

BIOSSÍNTESE E RECENTES AVANÇOS NA PRODUÇÃO
DE CELULOSE BACTERIANA

Ígor A. N. Donini¹; Denise T. B. De Salvi¹; Fabiana K. Fukumoto^{1,3}; Wilton R. Lustri²; Hernane S. Barud^{1*};
Reinaldo Marchetto¹, Younes Messaddeq¹, Sidney J. L. Ribeiro

¹Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, UNESP, SP, Brasil

²Centro Universitário de Araraquara, UNLARA.

³Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, UNESP, SP, Brasil
hernane.barud@gmail.com

Resumo: O presente trabalho discute os recentes avanços na biossíntese e na produção de celulose bacteriana (CB) pela gram-negativa, aeróbia e aceto-ácida *Gluconacetobacter xylinus*. A CB se difere de seu par vegetal, principalmente devido ao seu caráter de fibras nanométricas, contra o caráter micrométrico da vegetal, são extruídas através da parede celular de *G. xylinus*, com isso sua estrutura macroscópica é mecanicamente e fisicamente mais resistente, abrindo grandes oportunidades de aplicações tecnológicas e biológicas, muito além das obtidas pela celulose vegetal. O desafio atual está no aumento da produção de CB, que se debruça num maior entendimento de sua biossíntese para que seja possível uma posterior manipulação genético-bioquímica oriundas do recente avanço na biologia molecular e nos bioprocessos. São relacionados trabalhos utilizando a CB como base para produção de compósitos como também o que a está sendo feito de mais atual com este material biológico.

Palavras-chave: Celulose Bacteriana, *Gluconacetobacter*, Avanços e Biossíntese.

Introdução

O biopolímero mais abundante no mundo é a celulose (C₆H₁₀O₅), com uma produção estimada de 10¹⁴ toneladas por ano e de grande importância econômica, ela pode ser encontrada em diferentes formas de vida como em plantas verdes, fungos, protozoários, e procariontes; em relação à sua estrutura, é constituída por unidades de β-D-glicopiranoose unidas por ligações glicosídicas β-(1→4).

A celulose é o principal componente da parede celular de plantas, contendo impurezas como lignina, pectina e hemicelulose, quando se relaciona à fins industriais [1]. Este polímero pode ser dividido em dois grupos: grupo da celulose complexa e o grupo da celulose pura, no qual se encontra a celulose bacteriana. Hoje, acredita-se que a celulose bacteriana se enquadra em um biopolímero bastante

promissor, tornando-se um dos biomateriais mais prósperos para a área da saúde, sendo obtida através de rotas de biossíntese por meio de bactérias de

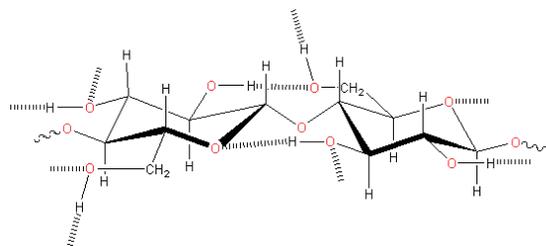


Figura 1. Estrutura linear da celulose. As linhas pontilhadas esquematizam as ligações de hidrogênio possíveis.

alguns gêneros como: *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes* e a forma de obtenção desta, a torna livre de impurezas além de diminuir o custo final do produto [1]. O polímero linear de celulose é fortemente associado através das ligações de hidrogênio que são responsáveis pela formação das fibras de celulose. Moléculas de celulose formam ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares sendo que o primeiro tipo de interação é responsável pela rigidez da cadeia e o segundo pela formação da fibra vegetal.

