by *Aspergillus niger* grown in an alternative culture medium (vegetable agro-industrial residues). Bioactive packaging was prepared by formulating an aqueous solution of carboxymethylcellulose (0.3%) and fungal chitosan (1%) in 4% citric acid. In the study of the composition of the residues used in this work, it can be seen that the crude glycerin (ph 9.46; ash content 4.57 ± 0.015 , humidity 42.17 ± 0.2 ; non-glycerin organic material 20.5 ± 0.05 and glycerol concentration of 53.26%) and corn steep liquor (ph 4.17; total sugars 115.74 and reducers 12.36 mg/ml; ash content 7.06 ± 0.015 , moisture 56.36 and proteins totals $27.63 \pm 0.03\%$) have potential for use in the formulation of low-cost culture media for the production of bacterial cellulose, the first acting as the main source of carbon and the second as a source of nitrogen and other micronutrients. This statement is justified, because, during the production of bacterial cellulose, the alternative culture medium provided greater stability in pH throughout the fermentation and made it possible to obtain cellulose approximately twice as high in the alternative medium, when compared with a previously described medium. Through FTIR analysis, it can be verified that both membranes, obtained in different media, showed bands at 3334, 2911, 1165 cm^{-1} and in the range between 1028-1072 cm^{-1} , which confirms the purity of bacterial cellulose (CB) produced. The formulated bioactive packaging demonstrated satisfactory suitability as to the growth inhibition of the fungi *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer* and *Citeromyces siamensis*, with cell viability rates below 20% during the 96 hours of incubation. Given the above, it is concluded that the use of (agro)industrial residues, such as corn steep liquor and glycerol, as alternative substrates for obtaining bacterial cellulose has a promising potential that directly influences the value of the final product and with the preservation of the environment, because it reuses materials that were once discarded in nature. In addition, the formulation of bioactive packaging based on chitosan / carboxymethylcellulose demonstrated an action potential as a preservation agent that may be interesting for the food industry.

Keywords: Bacterial cellulose, bioactive packaging, biopolymers, industrial waste, green chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura química da quitina (a) e da quitosana (b).....	27
Figura 2: A unidade de repetição da celulose (celobiose).....	28
Figura 3: Modelo esquémico de uma a) fibrila elementar de celulose (CEF) de trinta e seis (36) cadeias; b) microfibrila contendo três (03) CEF; e c) macrofibrilas	29
Figura 4: Comportamento do pH dos meios de cultivo	45
Figura 5: Curva de crescimento celular	46
Figura 6: Membranas de celulose obtidas em diferentes meios de cultivo.....	46
Figura 7: Produção de celulose bacteriana em diferentes meios ao longo de 15 dias (g/L).....	47
Figura 8: Espectros na região do infravermelho das membranas de celulose bacteriana	48
Figura 9:Atividade antifúngica das substâncias testes.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição dos meios de cultura (g/L).....	37
Tabela 2: Distribuição das soluções na placa de 96 poços.....	39
Tabela 3: Parâmetros glicídicos e protéicos dos resíduos (milhocina e glicerol)	40
Tabela 4: Composição dos resíduos (milhocina e glicerol)	42
Tabela 5: Produção de celulose bacteriana em diferentes meios de cultura	43

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CB – Celulose de origem bacteriana
- CV – Celulose de origem Vegetal
- AAB - Bactérias do ácido acético (acetic acid bactéria)
- QF – Quitosana fúngica
- ONU – Organização das Nações Unidas
- FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
- CSL – Milhocina (Corn Steep Liquor)
- HDPE - Polietileno de alta densidade (High-density polyethylene)
- LDPE - Polietileno de baixa densidade (Low-density polyethylene)
- PM – Peso Molecular
- GD – Grau de desacetilação
- CEF – Fibrila elementar de celulose (cellulose elementary fibril)
- pH – Potencial hidrogeniônico
- ATP – Adenosina trifosfato
- HS - Hestrin-Schramm
- DEN - Departamento de Energia Nuclear da UFPE
- LaMTESA – Laboratório de Medicamentos, Tecnologias, Energias e Soluções Ambientais
- LEAAL – Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos Nonete Barbosa Guerra
- TC – Teor de cinzas
- EB - Embalagens bioativas comestíveis ecossustentáveis
- Eq – Equação
- AT – Açúcares totais
- AR – Açúcares redutores
- CMC – Carboximetilcelulose
- DNS - 3,5-dinitrosalicílico
- MONG - matéria orgânica não glicerínica
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
- Gpa – Meio de cultura com Glicerol comercial (padrão)

GR – Meio de cultura com Glicerol resíduo

GRC - Meio de cultura misto com glicerol resíduo + padrão

MP – Meio de cultura com Milhocina

MC – Meio de cultura misto Milhocina + Padrão

GM - Meio de cultura com Milhocina + Glicerol Resíduo

FTIR - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
3.1 A INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA: PRODUTIVIDADE X CRESCIMENTO POPULACIONAL	21
3.1.1 Gerenciamento dos resíduos agroindustriais	21
3.1.2 Perdas na produção agrícola	23
3.2 MECANISMOS DE CONSERVAÇÃO	24
3.3 EMBALAGENS BIOATIVAS	25
3.4 A QUITOSANA	26
3.5 A CELULOSE	28
3.6 BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CELULOSE	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS INDUSTRIAIS	32
4.1.1 pH	32
4.1.2 Umidade	32
4.1.3 Cinzas	33
4.1.4 °Brix	33
4.1.5 Açúcares totais e redutores	33
4.1.6 Proteínas totais	34
4.1.7 Matéria orgânica não glicerinosa (MONG)	35
4.1.8 Quantificação de glicerol	35
4.2 A CELULOSE BACTERIANA	36
4.2.1 Cepa	36
4.2.2 Preparo do inóculo: <i>Komagataeibacter hansenii</i>	36
4.2.3 Meios de cultura	36
4.2.4 Estudo da produção de CB	37

4.3 EMBALAGENS BIOATIVAS (EB).....	38
4.4 CARACTERIZAÇÕES	38
4.4.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	38
4.4.2 Ação antimicrobiana.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS INDUSTRIAIS	40
5.2 PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERINA.....	43
5.2.1 Ensaio preliminar	43
5.2.2 Potencial hidrogeniônico (pH)	44
5.2.3 Crescimento celular e a produção de celulose.....	45
5.3 CARACTERIZAÇÕES	47
5.3.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	47
5.3.2 Ação antimicrobiana.....	48
6 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos é uma das mais importantes de transformação, não só no Brasil, mas a nível mundial. O crescimento populacional e o aumento da demanda por alimentos tanto em um aspecto quantitativo, para suprir a necessidade alimentar da população, quanto qualitativo, a fim de manter parâmetros de qualidade e segurança alimentar, têm sido alvos de intensificação nos estudos científicos. Tais estudos tem o intuito de investigar e encontrar soluções para os mais diversos problemas, como a manutenção da qualidade nos produtos de prateleira (GUERRA; ROCHA, F. S.; NODARI, 2015; TIMOFIECSYK; PAWLOWSKY, 2000).

O produto alimentício é o foco da produção na indústria de alimentos, contudo, além deste, são gerados outros materiais, os resíduos - que são todos e quaisquer elementos que não são considerados matéria prima ou produto e é oriundo das etapas de processamento que vão desde a colheita até o produto final (GUERRA; ROCHA, F. S.; NODARI, 2015)

Na maioria das vezes esses materiais são descartados no meio ambiente sem qualquer tratamento, o que gera impactos relacionados não somente a questões ambientais, mas também à saúde pública. Uma das soluções para contornar os problemas causados pela má administração desses recursos é a reutilização destes em processos através da implementação de um sistema que utilize uma produção sustentável, fator que pode influenciar, inclusive, no aumento da lucratividade das empresas (LANDIM *et al.*, 2016; TIMOFIECSYK; PAWLOWSKY, 2000)

Dentre as mais diversas formas de reutilização dos resíduos industriais, o processamento biotecnológico se destaca pois permite que estes subprodutos possam ser reutilizados para a obtenção de uma gama de produtos valiosos como combustíveis, rações, produtos farmacêuticos ou biopolímeros – polímeros de origem natural que possuem uma vasta possibilidade de aplicação, entre elas, a formulação de materiais que possam ser utilizados como matrizes de revestimento e conservação de alimentos (SINGH-NEE NIGAM; PANDEY, 2009).

Diversos mecanismos e/ou processos são utilizados com o intuito de promover a diminuição da taxa de deterioração dos alimentos como a utilização de embalagem, por exemplo, que de acordo com a ANVISA (2001) trata-se do invólucro, recipiente ou qualquer forma de acondicionamento, removível ou não, destinada a cobrir,

empacotar, envasar, proteger ou manter, especificamente ou não, matérias-primas ou produtos.

As embalagens bioativas, por sua vez, são sistemas capazes de diminuir a deterioração, seja pela ação antimicrobiana, ou pela preservação de características desejáveis por meio da interação entre os compostos incorporados e o alimento. Essas embalagens apresentam em sua composição polímeros que são de origem biológica, tratadas ou não com substâncias que potencializem a sua atuação. Entretanto, para o seu desenvolvimento, devem ser levados em consideração aspectos como: natureza química do alimento e dos microrganismos envolvidos, condições de armazenamento e distribuição, características organolépticas e toxicidade dos compostos, além das propriedades físicas e mecânicas dessas embalagens (ALMEIDA *et al.*, 2015).

A utilização de compostos bioativos de origem natural, como a celulose e a quitosana, para conservação de alimentos tem sido cada vez mais evidenciada cientificamente. Pois, diferente dos compostos químicos sintéticos, esses polímeros podem apresentar baixa toxicidade, biodegradabilidade, ação antioxidante e antimicrobiana, além de características físicas e sensoriais que são de interesse industrial (BARBOSA *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2017).

A celulose $(C_6H_{10}O_5)_n$ é um polímero natural, formado por unidades de anidroglicose, que pode ser encontrado em plantas, algas, fungos e bactérias. A celulose bacteriana (CB), especificamente, apresenta uma estrutura primária similar à da celulose vegetal (CV), porém, difere na organização das cadeias e no diâmetro das microfibrilas. Além disso, a CB é flexível, atóxica, possui porosidade reduzida, excelentes propriedades mecânicas, ópticas e sensoriais (CARREÑO; CAICEDO; MARTÍNEZ, 2012; DONINI *et al.*, 2010)

Diversos microrganismos possuem a capacidade de sintetizar celulose, entre eles, as bactérias do ácido acético (AAB) se destacam, em especial a *Komagataeibacter hansenii*, por ser capaz de utilizar uma variedade de fontes de carbono para produzir CB em culturas líquidas (RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015; YAMADA *et al.*, 2012).

Apesar das suas excelentes propriedades, em algumas aplicações específicas, como na formulação de soluções poliméricas destinadas a produção de embalagens bioativas, existem algumas restrições, pois a CB apresenta alto coeficiente de permeabilidade ao vapor d'água, além de não ser macia quando seca e sua opacidade

pode comprometer a aparência do material a ser revestido (CARREÑO; CAICEDO; MARTÍNEZ, 2012; DONINI *et al.*, 2010). Entretanto, esses parâmetros podem ser aprimorados através de modificações químicas, ou por associações com outros polímeros.

A quitosana $(C_6H_{11}O_4N)_n$ é um biopolímero policatiônico encontrado naturalmente no exoesqueleto de crustáceos e insetos, rádios de moluscos e na parede celular de alguns fungos. Dentre estas, apesar da quitosana oriunda de crustáceos ser a mais comercializada, a quitosana fúngica (QF) se destaca por apresentar independência da influência de fatores sazonais, facilidade de produção em larga escala, padronização das características físico-químicas do polímero, extração simultânea de quitina e quitosana, além da redução do tempo e custos de produção, pois o processo de extração é simples e barato. Sua aplicabilidade como embalagem bioativa comestível deve-se a sua biocompatibilidade com os tecidos vivos, não toxicidade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana, antioxidante, capacidade de formar película e facilidade de associação com outros compostos (BARBOSA *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2017).

Diante do exposto e fundamentando-se na possibilidade de que a associação entre a QF e a CB possa gerar um novo material que interaja de forma positiva com os alimentos, agregando propriedades de interesse industrial, este trabalho tem como objetivo produzir e caracterizar celulose bacteriana a partir de resíduos agroindustriais e propor a formulação de uma embalagem bioativa composta por celulose bacteriana e quitosana fúngica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e caracterizar celulose bacteriana a partir de resíduos agroindustriais utilizando a *Komagataeibacter hansenii* (ATCC 23769) e propor a formulação de uma embalagem bioativa composta pela associação desse polímero com a quitosana fúngica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e caracterizar resíduos agroindustriais com potencial para formulação de meios de cultivo de baixo custo.
- Produzir, extrair e caracterizar celulose bacteriana obtida por *Komagataeibacter hansenii* a partir da utilização desses resíduos como substrato alternativo;
- Propor a formulação de uma embalagem bioativa comestível ecossustentável de celulose/quitosana microbiana.
- Verificar a atividade antimicrobiana da embalagem formulada.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 A INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA: PRODUTIVIDADE X CRESCIMENTO POPULACIONAL

A preocupação mundial com o crescimento populacional (1,18% ao ano), uso exagerado dos recursos naturais (20% a mais que a taxa de reposição) e a demanda cada vez maior por alimentos em ordem quanti-qualitativa tem direcionado boa parte dos estudos científicos ao ramo da indústria alimentícia. Tal direcionamento busca solucionar os mais diversos problemas referentes ao setor, dentre estes: I) o aumento da produtividade, para sanar a necessidade alimentar em virtude do crescimento populacional, sem agredir o meio ambiente; II) manuseio dos resíduos (agro)indústrias, a fim de diminuir os impactos ambientais causados pela má administração desses recursos; III) e redução das perdas na produção agrícola, problema que influi diretamente no valor do produto para o consumidor final (CARNEIRO, 2003; LEITE, B. Z.; PAWLOWSKY, 2005; LIMA, J. S. G., 2017).