Industrialmente a celulose é muito usada na produção de papel, na indústria madeireira, como

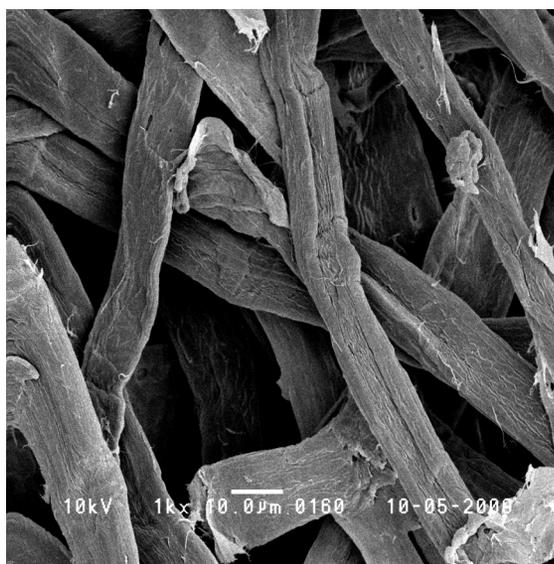
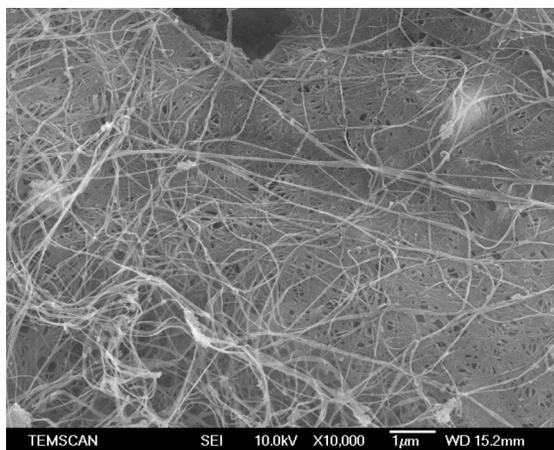


Figura 2. Diferenças entre as fibras de celulose bacteriana (a) e vegetal (b) são marcantes quando micrografadas.

emulsificador, agente dispersante, agente gelificante, entre outras. Atualmente a madeira do eucalipto tem sido uma das principais fontes industriais de celulose sendo composta por celulose (40 a 45%), lignina (25 a 30%), hemiceluloses (30%) e extrativos (até 4%).

O mecanismo de cristalização das microfibrilas em *G. xylinus* pode dar origem a duas aloformas de celulose: a celulose I, constituída por microfibrilas que se orientam de forma paralela e a celulose II, composta por microfibrilas que se orientam de forma antiparalela [2] [3] [4]. A bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, anteriormente denominada *Acetobacter xylinum* [5], foi descrita pela primeira vez por Brown em 1886 [6]. Ele identificou uma manta gelatinosa formada na superfície do caldo de fermentação do vinagre. Uma análise microscópica da manta revelou a presença de bactérias distribuídas por toda ela [7].

A celulose bacteriana possui a mesma fórmula química que a celulose vegetal, mas suas fibras em dimensões nanométricas dão à CB propriedades distintas. Entre essas propriedades destacam-se a alta resistência mecânica e à tração, a possibilidade de inserções de materiais para obtenção de compósitos, e mais recentemente, essas inserções têm sido feitas “*in situ*”, durante o cultivo da bactéria *Gluconacetobacter xylinus*.

Entre as diversas aplicações biotecnológicas da membrana de CB, alguns exemplos seriam em regeneração tecidual como o Biofill da empresa brasileira Bionext [8], nos biomateriais da norte-americana Xylos [9], o implante vascular artificial BasyC [10], no diafragma para fones de ouvido da multinacional japonesa Sony [11], mais recentemente na utilização como substrato para OLEDs [12], e como base para compósitos pela inserção de: prata [13, 14], fosfato [15], pectina [16], amido [17], termoplásticos [18], ouro [19] em condutividade elétrica, sílica [20], entre outros [14, 21, 12, 20, 22] outras aplicações podem ser encontradas na Tabela 1.

Biosíntese da bactéria *Gluconacetobacter xylinus*

G. xylinus é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família Acetobacteriaceae [23], aeróbia estrita que realiza a oxidação incompleta de diversos açúcares e álcoois, tendo como hábitat natural frutos e vegetais em processo de decomposição. A produção de celulose bacteriana (CB) por *G. xylinus* pode ser obtida em laboratório utilizando cultivos tanto em meios sólidos como líquidos. Para a bactéria, a CB funciona como mecanismo de

Tabela 1 – Aplicações da Celulose Bacteriana

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

flotação, permitindo ao microrganismo permanecer em uma interface ar/líquido para obter oxigênio com maior facilidade para seu crescimento. Além de atuar como barreira física que protege a bactéria da radiação ultra-violeta, a CB aumenta a capacidade de colonizar substratos e seu caráter higroscópico permite a retenção de umidade prevenindo a desidratação do substrato [24].

Devido sua complexidade ainda hoje a *G. xylinus* tem sido considerada um organismo modelo para o estudo da biossíntese de celulose [2]. A síntese de celulose por *G. xylinus* constitui um complexo processo que envolve três etapas principais. A primeira refere-se à polimerização dos resíduos de glicose em cadeias $_{1-4}$ -glucana [2] [3] [4]. A segunda etapa corresponde à secreção extracelular das cadeias lineares e a terceira corresponde à organização e cristalização das cadeias de glucanas, por meio de ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals dispostas hierarquicamente em tiras [3]. O resultado desse processo é a formação de uma estrutura tridimensional resistente denominada microfibrila. A CB produzida por *G. xylinus* apresenta duas características particulares: sua polaridade unidirecional e sua espessura variável [2].

A biossíntese da CB depende de duas vias anfóblicas importantes, a via das pentoses e o ciclo de Krebs [2] [3]. A via das pentoses participa da oxidação dos carboidratos e, no ciclo de Krebs,

ocorre a oxidação dos ácidos orgânicos. *G. xylinus* é incapaz de metabolizar a glicose anaerobicamente devido à carência da fosfofrutoquinase-1, enzima responsável pela catálise da reação de fosforilação da frutose-6-fosfato a frutose-1,6-difosfato, o que inviabiliza a glicólise [3]. Assim, a síntese da celulose em *G. xylinus* resulta de um *pool* metabólico de hexose fosfato que é sustentada diretamente pela fosforilação de hexoses exógenas e indiretamente pela via das pentoses e gliconeogênese. A conversão da hexose fosfato em celulose é direta, não dependendo, necessariamente, de clivagens intermediárias do esqueleto carbônico [3].

A síntese de celulose por *G. xylinus* se dá a partir da glicose transportada do meio externo para o citoplasma da bactéria ou de fontes internas. A conversão da glicose transportada do meio externo para o citoplasma bacteriano é catalisada por quatro enzimas, sendo elas: Glicoquinase, que é a enzima responsável pela fosforilação do carbono 6 da glicose, a Fosfoglicomutase que catalisa a reação de isomerização da glicose-6-fosfato para glicose-1-fosfato, a UDPG - pirofosforilase (glicose – 1 - fosfato uridililtransferase) que sintetiza a UDP - glicose (UDPG) e a Celulose Sintase (CS) que produz a celulose a partir de UDP-glicose. A síntese da celulose, a partir de fontes endógenas, se dá a partir da gliconeogênese que, em *G. xylinus*, ocorre a partir do oxalacetato, via piruvato, devido a um

mecanismo de regulação não comum das enzimas oxalacetato descarboxilase e a piruvato fosfato diquinase, que converte o piruvato a fosfoenolpiruvato [25] [3] [26]. A reação de síntese de CB constitui um processo oneroso para a célula, consumindo cerca de 10% do ATP gerado no metabolismo bacteriano. Assim, a energia empregada para a síntese da CB é proveniente do metabolismo aeróbio [2]. Existem diferentes propostas quanto ao substrato utilizado pela CS. Uma hipótese propõe a ligação da UDP-glicose a lipídios da membrana plasmática [2] [27] [28]. Outra hipótese considera que o precursor solúvel interage diretamente com a CS [29].

A celulose sintase (CS) é um complexo protéico constituído de três (AxCcSAB, AxCcSC e AxCcSD) ou quatro (AxCcSA, AxCcSB, AxCcSC e

AxCcSD) subunidades protéicas codificadas por genes existentes em um operon *bcs* cromossomal. AxCcSA e AxCcSAB apresentam um motivo constituído por D,D,D,Q-X-X-R-W, completamente conservado em glicosiltransferases [30]. Através da análise funcional da CS, verifica-se que a subunidade A desse complexo, com 83kDa, apresenta atividade catalítica. A subunidade B, de 90kDa, aumenta a velocidade de síntese da celulose, associando-se a um regulador alostérico positivo, o ácido cíclico diguanílico (c-di-GMP). As subunidades C (138kDa) e D (17kDa) parecem apresentar atividade estrutural. Tem sido hipotetizado que a subunidade C encontra-se relacionada com a formação de poros de extrusão da celulose e a subunidade D parece estar relacionada com o processo decristalização, pois cepas mutantes