Segundo a ONU (2020), estima-se que a população global chegou a 7,8 bilhões de pessoas e que, até 2060, ultrapassará a marca dos 10 bilhões de habitantes, fato que nos remete a uma reflexão sobre alternativas que possibilitem uma alimentação adequada para todos. Para além da questão alimentar, o crescimento populacional cria focos de tensão no meio ambiente, na organização social, nos sistemas econômicos e no desenvolvimento tecnológico, uma vez que traz implicação direta na expansão das áreas de cultivo, industriais e urbanas (MUTEIA, 2014)

Com base nos dados publicados pela FAO (2020), será necessário, em 2060, um aumento de pelo menos 70% da produção de alimentos em escala mundial para suprir a necessidade da população. Entretanto, este aumento só será bem-vindo se as áreas de cultivo não excederem cerca de 20% de expansão considerados sustentáveis. Diante deste cenário, o aumento da produtividade se apresenta como um caminho necessário para ampliação da oferta e redução dos danos no ecossistema.

3.1.1 Gerenciamento dos resíduos agroindustriais

Proveniente da produção industrial, os resíduos industriais, ou resíduos sólidos, são considerados um dos responsáveis por grande parte dos impactos ambientais que

ocorrem atualmente. Na sua grande maioria, são considerados perigosos e acarretam consequências negativas não apenas para o meio ambiente, mas também para a saúde da população (COSTA, 2020).

A indústria agropecuária, com enfoque na indústria de alimentos, é um dos setores que mais geram resíduos em escala nacional e mundial pois em virtude da alta perecibilidade de alguns produtos, há a necessidade de processamentos que visam o aumento da vida útil e facilitação do transporte desses alimentos, processamentos que geram toneladas de resíduos ao ano (INFANTE *et al.*, 2013). De acordo com a Política Nacional de Resíduos Sólidos, instituída pela Lei Nº 12.305, de 2 de agosto de 2010, os resíduos são todos e quaisquer materiais, substâncias, objetos ou bens descartados resultantes de atividades humanas em sociedade, que podem estar no estado sólido, semissólido, líquido ou gasoso e sua correta administração tem como objetivo a minimização dos impactos causados à saúde humana e ao meio ambiente.

Diferente do que é estabelecido pelo senso comum, o manuseio correto dos resíduos industriais é uma responsabilidade compartilhada que envolve não somente os fabricantes, importadores, distribuidores, comerciantes e titulares dos serviços públicos, mas também os próprios consumidores. Deve-se salientar que os resíduos se diferenciam do “lixo (rejeito)”, uma vez que enquanto este último não possui nenhum tipo de valor, o outro pode apresentar valor econômico agregado, por possibilitar o reaproveitamento (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007).

Dentre os resíduos com potencial biotecnológico, podemos citar: o melaço de soja, resíduo agroindustrial proveniente do processo de beneficiamento da soja, constituído por carboidratos, proteínas e lipídios (CHAGAS *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2019); a manipueira, líquido resultante da prensagem das raízes de mandioca durante o processo de fabricação da farinha, que apresenta composição variável, mas geralmente composta por nitrogênio, sais minerais, metais e cianeto (AMORIM *et al.*, 2016; JESUS *et al.*, 2016); a milhocina (Corn Steep Liquor – CSL), que é um subproduto agroindustrial proveniente do processamento do milho, composto principalmente por carboidratos, aminoácidos, peptídeos, vitaminas, sais minerais e nitrogênio (BARROS, *et al.*, 2016); e o glicerol, que pode ser obtido através de fermentação biológica, síntese química, como subproduto na fabricação de sabão, hidrogenação da sacarose, durante a produção do bioetanol, ou como subproduto em processos de transesterificação de óleos vegetais e animais para a fabricação do

biodiesel. Neste último caso, pode-se encontrar, na solução, ácidos graxos, metanol, catalisadores, sais de potássio e sódio, metais pesados e outros materiais orgânicos (PENHA *et al.*, 2016; SANTIBÁÑEZ; VARNERO; BUSTAMANTE, 2011; SILVA; SOUZA; ANTERO, 2017).

Diversas são as possibilidades de reutilização destes materiais, como o processamento biotecnológico, que é uma alternativa ao manejo e gerenciamento adequado dos resíduos industriais. Dessa forma o aproveitamento de resíduos agroindustriais preconiza a ideia de desenvolvimento sustentável ao possibilitar que esses subprodutos possam ser reutilizados para a obtenção de uma gama de produtos valiosos como combustíveis, rações, produtos farmacêuticos ou biopolímeros com uma vasta possibilidade de aplicação em várias áreas. Ao mesmo tempo que reduz os danos ambientais causados pelo depósito inadequado, ou sem tratamento, desses subprodutos na natureza (SINGH-NEE NIGAM; PANDEY, 2009).

3.1.2 Perdas na produção agrícola

Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores de alimento no mundo e se destaca pela sua produtividade e qualidade de produção. Contudo, todos os produtores agrícolas, de pequeno a grande porte, lidam com grandes problemas referentes às perdas e desperdícios durante as etapas de pós-colheita e armazenamento (ABBADE, 2019; SANTOS *et al.*, 2020).

De acordo com a FAO (2020), aproximadamente um quarto (25%) dos alimentos produzidos anualmente para o consumo humano se perde, ou é desperdiçado, o que seria suficiente para alimentar cerca de dois bilhões de pessoas. A perda e o desperdício, embora diferentes - pois enquanto um está associado a redução não intencional de alimentos disponíveis para o consumo humano, o último trata-se do descarte intencional dos produtos alimentícios, apresentam grande impacto na sustentabilidade dos sistemas alimentares, porque reduzem a disponibilidade local e mundial de alimentos e geram menores recursos para os produtores. Além disso, tem um efeito negativo sobre o meio ambiente devido à utilização não sustentável dos recursos naturais.

Essa problemática está presente em toda a cadeia produtiva, principalmente nas etapas de pós-colheita, em atividades relacionadas ao processamento, transporte, armazenagem, embalagem e comercialização. Há muitas causas de perdas no pós-colheita, estas podem ser de origem biológica e microbiológica,

química ou física, perdas que levam os produtores a operarem com prejuízo financeiro, o que ocasiona o aumento no preço do produto para o consumidor final (GORAYEB *et al.*, 2019).

Nesse contexto, a utilização de metodologias de conservação surge como uma forma de contornar esse problema, pois buscam diminuir a taxa de deterioração dos alimentos através de ações microbianas, enzimáticas, químicas ou físicas, ao possibilitar que os alimentos permaneçam adequados para o consumo por mais tempo (PINHEIRO *et al.*, 2011).

3.2 MECANISMOS DE CONSERVAÇÃO

Diversas são as metodologias utilizadas com o intuito de reduzir as perdas e preservar a qualidade dos alimentos, como a refrigeração, o congelamento, branqueamento, pasteurização, esterilização, secagem, apertização, tindalização, desidratação, liofilização, radiação ou até mesmo o uso de conservantes químicos. Embora a utilização desses e outros métodos mostrem eficiência na preservação dos alimentos, eles podem aumentar os custos de produção como também promover a alteração de características físicas e sensoriais desses produtos (ASSIS; BRITTO, 2014; LEONARDI; AZEVEDO, 2018).

Além dessas metodologias, outro sistema de conservação comumente adotado nas indústrias alimentícias são as embalagens - materiais que buscam separar os alimentos do ambiente circundante, reduzir a exposição a fatores de deterioração (microrganismos, oxigênio e vapor de água) e evitar a perda de compostos desejáveis (substâncias voláteis que conferem odor e sabor). Elas podem ser classificadas como: a) primárias, quando estão em contato direto com o produto, b) secundárias, que promovem o agrupamento dos alimentos para facilitar a manipulação, e c) terciárias, que protegem os alimentos durante a fase de transporte (LANDIM *et al.*, 2016; OTONI *et al.*, 2017).

Diversos polímeros sintéticos são utilizados para a produção dos mais diversos tipos de embalagens, como o polipropileno, polietileno de alta ou baixa densidade (HDPE e LDPE, respectivamente) e o policloreto de vinila. No entanto, esses polímeros não são degradáveis e o descarte inapropriado podem causar efeitos deletérios ao meio ambiente, uma vez que levam, em média, 400 anos para se decompor. Uma alternativa a isso é a produção de embalagens ecossustentáveis, que são materiais confeccionados a partir de polímeros renováveis (de base biológica) e

biodegradáveis (CACCIOTTI *et al.*, 2018; INDUMATHI; SARAL SAROJINI; RAJARAJESWARI, 2019).

As propriedades físico-químicas e biológicas desses polímeros, bem como as tecnologias utilizadas para a produção das embalagens ecossustentáveis podem conferir ao material polimérico, além de características amigáveis ao meio ambiente, uma capacidade de interação ativa ou passiva. As embalagens passivas (mais comuns no mercado) são projetadas para protegerem o alimento de forma a não apresentar nem uma interação com o mesmo. As embalagens ativas são produzidas a fim de interagirem de maneira intencional com o alimento, prolongando seu tempo de vida útil de prateleira ao conferir e/ou manter características sensoriais e/ou nutricionais desejáveis (DANTAS, E. A. *et al.*, 2015; OTONI *et al.*, 2017).

3.3 EMBALAGENS BIOATIVAS

O termo “embalagem bioativa” vem sendo utilizado para referenciar as embalagens ativas que interagem de forma intencional com o alimento e são constituídas geralmente por matrizes poliméricas de origem biológica, com ou sem a presença de aditivos naturais incorporados que agreguem características desejáveis. Elas são uma tendência que surgiu em resposta à demanda por produtos naturais que causem pouco impacto ambiental, sejam seguros ao consumo humano e possam ser substitutos dos conservantes sintéticos (ALMEIDA *et al.*, 2015).

As embalagens bioativas podem ser projetadas na forma de filmes ou revestimentos comestíveis e apresentam em sua composição polímeros capazes de formar película e criar uma camada fina protetora na superfície dos alimentos sem interferir em suas propriedades organolépticas. Os requisitos de barreira desses filmes e revestimentos comestíveis dependem da sua aplicação e das propriedades do alimento a ser protegido. Quando destinado para o revestimento de frutas e vegetais frescos, por exemplo, devem ter baixa permeabilidade ao vapor de água para reduzir as taxas de dessecação, enquanto a permeabilidade ao oxigênio deve ser baixa o suficiente para retardar a respiração, mas não muito baixa para criar condições anaeróbicas favoráveis a produção de etanol e formação de sabores indesejados (OTONI *et al.*, 2017; VIANA *et al.*, 2018).

De acordo com relatos disponíveis na literatura, já foram investigadas e formuladas os mais diversos tipos de embalagens bioativas a partir de quitosana com caseína (MOREIRA *et al.*, 2011); bacteriófagos imobilizados em membranas de

celulose modificadas (LONE *et al.*, 2016); incorporação de compostos fenólicos em filmes de zeína (ARCAN; YEMENICIOĞLU, 2011); Carboximetilcelulose incorporado com extrato de grama de arroz tailandês (RODSAMRAN; SOTHORNVIT, 2018); nanopartículas de curcumina e dipalmitato de ascorbila incorporadas em filmes à base de celulose (SONKAEW; SANE; SUPPAKUL, 2012); hidroxipropilmetilcelulose contendo nanoemulsões de óleo essencial de *Thymus daenensis* (MOGHIMI; ALIAHMADI; RAFATI, 2017).

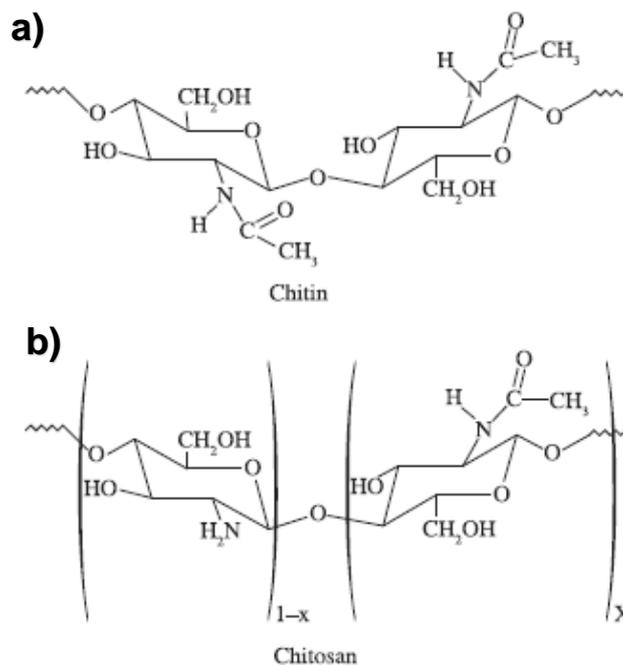
Ao analisar a fundo os trabalhos supracitados, observa-se que para formulação dessas embalagens, os polímeros utilizados devem ser biocompatíveis e apresentar algumas propriedades físicas, químicas e biológicas de acordo com a sua proposta de utilização. Dentre esses polímeros a quitosana tem demonstrado um potencial promissor, pois além de ser biodegradável, possui ação antioxidante e antimicrobiana, não toxicidade, facilidade para formação de filmes e associação com outros compostos (INDUMATHI; SARAL SAROJINI; RAJARAJESWARI, 2019).

3.4 A QUITOSANA

A quitosana é um biopolímero composto por cadeias de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina ligadas por meio de ligações $\beta \rightarrow (1-4)$ dispostas randomicamente (Figura 1B), o que a torna insolúvel em água e meio básico e solúvel em soluções ácidas. Principal constituinte do exoesqueleto de crustáceos e insetos, rádula de moluscos e parede celular de alguns fungos, a quitosana é um dos polissacarídeos mais utilizados nos estudos envolvendo o preparo de soluções poliméricas (ABDUL KHALIL *et al.*, 2016; ISLAM, S.; BHUIYAN; ISLAM, M. N., 2017).

A nível comercial, este polímero é obtido principalmente a partir da desacetilação química da quitina (Figura 1a) presente no exoesqueleto de crustáceos e embora seu rendimento possa ser de 2 a 3 vezes maior que a obtenção da quitosana fúngica (QF), apresenta alguns entraves: como a dependência de fatores sazonais, o que dificulta a padronização do produto; necessidade de utilização de grande quantidade de compostos químicos, o que provoca a oneração do processo e geração de resíduos; e, quando utilizado na área alimentícia, a alergenicidade, que se dá em virtude da presença de proteínas contaminantes que se acumulam de forma residual na molécula de quitosana devido à problemas durante as etapas de purificação (GHORMADE; PATHAN; DESHPANDE, 2017; MATI-BAOUCHE *et al.*, 2014; STAMFORD *et al.*, 2007).

Figura 1: Representação esquemática da estrutura química da quitina (a) e da quitosana (b)



Fonte: (GOY; BRITTO; ASSIS, 2009).

A obtenção da quitosana a partir da biomassa fúngica consiste em um processo controlado que permite a extração simultânea de quitina e quitosana. Apresenta como vantagens a obtenção do polímero sem a presença de contaminantes, principalmente de proteínas responsáveis pelas respostas alergênicas, homogeneidade das propriedades físico-químicas e rendimento otimizado, pois o processo de extração é simples e barato e não está sujeito a interferência de fatores sazonais (AMORIM *et al.*, 2001; FRANCO *et al.*, 2004; NIEDERHOFER; MÜLLER, 2004; STAMFORD *et al.*, 2007).

A bioatividade da quitosana, como por exemplo sua ação antimicrobiana, depende significativamente do seu peso molecular (PM), do grau de desacetilação (GD) e da distribuição e conformação do grupo acetil em sua cadeia polimérica, parâmetros estes facilmente controlados quando se obtém a quitosana a partir da biomassa fúngica. Devido a esta e outras propriedades como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, ação antioxidante, capacidade de formar película e facilidade de interação com outros compostos, a quitosana apresenta um potencial de utilização como embalagens bioativas destinadas à indústria alimentícia, pois sua aplicação

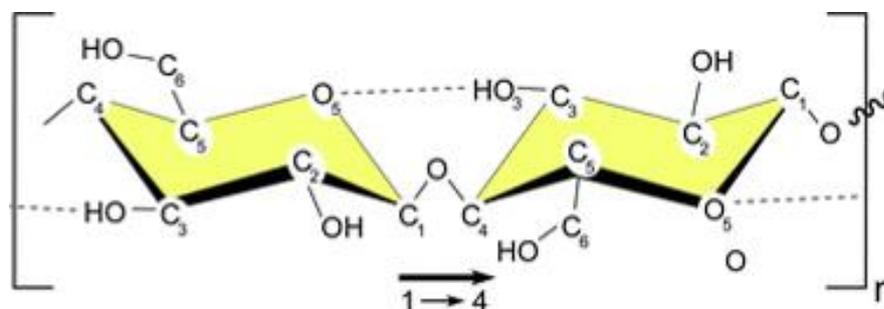
pode contribuir com a diminuição do uso de conservantes químicos e na oferta de alimentos mais saudáveis (BAUMANN; FAUST, 2001; FAI *et al.*, 2008; KHOR, 2002).

Embora a quitosana apresente inúmeras propriedades interessantes à produção de embalagens bioativas, os filmes formados a partir desses polímeros apresentam propriedades mecânicas insuficientes, parâmetro que pode ser modificado através da sua associação com outros compostos. Dentre os materiais já relatados que são capazes de interagir com a quitosana, a celulose tem se destacado pois estes polímeros possuem uma estrutura similar. Esta similaridade em estruturas primárias sugere que as estruturas secundárias e os padrões de agregação também podem ser suficientemente semelhantes para facilitar a formação de misturas homogêneas desses dois compostos e formar um material com propriedades mecânicas melhoradas (ABDUL KHALIL *et al.*, 2016; ISOGAI; ATALLA, 1992; WU *et al.*, 2004).

3.5 A CELULOSE

A celulose é um homopolímero linear formado por unidades de repetição (Figura 2) compostas de dois anéis de anidroglicose ($C_6H_{10}O_5$)_n, onde n é dependente do material da fonte de celulose) ligados entre si através de ligações glicosídicas do tipo β-1,4. Encontrado com abundância na natureza, a celulose é o polissacarídeo responsável por mais da metade do carbono orgânico total na biosfera da terra (HU, S. Q. *et al.*, 2010; MOON *et al.*, 2011; MOREAU *et al.*, 2016).

Figura 2: A unidade de repetição da celulose (celbiose)



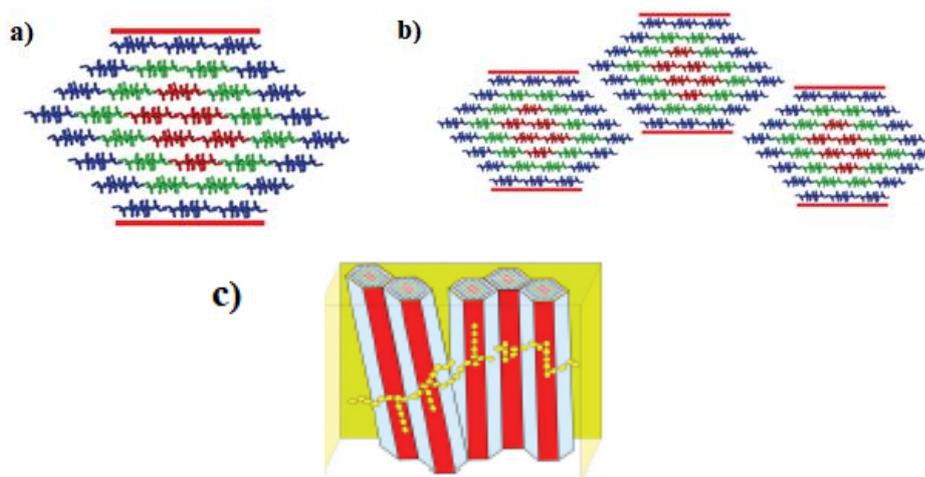
Fonte: (MOON *et al.*, 2011)

A linearidade da cadeia de celulose deve-se a ligação de hidrogênio intracadeia entre a hidroxila de uma molécula e o oxigênio de moléculas adjacentes. Além disso, as pontes de hidrogênio intermoleculares conferem estabilidade e rigidez axial a este

polímero ao promover o empilhamento paralelo de múltiplas cadeias de celobiose e a formação de fibrilas elementares (Figura 3a) que se agregam em microfibrilas (Figura 3b) e, posteriormente, em fibrilas macroscópicas maiores (Figura 3c) (DING; ZHAO; ZENG, Y., 2014; MOON *et al.*, 2011).

A fonte natural de maior exploração da celulose é a madeira ou algumas plantas superiores. Contudo, existem uma variedade de organismos, incluindo musgos, algas, tunicados e algumas bactérias como as do gênero *Acetobacter* (ou *Gluconacetobacter*), doravante denominado de *Komagataeibacter*, que sintetizam esse biopolímero com diferenças morfológicas (EICHHORN *et al.*, 2010; SALVI, DE *et al.*, 2014; VOLOVA *et al.*, 2018).

Figura 3: Modelo esquémico de uma a) fibrila elementar de celulose (CEF) de trinta e seis (36) cadeias; b) microfibrila contendo três (03) CEF; e c) macrofibrilas



Fonte: (DING; ZHAO; ZENG, Y., 2014)

A fórmula molecular da celulose de origem bacteriana é idêntica à da celulose de fontes vegetais. No entanto, apresenta uma variação nas propriedades mecânicas, físicas e químicas devido a uma divergência na organização das cadeias e no diâmetro das microfibrilas. Isto confere a celulose bacteriana (CB) uma alta resistência à tração, maior flexibilidade, porosidade, cristalinidade e grau de polimerização, capacidade de retenção de água e pronunciada permeabilidade a gases e líquidos. Além disso, a CB possui um alto grau de pureza, pois não contém lignina, hemicelulose e outros constituintes lignocelulósicos, é biodegradável e possui grande compatibilidade com os tecidos vivos (CHEN *et al.*, 2016; SULAEVA *et al.*, 2015; VOLOVA *et al.*, 2018).

Industrialmente, a celulose é utilizada para produção de papel, porém, nos últimos anos, diversos relatos foram realizados em que descrevem a potencialidade da utilização da celulose de origem bacteriana na engenharia de tecidos (STUMPF *et al.*, 2018), na biomedicina (RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015), na fabricação de compósitos eletrocondutores (CHEN *et al.*, 2016) ou na fabricação de embalagens bioativas para a indústria de alimentos (DOBRE *et al.*, 2012), entre outras aplicações biotecnológicas (CACICEDO *et al.*, 2016).

As aplicações da celulose na indústria são ampliadas através das divergências nas propriedades físico-químicas e mecânicas da CB, divergências que podem ser obtidas por meio da associação deste biopolímero com outros compostos, através da variação nas condições de cultivo (fontes de nutrientes, agitação, tempo de incubação, pH e temperatura), alterações químicas e microrganismo utilizado para sua obtenção (CACICEDO *et al.*, 2016; RUKA; SIMON; DEAN, 2012).

3.6 BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CELULOSE

Diversos microrganismos possuem a capacidade de sintetizar a celulose, como a *Rhizobium leguminosarum*, *Burkholderia spp.*, *Pseudomonas putida*, *Dickeya dadantii*, *Erwinia chrysanthemi*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* (GULLO *et al.*, 2018) e algumas bactérias do ácido acético (AAB) como a *Komagataeibacter hansenii* (anteriormente denominada de *Gluconacetobacter xylinus* e *Acetobacter xylinus*) (YAMADA *et al.*, 2012). Entre os microrganismos relatados, a *Komagataeibacter hansenii* tem demonstrado ser a espécie mais eficiente para a produção de celulose, uma vez que ela é capaz de utilizar uma variedade de fontes de carbono para produzir CB em culturas líquidas (RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015).

K. hansenii é um microrganismo não patogênico em forma de bastonete, gram-negativo, mesofílico, aeróbico e de catalise positiva (LAVASANI *et al.*, 2017) que realiza a síntese de celulose de forma quimicamente pura, através da oxidação incompleta de diversos açúcares e álcoois. Esse polímero é fundamental para a bactéria, pois funciona como um mecanismo de flotação, permitindo que o microrganismo permaneça numa interface ar/líquido para obter oxigênio com maior facilidade para o seu crescimento e prevenir a desidratação do substrato, devido seu caráter higroscópico (MIKKELSEN *et al.*, 2009; ZHONG *et al.*, 2013).

A biossíntese da CB depende de duas vias anfibólicas importantes, a via das pentoses, onde ocorre a oxidação dos carboidratos e o ciclo de Krebs, onde ocorre a oxidação dos ácidos orgânicos. A síntese da celulose é sustentada diretamente pela fosforilação de hexoses exógenas e indiretamente pela via das pentoses e gliconeogênese, resultando em um pool metabólico de hexose fosfato, cuja conversão em celulose é direta, não dependendo de clivagens intermediárias dos esqueletos carbônicos (DONINI *et al.*, 2010).

Independente da rota metabólica a ser tomada pela *K. hansenii*, baseando-se na fonte de carbono a ser utilizada, há um ponto em comum que é a produção de UDP-Glicose catalisada pela enzima UDPG-pirofosforilase, que será convertida, posteriormente, em celulose pela atuação da enzima celulose sintase. No entanto, a síntese desse polímero constitui um processo oneroso para a célula, chegando a consumir cerca de 10% do ATP gerado no metabolismo bacteriano, o que resulta na necessidade de um metabolismo aeróbio (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; ZHONG *et al.*, 2013).

Além da fonte de carbono e a necessidade de oxigênio, outros fatores influenciam diretamente no metabolismo deste microrganismo e na síntese da celulose, como o pH do meio, condições de cultivo (estático ou sob agitação), disponibilidade de nitrogênio, bem como a profundidade e área superficial de contato (RUKA; SIMON; DEAN, 2012). Embora o meio HS (Hestrin Schramm) consiga suprir a demanda de nutrientes requeridas pelo microrganismo para sintetizar celulose com eficiência, o custo relativamente elevado deste pode limitar a produção industrial, uma vez que o meio de cultura é responsável por mais de 65% do custo total de produção da CB. Uma alternativa à resolução desta problemática é a utilização de meios de cultura a partir de resíduos industriais, metodologia que poderia baratear o processo, viabilizar a produção em escala industrial, além de contribuir para a preservação do meio ambiente (DONINI *et al.*, 2010; HONG *et al.*, 2012; JOZALA *et al.*, 2015).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para execução deste trabalho dividiu-se a metodologia em quatro etapas distintas: I) caracterização dos resíduos industriais; II) produção da celulose bacteriana; III) preparo das embalagens bioativas (EB); IV) caracterização físico-química e antifúngica dos materiais.

A milhocina e o glicerol (resíduos industriais) foram cedidos pela Ingredion e pelo Departamento de Energia Nuclear (DEN) da UFPE, respectivamente, ambas localizadas na cidade de Recife-PE. A quitosana fúngica, extraída de *Aspergillus niger* não modificado geneticamente e não produtor de micotoxinas, foi doada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LaMAp) coordenado pela prof^a Thayza Stamford.

A bactéria *Komagataeibacter hansenii* (ATCC 23769) e os fungos *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*, *Citeromyces siamensis*, foram obtidos do banco de cultura do LaMTESA – UFRPE (Laboratório de Medicamentos, Tecnologias, Energias e Soluções Ambientais) e do LEAAL – UFPE (Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos Nonete Barbosa Guerra).

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS INDUSTRIAIS

Os resíduos, milhocina e glicerol, foram caracterizados com o intuito de investigar as suas composições e nortear a formulação dos meios de cultura. Inicialmente ambos foram filtrados e armazenados a uma temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$, até posterior utilização.

4.1.1 pH

O potencial hidrogeniônico (pH) é uma escala numérica utilizada para especificar o caráter ácido ou básico de uma solução aquosa e se baseia na determinação da concentração de íons de hidrogênio (H^+). Essa variável foi obtida através de um medidor de pH de bancada da Simpla modelo PH140.

4.1.2 Umidade

A umidade corresponde à perda, em peso, sofrida por um material quando aquecido em condições nas quais a água é removida. Além da água, também é removido outras substâncias voláteis. Esse teste foi realizado em duplicata com

amostras de 10g, essas foram secas em estufa à 105 °C por 3 horas e resfriado em um dessecador. Essa operação foi repetida até obtenção de peso constante e o resultado obtido através da Eq. 1 (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008).

$$U_{\%} = \frac{100 - P_m}{m_a} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde, U%= Umidade ou substâncias voláteis a 105 °C (%); P_m= Massa perdida após aquecimento (g); m_a= massa da amostra (g).

4.1.3 Cinzas

O teor de cinzas representa a massa residual obtida por aquecimento de um material em temperatura elevada (550~570 °C) e representa a quantidade de material inorgânico presente na amostra, embora alguns sais possam sofrer redução ou volatilização durante o aquecimento (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008).

Para este ensaio (realizado em duplicata), pesou-se 10g das amostras (glicerol e milhocina) em cadinhos previamente secos (a 550 °C) e pesados. O material foi então aquecido a 100°C por 1 hora em banho maria, seguido da incineração em uma mufla a 560 ±10°C até eliminação completa do carvão. As amostras foram então pesadas e o teor de cinzas determinado a partir da Eq. 2.

$$TC = \frac{100x(m_t - m_c)}{m_a} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde, TC = Teor de cinzas (%); m_t=massa total após secagem (g); m_c=massa do cadinho (g); m_a=massa da amostra (g).

4.1.4 °Brix

O índice de refração (°Brix) consiste de uma escala numérica que mede a quantidade de sólidos solúveis totais em uma solução aquosa. Este ensaio foi realizado em triplicata através de um refratômetro analógico modelo RHB0-90 da Akso.

4.1.5 Açúcares totais e redutores

Os açúcares totais (AT) foram avaliados através da técnica fenol-sulfúrico, que se baseia na determinação de açúcares simples, polissacarídeos e seus derivados,

após desidratação com ácido sulfúrico e complexação com o fenol, por espectrofotometria (SILVA *et al.*, 2003).

Foi utilizado uma solução padrão de glicose com concentração de 1 mg/ml e diluições com concentrações finais que variaram de 0,01 a 0,2 mg/ml para plotagem da curva de calibração (ensaio realizado em duplicata). Inicialmente, 1ml de cada amostra foi disposta em tubos de ensaio seguido da adição de 0,5 ml de fenol a 5% e 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram deixados em repouso por 10 minutos, agitados, colocados em banho maria à uma temperatura de 25°C por 20 minutos e submetidos a espectrofotometria com comprimento de onda de 490 cm⁻¹ (DUBOIS *et al.*, 1956).

Os açúcares redutores (AR) foram determinados pelo método DNS (ensaio realizado em duplicata), que consiste em uma reação colorimétrica por meio da oxidação com o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Para construção da curva de calibração se utilizou uma solução padrão de glicose (1mg/ml) com concentrações que variaram de 0,1 a 0,3 mg/ml (SILVA *et al.*, 2003; XIAO *et al.*, 2012)

A solução reagente DNS foi preparada de acordo com as indicações de Miller (1959), com concentrações finais de: ácido 3,5-dinitrosalicílico 1%, sal de Rochelle 40%, fenol 0,2%, dissulfeto de potássio 0,5%, em uma solução de hidróxido de sódio 1,5%. Foram adicionados, em tubos de ensaio, 1,5 ml da solução reagente mais 1,5 ml de cada amostra, agitadas e colocadas em banho maria a 100°C, por 15 minutos. Em seguida, os tubos foram esfriados em banho maria a 25°C e as amostras submetidas a espectrofotometria com comprimento de onda de 540nm.

4.1.6 Proteínas totais

O teor e proteínas foi determinado pelo método de Kjeldahl, que consiste na quantificação da matéria nitrogenada total de uma amostra através do deslocamento do nitrogênio presente no material para um sal amoniacal (sulfato de amônio) por meio da digestão ácida.

Nesse procedimento, 1g de milhocina (CSL) foi pesado e transferido para um balão de Kjeldahl, seguido da adição de 25 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) e 6g de uma mistura contendo dióxido de titânio anidro, sulfato de cobre anidro e sulfato de potássio anidro, na proporção 0,3:0,3:6. As amostras foram então aquecidas a 500°C por 90 minutos, esfriadas até temperatura ambiente, transferidas para um frasco de destilação, adicionado 10 gotas de fenolftaleína e 1g de zinco. Em seguida, se deu

início ao processo de destilação com a saída do gás mergulhada em uma solução de ácido sulfúrico 0,05M contendo 3 gotas do indicador vermelho de metila, e titulando uma solução de hidróxido de sódio a 30%, no frasco da amostra, até se obter um ligeiro excesso de base, o processo se manteve até a obtenção de 250 mL do destilado. Por fim, o excesso de ácido sulfúrico 0,05M foi titulado com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M, usando vermelho de metila e a quantidade de proteínas determinada através da Eq. 3 (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008).

$$P_{\%} = \frac{V \cdot 0,14 \cdot f}{m} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde, P% = Teor de proteínas (%); V= diferença entre volume de ácido sulfúrico 0,05 M e o volume de hidróxido de sódio 0,1 M gastos na titulação (mL); f= fator de conversão, que está relacionado ao tipo de amostra (6,25).

4.1.7 Matéria orgânica não glicerínica (MONG)

Neste procedimento, realizado em quadruplicata, 10 mL de glicerol residual foram colocados em tubos falcon e tiveram o pH ajustado para 2 com uma solução de HCl (1:1). Os tubos foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos, seguido da separação de fases, uma vez que a matéria orgânica não glicerínica é menos densa que o glicerol. A %MONG foi determinada através da Eq.4.

$$MONG\% = \frac{V_i - V_f}{V_i} \cdot 100 \quad (\text{Eq.4})$$

Onde, Vi = Volume inicial da amostra (mL); Vf = Volume final da amostra (mL)

4.1.8 Quantificação de glicerol

A estimativa da quantidade de glicerol na amostra residual foi determinada através de uma estimativa com base nas análises anteriormente descritas (Teor de cinzas e umidade) por meio da Eq 5.

$$T_G = 100 - (T_C + U\%) \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde, TG= Teor aproximado de glicerol (%); TC= Teor de cinzas (%); U% = Umidade, ou substâncias voláteis a 105°C.

Essa equação permite identificar, indiretamente, a concentração aproximada de glicerol na amostra residual por meio da inclusão/exclusão dessa substância nas análises descritas nos tópicos 4.1.2 e 4.1.3, se baseando na temperatura de ebulição dos compostos envolvidos.

4.2 A CELULOSE BACTERIANA

4.2.1 Cepa

O microrganismo utilizado para a produção de celulose foi a bactéria *Komagataeibacter hansenii* (ATCC 23769). A estirpe foi ativada e mantida de acordo com as indicações da American Type Culture Collection (ATCC, 2018), utilizando-se um meio de caldo-manitol, composto por 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g.L⁻¹ de peptona e 25 g.L⁻¹ de manitol e incubação por 48h a 29 ±1°C. A manutenção da cepa foi realizada em ágar-manitol (mesma composição do meio anterior acrescido de 15 g.L⁻¹ de ágar bacteriológico), com incubação por 72h a 29 ±1°C e armazenamento a uma temperatura de 6 ± 2 °C até posterior utilização, repetindo-se este procedimento a cada 20 dias.

4.2.2 Preparo do inóculo: *Komagataeibacter hansenii*

Para preparação dos inóculos utilizou-se um meio composto por 30 g.L⁻¹ de glicerol, 16 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 4 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄.12H₂O e 3,5 g.L⁻¹ de ácido succínico (LINS *et al.*, 2019). Inicialmente retirou-se a membrana armazenada no meio ágar-manitol, sendo a mesma ressuspendida em meio caldo-manitol por 48h a 26°C para ativação da cepa. Posteriormente, uma alíquota (1:10 v/v) foi transferida para o meio Glicerol e incubado novamente por 72h a 29 ± 1°C.

4.2.3 Meios de cultura

Foram investigados a utilização de seis (06) meios de cultura na produção de celulose bacteriana (CB): i) Gpa – Meio glicerol padrão, utilizando o glicerol comercial; ii) MP - Milhocina pura; iii) MC - Milhocina composta; iv) GP - Glicerol resíduo puro; v) GC - Glicerol resíduo composto; vi) e GM – Glicerol resíduo com milhocina, conforme apresentado na Tabela 1.

Os resíduos (Glicerol e milhocina) foram filtrados para remoção de contaminações visíveis e utilizados em sua composição original, com o intuito de baratear os meios de cultivo para viabilização da produção de celulose bacteriana. O pH dos meios foi ajustado para 6,0 com HCl ou NaOH (1M) e autoclavados a 121 °C por 20 minutos.

Tabela 1: Composição dos meios de cultura (g/L)

Composição (g/L)	Meio de cultura					
	Gpa	MP	MC	GP	GC	GM
Glicerol pa	30	-	-	-	-	-
Glicerol (resíduo)	-	-	-	30	30	30
Milhocina (resíduo)	-	30	30	-	-	30
Extrato de levedura	16	-	16	-	16	-
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	4	-	4	-	4	-
Ácido Succinico	3,5	-	3,5	-	3,5	-

Gpa – Meio glicerol padrão, utilizando o glicerol comercial; MP - Milhocina pura; MC - Milhocina composta; GP - Glicerol resíduo puro; GC - Glicerol resíduo composto; e GM – Glicerol resíduo com milhocina Fonte: Autor (2021)

4.2.4 Estudo da produção de CB

Para a produção da CB, utilizou-se frascos de vidro de 500 mL contendo 100 mL dos respectivos meios de cultura, com relação de área superficial/volume equivalente a 0,8 cm⁻¹. Os meios foram inoculados (1:10 v/v) e incubados a 29 ± 1 °C em condições estáticas.

Para purificação das membranas de celulose, essas foram coletadas dos respectivos meios, submersas em uma solução de NaOH 0,1M a 80°C, por 30 minutos e lavadas com água destilada. Este procedimento foi repetido até obtenção de uma membrana de coloração homogênea (esbranquiçada). Em seguida, as membranas foram lavadas novamente com água destilada para sua neutralização, até obtenção de um pH 7,0.

Durante esses procedimentos, em um ensaio preliminar, foi avaliado a produção de massa úmida (g/L), após 7 dias de incubação, para identificar os meios mais eficientes para um estudo mais detalhado. Este ensaio consistiu da coleta das membranas de celulose, purificação, neutralização, retirada do excesso de água com um papel filtro e pesagem.

Após identificação dos meios mais produtivos, esses foram avaliados quanto ao crescimento bacteriano, por contagem em câmara de Neubauer, nos intervalos de

1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias. Além disso, verificou-se o pH do meio e a produção de massa seca (g/L), nos intervalos de 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias. Antes da pesagem, as membranas de celulose foram secas em estufa a 40°C até obtenção de peso constante.

4.3 EMBALAGENS BIOATIVAS (EB)

As embalagens bioativas foram preparadas através da mistura de uma solução de carboximetilcelulose (CMC) e quitosana fúngica na proporção 1:1 (m/m). A CMC (1%) foi solubilizada em água MiliQ e a QF (1%), de baixo peso molecular, em uma solução de ácido cítrico 4%.

4.4 CARACTERIZAÇÕES

4.4.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR foi realizado para determinar os grupos funcionais presente nas membranas de celulose obtidas a partir dos diferentes meios de cultura, através de um espectrômetro, à temperatura ambiente, com faixa de varredura de 4000 a 600 cm^{-1} .

4.4.2 Ação antimicrobiana

A ação antimicrobiana foi avaliada através da determinação do índice de viabilidade celular pela técnica de microdiluição em caldo sabouraud em placas de 96 poços, distribuídos em colunas enumeradas de 1 a 12 e linhas em letras de "A" a "H". Os microrganismos avaliados foram os fungos *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer* e *Citeromyces siamensis* (ALVES *et al.*, 2008).

O ensaio foi realizado em duplicata (2 colunas por microrganismo), com concentrações das soluções testes (CMC, quitosana fúngica, Embalagem bioativa) que variaram de 0 (controle negativo) a 8 mg/ml (Controle positivo) distribuídos nos poços de A a H. Cada orifício recebeu o inóculo (20 μ l), o meio de cultura e as soluções testes, de forma a completarem um volume final de 100 μ l, Conforme apresentado na Tabela 2.

A placa foi lida em um leitor de microplacas com comprimento de onda de 550 nm antes da incubação, para determinação da densidade ótica (DO) do material e posterior ajuste dos valores de referência, e nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas.

Tabela 2: Distribuição das soluções na placa de 96 poços

Linhas	Meio (μl)	ST (μl)	[ST] (mg/ml)	Inócuo (μl)
A	20	60	6	
B	30	50	5	
C	40	40	4	
D	50	30	3	
E	60	20	2	20
F	70	10	1	
G	0	80	8	
H	80	0	0	

ST – Substância teste (Embalagem de quitosana/celulose) Fonte: Autor (2021)

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS INDUSTRIAIS

A Tabela 3 apresenta os dados referentes às análises de pH, Brix^o, proteínas totais, açúcares totais (AT) e redutores (AR).

Tabela 3: Parâmetros glicídicos e protéicos dos resíduos (milhocina e glicerol)

Amostra	pH	Brix ^o	AT (mg/ml)	AR (mg/ml)	Proteínas totais (%)
Glicerol (PA)	5,53	-	-	-	-
Glicerol (Res)	9,46	-	-	-	-
Milhocina (Res)	4,17	47,3	115,74	12,36	27,63 ± 0,03

pH – Potencial hidrogeniônico; Brix^o - Sólidos solúveis totais; AT – Açúcares totais; AR – Açúcares redutores; PA – Glicerol comercial; Res – Resíduo. Fonte: Autor (2021)

Observa-se uma diferença no pH do glicerol comercial para o glicerol residual oriundo da produção de biodiesel, isso acontece pois neste último há a presença de substâncias contaminantes como ácidos graxos, metanol, sais de potássio e sódio, metais pesados e outros materiais orgânicos que interferem diretamente na variação do pH (BARROS *et al.*, 2015)

O índice de refração (^oBrix) que mede a concentração de sólidos solúveis totais foi determinado para a milhocina (47,3^oBrix), uma vez que este resíduo é rico em carboidratos solúveis, sais minerais e aminoácidos essenciais para o desenvolvimento de vários microrganismos. Resultados semelhantes foram reportados por Montes e Raga (2006).

A nível de comparação, o melaço de cana de açúcar, um dos resíduos mais relatados na literatura devido ao seu potencial de utilização como fonte de carbono em processos fermentativos para a obtenção dos mais diversos produtos – etanol (OLIVEIRA *et al.*, 2019) e ácido láctico (VARGAS *et al.*, 2017) por exemplo, apresenta um índice de refração que pode variar entre 60 à 85 ^oBrix (valores inferiores ou superiores podem ser encontrados), valores que indicam o potencial de utilização desses em processos fermentativos, uma vez que a escala ^oBrix avalia indiretamente a quantidade de açúcares presentes em solução.

De acordo com os relatos de Xiao e colaboradores (2012), que avaliaram a composição, e outros parâmetros, de diversas amostras de milhocina (CSL), como a

quantificação de açúcares totais (AT) e redutores (AR), observa-se que não há uma homogeneidade nos resultados encontrados, pois, por se tratar de um resíduo industrial, a milhocina apresenta uma composição variável que está diretamente ligada à origem/qualidade do milho e a seu processamento (NASCIMENTO, J. C. Dos S. *et al.*, 2019). Nesse contexto, os valores reportados aqui para a quantificação dos AT (115,74 mg/ml) e AR (12,36 mg/ml), se mostram satisfatórios em comparação ao relato anterior. Por outro lado, para a formulação de meios de cultura, além da oferta de carbono, quer seja na forma de carboidratos complexos, açúcares simples, ou outros compostos, é necessário, também, uma demanda adequada de nitrogênio de acordo com as exigências metabólicas de cada microrganismo (PINOTTI *et al.*, 2006).

Utilizado principalmente para a síntese proteica, síntese enzimática e de ácidos nucléicos, o nitrogênio é um macronutriente necessário a todos os (micro)organismos e pode ser proveniente das mais diversas fontes, sejam elas inorgânicas (nitrato de amônio, nitrato de sódio, sulfato de amônio, cloreto de amônio), orgânicas (aminoácidos, proteínas, peptona) ou de extratos complexos (extrato de levedura, malte, resíduos industriais) (ALBERTS *et al.*, 2017).

Nos estudos do metabolismo microbiano em pequena/média escala, embora a utilização de fontes comerciais de nitrogênio como o nitrato de sódio, glutamato, extrato de levedura e peptona sejam os mais empregados, a nível comercial (larga escala) torna-se inviável devido ao alto valor desses compostos (ASSAWAMONGKHOLSIRI; REUNGSANG; SITTIJUNDA, 2019; ORAK *et al.*, 2018; SACHDEVA *et al.*, 2018). Uma solução a esse problema é a utilização de fontes alternativas de nitrogênio, de baixo custo, como a milhocina – subproduto da indústria de beneficiamento do milho rico em nitrogênio orgânico (proteínas) (AFONSO *et al.*, 2020).

De acordo com alguns trabalhos reportados anteriormente, a concentração de proteínas totais nesse subproduto (CSL) pode variar de 18 até cerca de 46% (AKHTAR *et al.*, 1997; BARROS *et al.*, 2016; LAWFORDE; ROUSSEAU, 1997; SILVEIRA *et al.*, 2001) que, nesse trabalho, verificou-se uma concentração total de 27,63%, evidência que confirma o potencial de utilização desse resíduo como fonte alternativa de nitrogênio para a formulação de meios de cultura de baixo custo.

Paralelamente, na análise do glicerol residual, os teores de matéria orgânica não glicerínica (MONG) encontrados neste trabalho ($20,5 \pm 0,05$), conforme apresentado na Tabela 4, entram em consonância com os dados disponíveis na

literatura sobre a composição do glicerol bruto, entretanto, há uma divergência no percentual isolado de cada substância (HU *et al.*, 2012). Isso ocorre porque no glicerol residual oriundo da produção de Biodiesel há a presença de diversos contaminantes, com proporções variáveis, que mudam de acordo com a qualidade dos processos utilizados para a produção do biodiesel, bem como com a matriz vegetal utilizada. Esses contaminantes podem ser compostos inorgânicos, como sais e metais pesados, ou orgânicos (MONG), como alguns catalisadores, álcoois (etanol ou metanol), ácidos graxos, óleo residual, ésteres e sabões (MOTA *et al.*, 2010).

Tabela 4: Composição dos resíduos (milhocina e glicerol)

Amostra	TC (%)	Umidade (%)	Glicerol (%)	MONG (%)
Glicerol (res)	4,57 ± 0,015	42,17 ± 0,2	53,26	20,5 ± 0,05
Milhocina	7,06 ± 0,015	56,36	-	-

TC – Teor de cinzas; MONG - Matéria orgânica não glicerínica. Fonte: Autor (2021)

A presença de contaminantes, sejam eles orgânicos ou inorgânicos, é algo inerente quando o material se trata de um subproduto industrial. A milhocina e o glicerol utilizados neste trabalho, por exemplo, apresentaram um teor de cinzas de 7,06 e 4,57%, respectivamente, esses valores indicam indiretamente a quantidade de resíduos inorgânicos ou minerais, como sódio, potássio, magnésio, cálcio, ferro, fósforo, cobre, cloreto, alumínio, zinco, manganês entre outros compostos minerais. (KRUMREICH *et al.*, 2013; LOPES *et al.*, 2014). Além disso, se observou que os teores de umidade, a 105°C, desses resíduos foram de 56,36 e 42,17%, respectivamente, o que representa a quantidade de água e de matéria orgânica volátil, corroborando com a afirmação de Barros (2012), ao constatar que o teor de umidade médio dos resíduos sólidos no Brasil pode ultrapassar os 30%.

Ao se conhecer a quantidade de substâncias voláteis a 105°C, expressas pelo teor de umidade e a quantidade de material inorgânico, expresso pelo teor de cinzas (560 ±10°C), pode-se estimar, no caso da glicerina residual, a quantidade aproximada de glicerol presente na amostra, uma vez que esse composto apresenta uma temperatura de ebulição de 290°C. Nesse contexto, verificou que a glicerina residual utilizada nesse trabalho pode conter até 53,26% de glicerol, sendo então classificada como glicerina bruta. A glicerina bruta, oriunda da transesterificação de triglicerídeos com álcool, apresenta teores de glicerol que podem variar de 45 a 85%, juntamente com a presença de outros compostos como o álcool (etílico ou metílico), água, sais

inorgânicos, ácidos graxos livres, mono-, di-, triglicerídeos, outras matérias orgânicas e outros resíduos em diferentes quantidades (ALVES; FILHO; MENDES, 2017).

Muitos processos têm sido desenvolvidos para purificação e refino do glicerol bruto, como a destilação, filtração por membrana, troca iônica, extração química, adsorção, entre outros. Porém, considera-se inviável a aplicação desses processos em pequenas e médias produções devido às restrições financeiras e a alta demanda energética (SHEN *et al.*, 2009). Nesse contexto, uma das possibilidades de reaproveitamento desse resíduo refere-se a sua utilização com o mínimo de tratamento possível, como na formulação de meios de cultura para fermentação microbiana, uma vez que diversas cepas possuem a capacidade de metabolizar esse composto e gerar produtos de valor agregado (ALVES; FILHO; MENDES, 2017; MURARKA *et al.*, 2008).

5.2 PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERINA

5.2.1 Ensaio preliminar

A produção de celulose bacterina pela *Komagataeibacte hansenii* (ATCC 23769) em 6 meios de cultura foi investigada e os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Produção de celulose bacteriana em diferentes meios de cultura

	Massa úmida (g/L)
Gpa	54,67 ± 1,53
MP	13 ± 2
MC	8,25 ± 0,15
GP	0
GC	54,33 ± 6,03
GM	64,67 ± 1,9

Gpa – Meio com glicerol comercial; MP – Milhocina pura; MC – Milhocina composta; GP – Glicerol residual puro; GC- Glicerol residual composto; GM – Glicerol/milhocina. Fonte: Autor (2021)

Os resíduos utilizados neste trabalho, Glicerol e Milhocina, quando utilizados separadamente como meios de cultivo, não apresentaram uma produção significativa (0 e 13±2, respectivamente), fato que pode estar associado a presença ou ausência de substâncias que inibiram o crescimento celular. Essa inibição pode estar

relacionada tanto a ausência de alguns micronutrientes, quanto à disponibilidade excessiva de fontes de carbono e deficiência de fontes de nitrogênio no caso do glicerol e o inverso dessa afirmação no caso da milhocina (CARVALHO, R. V. *et al.*, 2008; CUTRIM *et al.*, 2006; RUSSELL, 1998; TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, 2017).

Esse relato é confirmado ao analisar a produção em um meio de cultura alternativo, Glicerol-Milhocina (GM), que apresentou uma produção de massa úmida (g/L) equivalente a $64,67 \pm 1,9$. Produção que superou o meio padrão contendo glicerol comercial (Gpa) e glicerol residual (GC), com $54,67 \pm 1,53$ e $54,33 \pm 6,03$, respectivamente. Como a produção de celulose utilizando o meio padrão contendo o glicerol comercial (Gpa) ou glicerol residual (GC) não apresentou diferença significativa, se procedeu com o estudo detalhado apenas dos meios Gpa e GM.

5.2.2 Potencial hidrogeniônico (pH)

Durante seu processo metabólico, a *Komagataeibacter hansenii*, além de produzir celulose bacteriana, sintetiza outras substâncias, como o ácido glucônico, que alteram o pH do meio de cultivo e podem resultar na redução ou no aumento da produção de CB, em virtude disso, a utilização de substratos com propriedades tampão se torna uma alternativa para o aumento da produtividade de celulose, pois mantem a faixa ótima de pH entre 5 e 6. (SOUZA, S. S. De; CASTRO, J. De V.; PORTO, L. M., 2018).

Conforme apresentado na Figura 4, o meio (GM) contendo glicerol residual e milhocina (CSL), apresentou uma maior estabilidade na manutenção do pH inicial em relação ao meio Gpa, isso se dá em virtude da presença da CSL na solução, pois, de acordo com o estudos de Noro e colaboradores (2004), onde verificaram o potencial de utilização do CSL como tampão para manutenção da faixa de pH ótimo do meio reacional, a presença de proteínas, peptídeos e aminoácidos, em quantidades consideráveis, pode fortalecer a capacidade de tamponamento do meio e contribuir para o aumento da produtividade de celulose bacteriana.

Figura 4: Comportamento do pH dos meios de cultivo



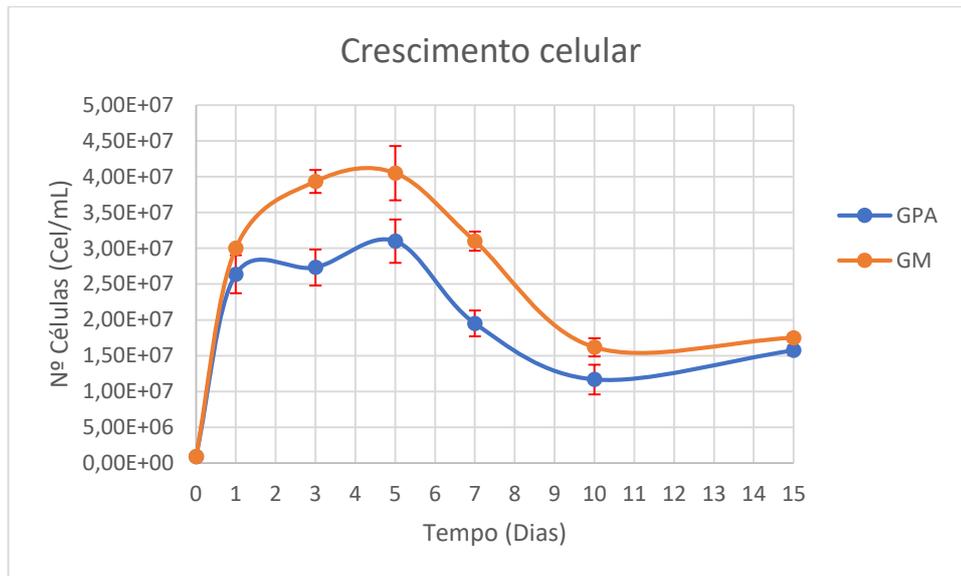
Gpa – Meio glicerol comercial; GM – Meio glicerol/milhocina. Fonte: Autor (2021)

5.2.3 Crescimento celular e a produção de celulose

A produção de celulose está diretamente ligada ao crescimento celular e a disponibilidade adequada de micro e macronutrientes também influenciam em seu rendimento. Dessa forma, o meio é o componente mais importante da cultura celular, pois fornece os substratos necessários ao metabolismo da célula. A elaboração de meios de cultura contendo concentrações ótimas de nutrientes, que variam de acordo com o microrganismo em estudo, é fundamental para o controle e otimização desse bioprocessamento (ALBERTS *et al.*, 2017; CASTILHO *et al.*, 2008; TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, 2017).

Como se pode observar na Figura 5, o meio de cultura GM favoreceu o crescimento celular da *K.hansenii* ao longo da fermentação, com fase exponencial nas primeiras 24 horas. Fato que pode estar atribuído a uma maior estabilidade do pH durante o processo, bem como com a disponibilidade de fontes alternativas de nutrientes proporcionado pela adição de milhocina (CSL) ao glicerol residual (NORO; SUGANO; SHODA, 2004)

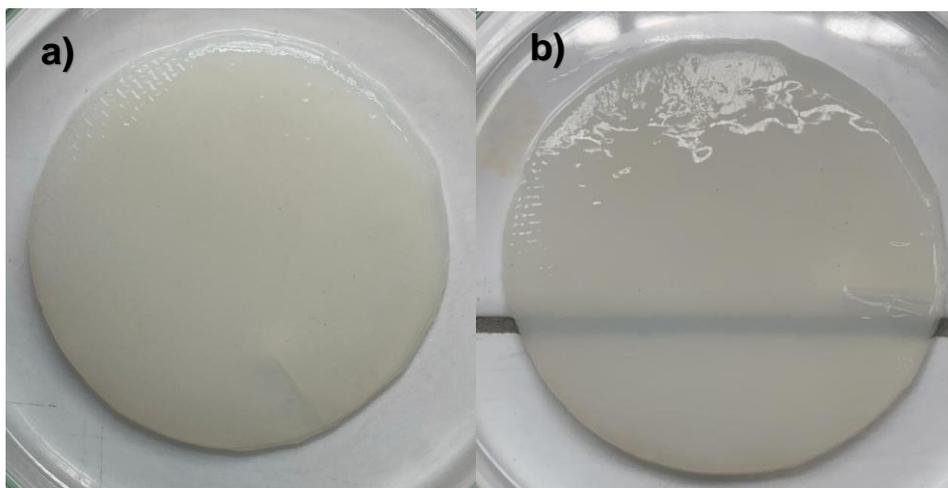
Figura 5: Curva de crescimento celular



Gpa – Meio glicerol comercial; GM – Meio glicerol/milhocina. Fonte: Autor (2021)

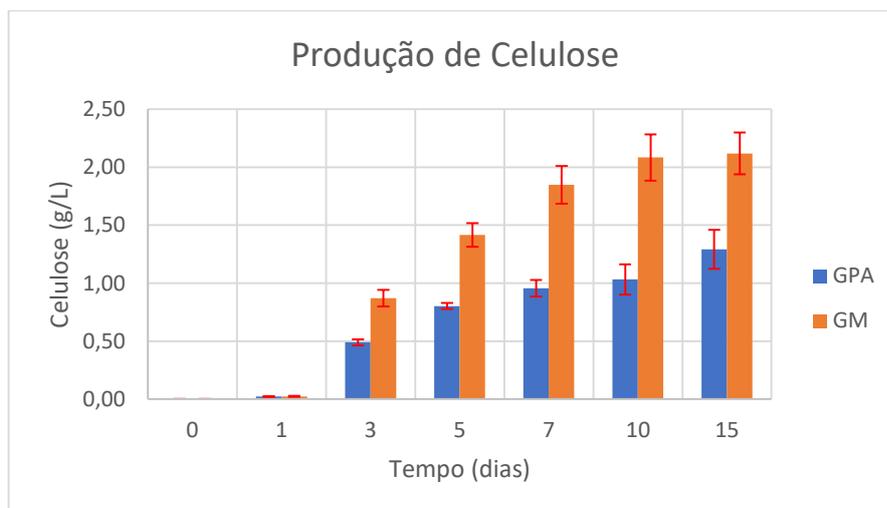
As membranas obtidas durante a fermentação estão apresentadas na Figura 6, na qual se observa uma maior opacidade da membrana obtida no meio GM, parâmetro que pode estar relacionado a espessura do material, uma vez que o meio GM favoreceu a síntese desse biopolímero, de modo que o rendimento foi aproximadamente duas vezes superior ao meio Gpa, com uma produtividade média de 0,25g/dia de celulose até o décimo dia do início da produção, como se pode observar na Figura 7.

Figura 6: Membranas de celulose obtidas em diferentes meios de cultivo



Membranas de celulose obtidas nos meios a) GM e b) Gpa após purificação com NaOH 0,1M. Fonte: Autor (2021)

Figura 7: Produção de celulose bacteriana em diferentes meios ao longo de 15 dias (g/L)



Gpa – Meio glicerol comercial; GM – Meio glicerol/milhocina. Fonte: Autor (2021)

Nota-se, contudo, que a produção ótima de celulose é obtida com 5 dias para o meio GPA e 7 dias para o meio GM, com produtividade de 0,28 e 0,29 g/dia, respectivamente.

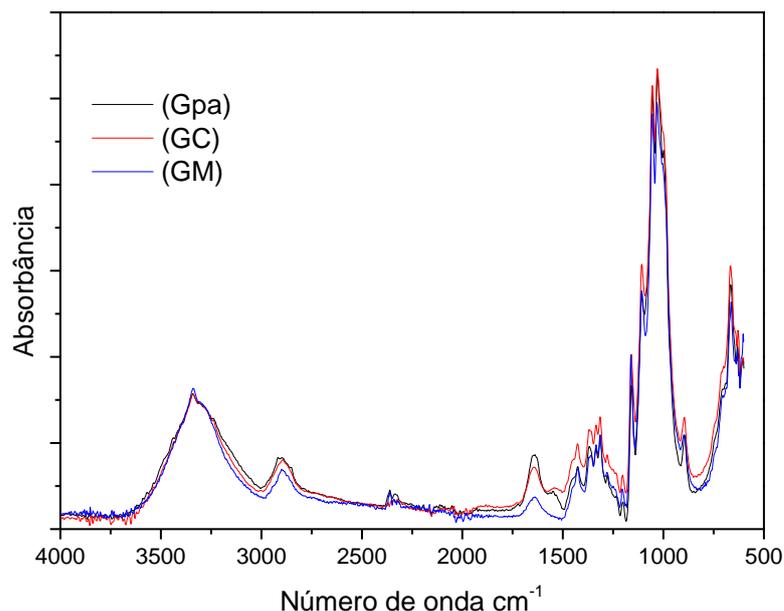
5.3 CARACTERIZAÇÕES

5.3.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

De acordo com o que já foi descrito no tópico 3.5 desse trabalho, a celulose é um homopolímero linear composto por anéis de anidroglicose ligados entre si através de ligações do tipo β -1,4-glicosídicas. Essa estrutura pode ser identificada por espectroscopia, conforme apresentado na Figura 8.

Em ambas as membranas foram identificados picos por volta de 3334 e 2911 cm^{-1} , que correspondem ao alongamento do grupo OH e CH, respectivamente. A diferença de intensidade no pico 2911 refere-se à disponibilidade dos grupos de carbono alifático nas amostras, sendo que quanto menor a intensidade menor a quantidade. As vibrações entre 2700 e 1700 cm^{-1} são desprovidas de bandas significativas. Em 1650 cm^{-1} as ligações são atribuídas ao ângulo de vibração H-O-H da água. Este pico aparece mesmo que as membranas tenham sido previamente secas antes da análise. Observa-se, porém, que na membrana obtida a partir do meio GM a intensidade é menor, o que indica uma maior absorção de água das outras membranas no intervalo de tempo entre a secagem e análise do FTIR (KARAHAN *et al.*, 2011; LIU, K.; CATCHMARK, 2020; MARÉCHAL; CHANZY, 2000).

Figura 8: Espectros na região do infravermelho das membranas de celulose bacteriana



Espectros de FTIR obtidos a partir das membranas de celulose nos meios de cultura contendo glicerol comercial (Gpa) glicerol residual (GC) e Glicerol residual+milhocina (GM). Fonte: Autor(2021)

As bandas com picos em 1425, 1350 e 1326 cm^{-1} se refere à flexão dentro do plano de grupos C-O-H. Enquanto que a banda em 1165 cm^{-1} é atribuída ao alongamento C – O – C e as bandas na faixa de 1028–1072 cm^{-1} ao alongamento C – O. Em 660 cm^{-1} , por sua vez, à flexão fora do plano de O-H. A presença das bandas em 3334, 2911, 1165 e no intervalo entre 1028-1072 confirmam a pureza da CB produzida (KARAHAN *et al.*, 2011; LAZARINI *et al.*, 2016; MARÉCHAL; CHANZY, 2000).

5.3.2 Ação antimicrobiana

Conforme apresentado na

Figura 9, referente a análise da viabilidade celular das substâncias testes: Quitosana 1% em ácido cítrico 4%, Carboximetilcelulose (CMC) 1% em água, e Embalagem bioativa (1:1, das soluções anteriores) para o fungo *Aspergillus niger* (

Figura 9a), *Rhizopus stolonifer* (

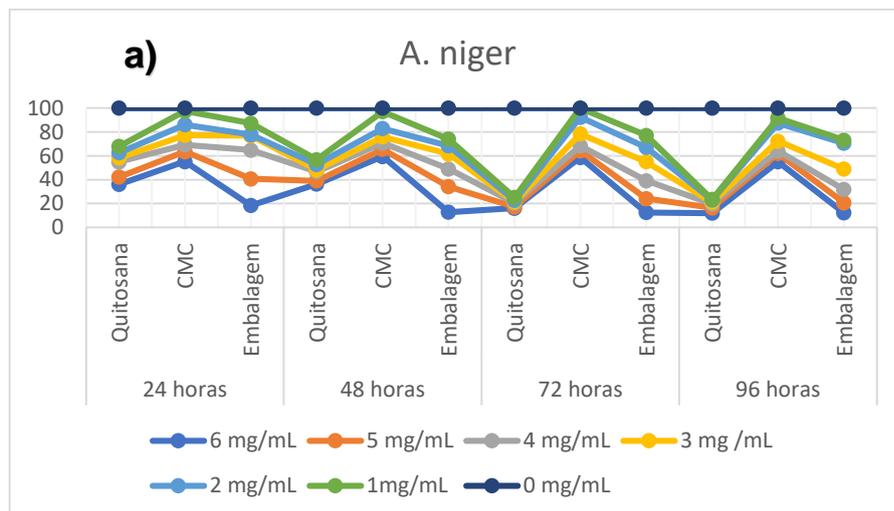
Figura 9b) e *Citeromyces siamensis* (

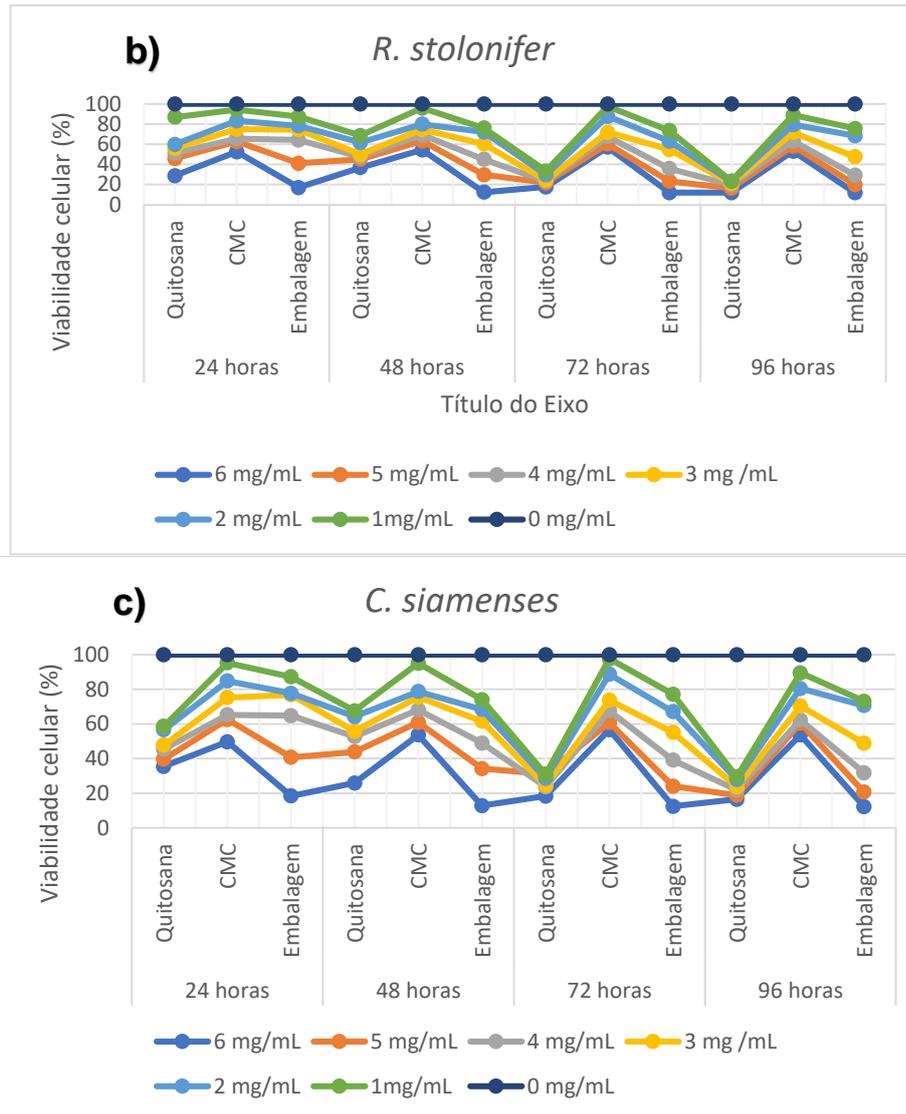
Figura 9c), a CMC manteve a viabilidade celular das culturas acima de 60% em todas as concentrações e tempos analisados, não demonstrando potencial de inibição para os fungos testados.

Alguns estudos avaliam o potencial de inibição da CMC no crescimento de alguns microrganismos e constataram que a carboximetilcelulose não apresenta efeito antimicrobiano, no entanto, a presença de CMC em filmes com a incorporação de compostos que atribuem esse efeito influenciou na resposta e no aumento do quadro de inibição (ESPITIA *et al.*, 2013; MOTELICA *et al.*, 2020; ROY; RHIM, 2020).

A solução de quitosana, por outro lado, apresentou um potencial de inibição do crescimento das cepas testadas em concentrações acima de 5 mg/ml durante as primeiras 48 horas, e em todas as concentrações a partir disso e até o final do experimento. Dentre os valores observados no período de 96 horas, a quitosana manteve uma viabilidade celular de 12,03% para *A. niger* e *R. stolonifer* e 16,5% para *C. siamenses* na concentração de 6 mg/ml. O que confirma o potencial antifúngico desse biopolímero quanto aos microrganismos testados.

Figura 9: Atividade antifúngica das substâncias testes





Fonte: Autor (2021)

Inúmeros são os relatos quanto ao potencial da quitosana em atuar como agente antimicrobiano de amplo espectro e esse polímero é utilizado para as mais diversas finalidades como no revestimento antimicrobiano de produtos hospitalares (NETTO, 2017); na forma de floculantes para o tratamento de água encanada (KANGAMA *et al.*, 2018); hidrogéis de quitosana (TYLISZCZAK *et al.*, 2019); e na formulação de coberturas comestíveis e embalagens bioativas (ARKOUN *et al.*, 2018; ASSIS; BRITTO, 2014; BRITTO; ASSIS, 2012; SILVA, E. *et al.*, 2017).

Quanto a embalagem bioativa de quitosana/CMC (1:1) formulada nesse trabalho, ela manteve um percentual inferior a 20% de células viáveis, na concentração de 6 mg/ml, em ambos os tempos e cepas testadas, com menor viabilidade de 12,22% em 96horas. Resultados que se sobressaíram em comparação

com a quitosana e confirma que a presença da CMC influenciou na resposta e no aumento do quadro de inibição.

No que diz respeito a formulação de embalagens bioativas, além do seu potencial de atuação como agente antimicrobiano, a quitosana age, também, como polímero formador de película e fornece, ao material, a aderência desejada. A CMC, por sua vez, ao ser inserida na solução polimérica, melhoraria as propriedades mecânicas dos filmes, proporcionando uma maior maleabilidade.

6 CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se que a utilização de resíduos (agro)industriais, como a milhocina e o glicerol, como substratos alternativos para a obtenção de celulose bacteriana possui um potencial promissor que influi diretamente no valor do produto final e com a preservação do meio ambiente, pois reutiliza materiais que outrora eram descartados na natureza.

A solução a base de quitosana/carboximetilcelulose utilizada para formular a embalagem bioativa apresentou uma capacidade de inibição do crescimento celular superior as respectivas soluções separadamente, o que atribui ao material a capacidade de atuar como um agente na preservação de alimentos por meio da inibição do crescimento de fungos infectantes.

REFERÊNCIAS

- ABBADE, E. Food Loss/Waste and Logistics Performance: An Analysis of the Brazilian Scenario . **Revista Gestão da Produção Operações e Sistemas**, 2019. v. 14, n. 5, p. 328–350.
- ABDUL KHALIL, H. P. S. *et al.* A review on chitosan-cellulose blends and nanocellulose reinforced chitosan biocomposites: Properties and their applications. **Carbohydrate Polymers**, 2016. v. 150, p. 216–226. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.028>>.
- AFONSO, L. *et al.* Aplicação de subprodutos agroindustriais como fontes de nitrogênio para a produção de sofrorolipídios por *Starmerella bombicola*. **Brazilian Journal of Development**, 2020. v. 6, n. 3, p. 14875–14887.
- AKHTAR, M. *et al.* Corn steep liquor lowers the amount of inoculum for biopulping. **Tappi Journal**, 1997. v. 80, n. 6, p. 161–164.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. [S.l.]: Artmed, 2017.
- ALMEIDA, A. C. S. *et al.* Application of nanotechnology in food packaging | Aplicação de nanotecnologia em embalagens de alimentos. **Polimeros**, 2015. v. 25, p. 89–97.
- ALVES, A. D. P.; FILHO, G. M. R.; MENDES, M. F. AVALIAÇÃO TÉCNICA DE DIFERENTES PROCESSOS DE SEPARAÇÃO PARA PURIFICAÇÃO DO GLICEROL COMO SUBPRODUTO – REVISÃO. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, 2017. v. 6, n. 5, p. 955–982.
- ALVES, E. G. *et al.* Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, 2008. v. 31, n. 5, p. 1224–1229.
- AMORIM, M. C. C. *et al.* Caracterização E Avaliação Paramétrica Da Manipueira. Fortaleza-CE: [s.n.], 2016. p. 1–15.
- AMORIM, R. V. Da S. *et al.* Faster chitosan production by Mucoralean strains in submerged culture. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2001. v. 32, n. 1, p. 20–23.
- ANVISA. RDC nº 91, de 11 de maio de 2001. 2001. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br>>. Acesso em: 2 jan. 2020.
- ARCAN, I.; YEMENICIOĞLU, A. Incorporating phenolic compounds opens a new perspective to use zein films as flexible bioactive packaging materials. **Food Research International**, 2011. v. 44, n. 2, p. 550–556.
- ARKOUN, M. *et al.* Chitosan-based nanofibers as bioactive meat packaging materials.

Packaging Technology and Science, 2018. v. 31, n. 4, p. 185–195.

ASSAWAMONGKHOLSIRI, T.; REUNGSANG, A.; SITTIJUNDA, S. Photo-hydrogen and lipid production from lactate, acetate, butyrate, and sugar manufacturing wastewater with an alternative nitrogen source by rhodobacter sp. kku-ps1. **PeerJ**, 2019. v. 2019, n. 4.

ASSIS, Odilio Benedito Garrido; BRITTO, D. De. Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações. **Brazilian Journal of Food Technology**, 2014. v. 17, n. 2, p. 87–97.

ATCC. Product Sheet *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 23767. **American Type Culture Collection**, 2018.

BARBOSA, I. C. *et al.* Potential of chitosan as an Acerola (*Malpighia glabra* L.) juice natural preservative. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 2015. v. 4, n. 8, p. 929–942.

BARROS, M. C. C. *et al.* Glicerina bruta na dieta de ovinos confinados: Consumo, digestibilidade, desempenho, medidas morfométricas da carcaça e características da carne. **Semina: Ciências Agrárias**, 2015. v. 36, n. 1, p. 453–466.

BARROS, P. D. S. De *et al.* Subproduto Agroindustrial Milhocina Usado como uma Fonte de Indução da Produção de Proteases por *Arthrospira platensis*. [S.l.]: [s.n.], 2016. p. 1–4.

BARROS, R. T. De V. **Elementos de gestão de resíduos sólidos**. Belo Horizonte: Tessitura, 2012.

BAUMANN, H.; FAUST, V. Concepts for improved regioselective placement of. **Carbohydrate Research**, 2001. v. 331, p. 43–57.

BRITTO, D. De; ASSIS, Odilio Benedito Garrido. Chemical, biochemical, and microbiological aspects of chitosan quaternary salt as active coating on sliced apples. **Food Science and Technology**, 2012. v. 32, n. 3, p. 599–605.

CACCIOTTI, I. *et al.* Eco-sustainable systems based on poly(lactic acid), diatomite and coffee grounds extract for food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018. v. 112, p. 567–575. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.018>>.

CACICEDO, M. L. *et al.* Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. **Bioresource Technology**, 2016. v. 213, p. 172–180. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.071>>.

CARNEIRO, H. **Comida e Sociedade: uma historia da alimentação**. 7. ed. Rio de

Janeiro: Elsevier, 2003.

CARREÑO, L. D.; CAICEDO, L. A.; MARTÍNEZ, C. A. Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. **Ingeniería y Ciencia**, 2012. v. 8, n. 16, p. 307–335. Disponível em: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-91652012000200012>.

CARVALHO, R. V. *et al.* Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus sp.* e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2008. v. 28, n. 2, p. 380–386.

CASTILHO, L. R. *et al.* (Org.). **Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy**. [S.l.]: Taylor & Francis Group, 2008.

CHAGAS, B. S. *et al.* Produção de celulose bacteriana a partir de melaço de soja hidrolisado. São Carlos-SP: Emnrapa Instrumentação, 2017. p. 303–306.

CHEN, X. *et al.* Recent approaches and future prospects of bacterial cellulose-based electroconductive materials. **Journal of Materials Science**, 2016. v. 51, n. 12, p. 5573–5588.

COSTA, A. S. V. Da. Resíduos industriais como matéria prima na produção de fertilizantes e utilização no cultivo de milho e feijão. **Research, Society and Development**, 2020. v. 9, n. 8, p. 1–4.

CUTRIM, F. De A. *et al.* Influência de meios de cultura e da interação carbono-nitrogênio no crescimento e esporulação de *Penicillium sclerotigenum*. **Summa Phytopathologica**, mar. 2006. v. 32, n. 1, p. 85–88. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052006000100014&lng=pt&tlng=pt>.

DANTAS, E. A. *et al.* Caracterização e avaliação das propriedades antioxidantes de filmes biodegradáveis incorporados com polpas de frutas tropicais. **Ciencia Rural**, 2015. v. 45, n. 1, p. 142–148.

DING, S. Y.; ZHAO, S.; ZENG, Y. Size, shape, and arrangement of native cellulose fibrils in maize cell walls. **Cellulose**, 2014. v. 21, n. 2, p. 863–871.

DOBRE, L.-M. *et al.* Modelling of sorbic acid diffusion through bacterial cellulose-based antimicrobial films. **Chemical Papers**, 2012. v. 66, n. 2, p. 144–151.

DONINI, Í. A. N. *et al.* Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, 2010. v. 35, n. 4, p. 165–178.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related

- Substances. **Nature**, 1956. v. 28, n. 3, p. 350–356.
- EICHHORN, S. J. *et al.* **Review: Current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites**. [S.l.]: [s.n.], 2010. V. 45.
- ESPITIA, P. J. P. *et al.* Physical-mechanical and antimicrobial properties of nanocomposite films with pediocin and ZnO nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, 2013. v. 94, n. 1, p. 199–208. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.003>>.
- FAI, A. E. C. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de polímeros**, 2008. v. 9, n. 5, p. 435–451.
- FAO. Perdas e desperdícios de alimentos na América Latina e no Caribe. 2020. Disponível em: <<http://www.fao.org/americas/noticias/ver/pt/c/239394/#:~:text=O desperdício é um dos,desperdiça cerca de 15%25 dos>>. Acesso em: 22 fev. 2020.
- FRANCO, L. De O. *et al.* Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). **Brazilian Journal of Microbiology**, 2004. v. 35, p. 243–247.
- GHORMADE, V.; PATHAN, E. K.; DESHPANDE, M. V. Can fungi compete with marine sources for chitosan production? **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017. v. 104, p. 1415–1421. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.112>>.
- GORAYEB, T. C. C. *et al.* ESTUDO DAS PERDAS E DESPERDÍCIO DE FRUTAS NO BRASIL Teresa. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2019. v. 53, n. 9, p. 1689–1699.
- GOY, R. C.; BRITTO, D. De; ASSIS, Odilio B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polimeros**, 2009. v. 19, n. 3, p. 241–247.
- GUERRA, M. P.; ROCHA, F. S.; NODARI, R. O. Biodiversidade , Recursos Genéticos Vegetais e Segurança Alimentar em um Cenário de Ameaças e Mudanças A Biodiversidade e suas Nuances. *In*: VEIGA, R. F. .; QUEIRÓZ, M. . (Org.). **Recursos Fitogenéticos: a base da agricultura sustentável no Brasil**. [S.l.]: [s.n.], 2015, p. 39–52.
- GULLO, M. *et al.* Biotechnological production of cellulose by acetic acid bacteria: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2018. v. 102, p. 6885–6898.
- HONG, F. *et al.* Bacterial cellulose production from cotton-based waste textiles: Enzymatic saccharification enhanced by ionic liquid pretreatment. **Bioresource**

Technology, 2012. v. 104, p. 503–508.

HU, S. *et al.* Characterization of crude glycerol from biodiesel plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2012. v. 60, n. 23, p. 5915–5921.

HU, S. Q. *et al.* Structure of bacterial cellulose synthase subunit D octamer with four inner passageways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2010. v. 107, n. 42, p. 17957–17961.

INDUMATHI, M. P.; SARAL SAROJINI, K.; RAJARAJESWARI, G. R. Antimicrobial and biodegradable chitosan/cellulose acetate phthalate/ZnO nano composite films with optimal oxygen permeability and hydrophobicity for extending the shelf life of black grape fruits. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019. v. 132, p. 1112–1120. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.171>>.

INFANTE, J. *et al.* Atividade Antioxidante De Resíduos Agroindustriais De Frutas Tropicais. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, 2013. v. 24, n. 1, p. 92. Disponível em: <<http://200.145.71.150/seer/index.php/alimentos/article/view/87>>.

ISLAM, S.; BHUIYAN, M. A. R.; ISLAM, M. N. Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. **Journal of Polymers and the Environment**, 2017. v. 25, n. 3, p. 854–866.

ISOGAI, A.; ATALLA, R. H. Preparation of cellulose-chitosan polymer blends. **Carbohydrate Polymers**, 1992. v. 19, n. 1, p. 25–28.

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

KANGAMA, A. *et al.* Application of Chitosan Composite Flocculant in Tap Water Treatment. **Journal of Chemistry**, 2018. v. 2018, n. Dd.

KARAHAN, A. G. *et al.* Some Properties of Bacterial Cellulose Produced by New Native Strain *Gluconacetobacter* sp. A06O2 Obtained from Turkish Vinegar. **Journal of Applied Polymer Science**, 2011. v. 121, p. 1823–1831.

KHOR, E. Chitin : a biomaterial in waiting. 2002. v. 6, p. 313–317.

KRUMREICH, F. D. *et al.* Teor de cinzas em acessos de abóbora (*curcubita máxima* L.) do Rio Grande do Sul. **VIII Simposio de Alimentos**, 2013. v. 8, p. 1–4. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/94505/1/cinzas-em-aboboras.pdf>>.

LANDIM, A. P. M. *et al.* Sustentabilidade quanto às embalagens de alimentos no Brasil. **Polimeros**, 2016. v. 26, p. 82–92.

- LAVASANI, P. S. *et al.* Isolation and identification of komagataeibacter xylinus from Iranian traditional vinegars and molecular analyses. **Iranian Journal of Microbiology**, 2017. v. 9, n. 6, p. 338–347.
- LAWFORD, H. G.; ROUSSEAU, J. D. Corn steep liquor as a cost-effective nutrition adjunct in high-performance zymomonas ethanol fermentations. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, 1997. v. 63–65, n. 1, p. 287–304.
- LAZARINI, S. C. *et al.* Characterization of bilayer bacterial cellulose membranes with different fiber densities: a promising system for controlled release of the antibiotic ceftriaxone. **Cellulose**, 2016. v. 23, n. 1, p. 737–748.
- LEITE, B. Z.; PAWLOWSKY, U. Alternativas de minimização de resíduos em uma indústria de alimentos da região metropolitana de Curitiba. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, 2005. v. 10, n. 2, p. 96–105.
- LEONARDI, J. G.; AZEVEDO, B. M. Métodos de conservação de alimentos. **Revista Saúde em Foco**, 2018. v. 10, p. 51–61.
- LIMA, J. S. G. Segurança alimentar e nutricional: sistemas agroecológicos são a mudança que a intensificação ecológica não alcança. **Ciência e Cultura**, 2017. v. 69, n. 2, p. 49–50.
- LINS, L. S. G. *et al.* Use of biodiesel waste for efficient production of cellulosic membranes: A “green” proposal for filter preparation. **Cellulose Chemistry and Technology**, 2019. v. 53, n. 5–6, p. 417–425.
- LIU, K.; CATCHMARK, J. M. Bacterial cellulose/hyaluronic acid nanocomposites production through co-culturing *Gluconacetobacter hansenii* and *Lactococcus lactis* under different initial pH values of fermentation media. **Cellulose**, 2020. v. 27, n. 5, p. 2529–2540. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10570-019-02924-w>>.
- LONE, A. *et al.* Development of prototypes of bioactive packaging materials based on immobilized bacteriophages for control of growth of bacterial pathogens in foods. **International Journal of Food Microbiology**, 2016. v. 217, p. 49–58.
- LOPES, A. P. *et al.* Purification of residual glycerol obtained in biodiesel production from waste oils. **Revista Virtual de Química**, 2014. v. 6, n. 6, p. 1564–1582.
- MARÉCHAL, Y.; CHANZY, H. The hydrogen bond network in I(β) cellulose as observed by infrared spectrometry. **Journal of Molecular Structure**, 2000. v. 523, n. 1–3, p. 183–196.
- MATI-BAOUCHE, N. *et al.* Chitosan as an adhesive. **European Polymer Journal**,

2014. v. 60, p. 198–212. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.09.008>>.

MIKKELSEN, D. *et al.* Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. **Journal of Applied Microbiology**, 2009. v. 107, n. 2, p. 576–583.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, 1959. v. 31, n. 3, p. 426–428.

MOGHIMI, R.; ALIAHMADI, A.; RAFATI, H. Antibacterial hydroxypropyl methyl cellulose edible films containing nanoemulsions of *Thymus daenensis* essential oil for food packaging. **Carbohydrate Polymers**, 2017. v. 175, p. 241–248. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.086>>.

MONTES, S. M. N. M.; RAGA, A. EFICÁCIA DE ATRATIVOS PARA MONITORAMENTO DE CERATITIS CAPITATA (DIPTERA: TEPHRITIDAE) EM POMAR DE CITROS. 2006. p. 317–323.

MOON, R. J. *et al.* Cellulose nanomaterials review: Structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society Reviews**, 2011. v. 40, n. 7, p. 3941–3994.

MOREAU, C. *et al.* Tuning supramolecular interactions of cellulose nanocrystals to design innovative functional materials. **Industrial Crops and Products**, 2016. v. 93, p. 96–107. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.028>>.

MOREIRA, M. Del R. *et al.* Antimicrobial Effectiveness of Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan and Casein Polymers: Assessment on Carrot, Cheese, and Salami. **Journal of Food Science**, 2011. v. 76, n. 1.

MOTA, C. J. A. *et al.* Glycerin derivatives as fuel additives: The addition of glycerol/acetone ketal (solketal) in gasolines. **Energy and Fuels**, 2010. v. 24, n. 4, p. 2733–2736.

MOTELICA, L. *et al.* Biodegradable antimicrobial food packaging: Trends and perspectives. **Foods**, 2020. v. 9, n. 10, p. 1–36.

MURARKA, A. *et al.* Fermentative utilization of glycerol by *Escherichia coli* and its implications for the production of fuels and chemicals. **Applied and Environmental Microbiology**, 2008. v. 74, n. 4, p. 1124–1135.

MUTEIA, H. O crescimento populacional e a questão alimentar. **O País**, 2014. p. 1.

NASCIMENTO, J. C. Dos S. *et al.* Produção de fitase por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 utilizando planejamentos fatoriais. **Pubvet**, 2019. v. 13, n. 3, p. 1–10.

- NETTO, C. G. Revestimento antimicrobiano de quitosana é usado em produtos hospitalares. **UNICAMP**, 2017. Disponível em: <<https://www.unicamp.br/unicamp/ju/noticias/2017/12/19/revestimento-antimicrobiano-de-quitosana-e-usado-em-produtos-hospitalares>>.
- NIEDERHOFER, A.; MÜLLER, B. W. A method for direct preparation of chitosan with low molecular weight from fungi. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2004. v. 57, n. 1, p. 101–105.
- NORO, N.; SUGANO, Y.; SHODA, M. Utilization of the buffering capacity of corn steep liquor in bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2004. v. 64, n. 2, p. 199–205.
- OLIVEIRA, M. R. B. *et al.* Produção de etanol a partir de melão de cana. **Revista de estudos ambientais (Online)**, 2019. v. 21, n. 1, p. 38–45.
- ONU. Organização das Nações Unidas. [s.d.]. Disponível em: <<https://population.un.org/wpp/>>.
- ORAK, T. *et al.* Chicken feather peptone: A new alternative nitrogen source for pigment production by *Monascus purpureus*. **Journal of Biotechnology**, 2018. v. 271, n. February, p. 56–62. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.02.010>>.
- OTONI, C. G. *et al.* Recent Advances on Edible Films Based on Fruits and Vegetables—A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2017. v. 16, n. 5, p. 1151–1169.
- PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. De O. Utilização de Resíduos Agro-Industriais em Processos Biotecnológicos como Perspectiva de Redução do Impacto Ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, 2007. v. 2, n. 1, p. 118–127.
- PENHA, E. Das M. *et al.* Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus niger*. **Ciência Rural**, 2016. v. 46, n. 4, p. 755–761.
- PINHEIRO, F. De A. *et al.* Perfil de Consumidores em Relação à Qualidade de Alimentos e Hábitos de Compras. **Unopar Cient Ciênc Biol Saúde**, 2011. v. 13, n. 2, p. 95–102.
- PINOTTI, T. *et al.* MEDIA COMPONENTS AND AMINO ACID SUPPLEMENTS INFLUENCING THE PRODUCTION OF FRUITY AROMA BY *GEOTRICHUM CANDIDUM*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2006. v. 37, p. 494–498.
- POLÍTICA NACIONAL DE RESÍDUOS SÓLIDOS; BRASIL. Lei Nº 12.305, de 2 de

agosto de 2010. **Política Nacional de Resíduos Sólidos**, [s.d.]. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2010/Lei/L12305.htm>. Acesso em: 4 mar. 2020.

RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M.; KUMBHAR, J. V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2015. v. 99, n. 6, p. 2491–2511.

RODSAMRAN, P.; SOTHORNVIT, R. Carboxymethyl cellulose from renewable rice stubble incorporated with Thai rice grass extract as a bioactive packaging film for green tea. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2018. v. 42, n. 9, p. 1–9.

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

ROY, S.; RHIM, J. W. Carboxymethyl cellulose-based antioxidant and antimicrobial active packaging film incorporated with curcumin and zinc oxide. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020. v. 148, p. 666–676. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.204>>.

RUKA, D. R.; SIMON, G. P.; DEAN, K. M. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, 2012. v. 89, n. 2, p. 613–622. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.059>>.

RUSSELL, J. B. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. **Journal of Animal Science**, 1998. v. 76, n. 7, p. 1955. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jas/article/76/7/1955-1963/4639183>>.

SACHDEVA, N. *et al.* Assessment of transient effects of alternative nitrogen sources in continuous cultures of *Arthrospira* sp. using proteomic, modeling and biochemical tools. **Bioresource Technology**, 2018. v. 267, n. July, p. 492–501. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.062>>.

SALVI, D. T. B. DE *et al.* Preparation, thermal characterization, and DFT study of the bacterial cellulose: Triethanolamine system. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 2014. v. 118, n. 1, p. 205–215.

SANTIBÁÑEZ, C.; VARNERO, M. T.; BUSTAMANTE, M. Residual glycerol from biodiesel Manufacturing, waste or potential source of Bioenergy: A review. **Chilean Journal of Agricultural Research**, 2011. v. 71, n. 3, p. 469–475.

SANTOS, K. L. DOS *et al.* Food losses and waste: Reflections on the current brazilian scenario. **Brazilian Journal of Food Technology**, 2020. v. 23, p. 1–12.

- SHEN, Z. *et al.* Effect of alkaline catalysts on hydrothermal conversion of glycerin into lactic acid. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, 2009. v. 48, n. 19, p. 8920–8925.
- SILVA, D. B.; SOUZA, B. R. De; ANTERO, R. V. P. Produção biotecnológica de produtos de valor agregado utilizando glicerol residual proveniente da síntese de biodiesel. **Evidência - Ciência e Biotecnologia**, 2017. v. 17, n. 2, p. 63–86.
- SILVA, E. *et al.* Aplicação de cobertura de quitosana em jabuticabas. **Agrarian**, 2017. v. 10, n. 38, p. 363.
- SILVA, F. M. *et al.* Rotas tecnológicas empregadas no aproveitamento de resíduos da indústria da soja. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, 2019. v. 8, n. 1, p. 326–363.
- SILVA, R. Do N. *et al.* Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2003. v. 23, n. 3, p. 337–341.
- SILVEIRA, M. M. *et al.* Production of glucose-fructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2001. v. 55, n. 4, p. 442–445.
- SINGH-NEE NIGAM, P.; PANDEY, A. (Org.). **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation**. [S.l.]: Springer Science, 2009.
- SONKAEW, P.; SANE, A.; SUPPAKUL, P. Antioxidant activities of curcumin and ascorbyl dipalmitate nanoparticles and their activities after incorporation into cellulose-based packaging films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2012. v. 60, n. 21, p. 5388–5399.
- SOUZA, S. S. De; CASTRO, J. De V.; PORTO, L. M. Modeling the core metabolism of *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 to evaluate nanocellulose biosynthesis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 2018. v. 35, n. 3, p. 869–886.
- STAMFORD, T. C. M. *et al.* Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, 2007. v. 10, n. 1, p. 1–8.
- STUMPF, T. R. *et al.* In situ and ex situ modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, 2018. v. 82, p. 372–383. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.121>>.
- SULAEVA, I. *et al.* Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review. **Biotechnology Advances**, 2015. v. 33, n. 8, p. 1547–

1571. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.009>>.

TAVARES, T. S. *et al.* Influência de quitosana de baixa massa molar na manutenção da qualidade pós-colheita de morangos. **Cad. Ciênc. Agra**, 2017. v. 9, n. 2, p. 36–47.

TIMOFIECSYK, F. Do R.; PAWLOWSKY, U. Minimização de resíduos na indústria de alimentos: revisão fabiana do rocio timofiecsyk * urivald pawlowsky **. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, 2000. v. 18, n. 2, p. 221–236.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 12. ed. [S.l.]: [s.n.], 2017.

TYLISZCZAK, B. *et al.* Synthesis, characterization, and in vitro cytotoxicity of chitosan hydrogels containing nanogold. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, 2019. v. 68, n. 4, p. 175–182.

VARGAS, A. L. V. *et al.* ANÁLISE DO CUSTO OPERACIONAL DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO E DE LACTOBACILLUS PLANTARUM CCT 0580 UTILIZANDO MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR. **RBCIAMB**, 2017. n. 46, p. 102–116.

VIANA, R. M. *et al.* Nanofibrillated bacterial cellulose and pectin edible films added with fruit purees. **Carbohydrate Polymers**, 2018. v. 196, n. January, p. 27–32.

VIEIRA DE JESUS, M. *et al.* Produção de lipase utilizando manipueira como fonte alternativa de carbono. **Scientia Plena**, 2016. v. 12, n. 5, p. 1–7.

VOLOVA, T. G. *et al.* Production and properties of bacterial cellulose by the strain Komagataeibacter xylinus B-12068. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2018. v. 102, p. 7417–7428.

WU, Y. B. *et al.* Preparation and characterization on mechanical and antibacterial properties of chitsoan/cellulose blends. **Carbohydrate Polymers**, 2004. v. 57, n. 4, p. 435–440.

XIAO, X. *et al.* Determination of main categories of components in corn steep liquor by near-infrared spectroscopy and partial least-squares regression. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2012. v. 60, n. 32, p. 7830–7835.

YAMADA, Y. *et al.* Description of Komagataeibacter gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). **Journal of General and Applied Microbiology**, 2012. v. 58, n. 5, p. 397–404.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. **1ª Edição Digital**. IV ed. São Paulo: [s.n.], 2008.

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

ANEXOS



Silvani Verruck
Organizadora

AVANÇOS EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



VOLUME

4

editora científica

04

“

Kombuchá: do “chá da imortalidade” a produção de celulose bacteriana

- Daniella Pereira da **Silva**
UFPE
- Thayza Christina Montenegro **Stamford**
UFPE
- Felipe Ravelly Alves de **Souza**
UFPE
- Eriane de Castro Lima **Machado**
UFPE - CAV
- Tania Lúcia Montenegro **Stamford**
UFPE

24

“

Biopolímeros na indústria de alimentos: do aproveitamento de resíduos agroindustriais a produção de biopolímeros

- ▮ Felipe Ravelly Alves de **Souza**
PPGBIOTEC/UFPE
- ▮ José Sebastião Thiego de **Oliveira**
PPGBIOTEC/UFPE
- ▮ Daniella Pereira da **Silva**
PPGBIOTEC/UFPE
- ▮ Michelle Galindo de **Oliveira**
CAV/UFPE
- ▮ Danielle Dias **Neves**
UFRPE
- ▮ Wagner Eduardo da **Silva**
UFRPE
- ▮ Thayza Christina Montenegro **Stamford**
UFPE