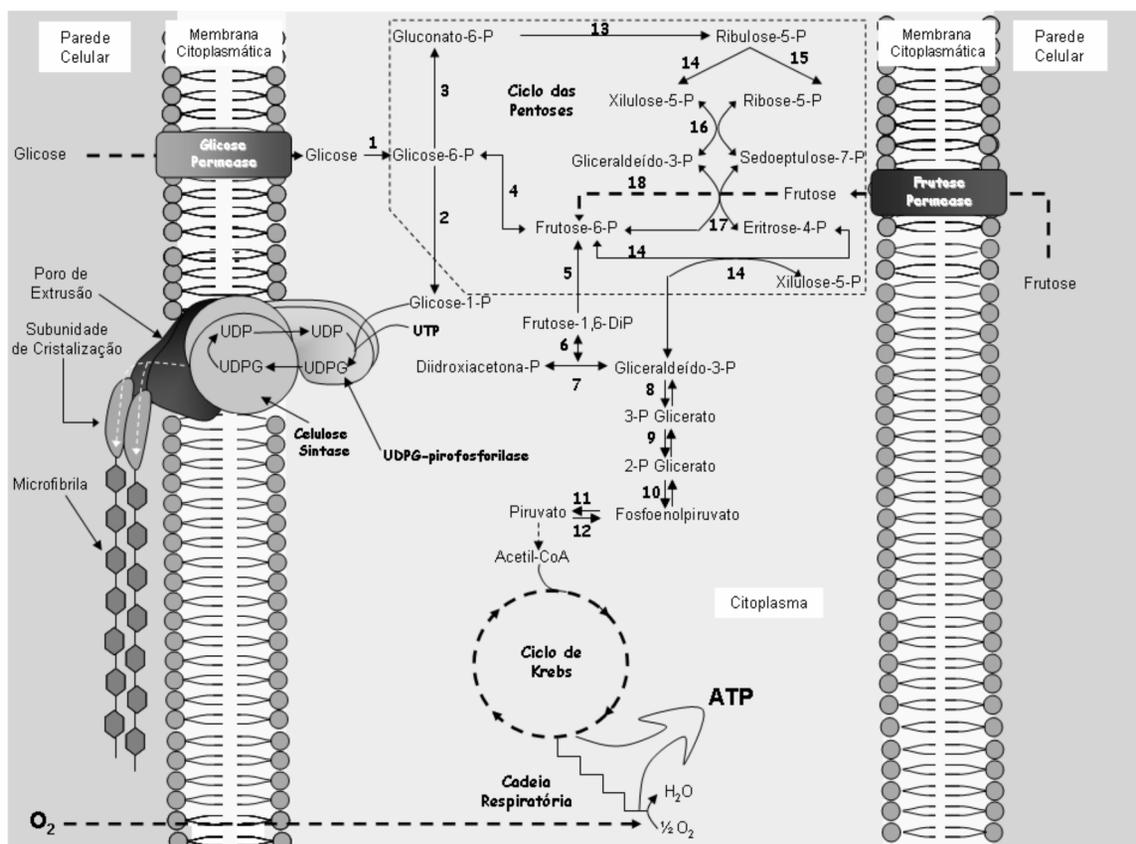


Figura 3. Modelo hipotético da rota metabólica para a biossíntese de celulose por *G. xylinus*– Glicoquinase ATP (1); Fosfoglicomutase (2); Glicose 6-fosfato desidrogenase (3); Fosfoglicoisomerase (4); Frutoquinase ATP (5); Aldolase (6); Triose fosfato isomerase (7); Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (8); Fosfogliceratomutase (9); Enolase (10); Piruvatoquinase (11); Piruvato difosfato diquinase (12); 6-fosfogliconato desidrogenase (13); Fosforribulose epimerase (14); Fosforribulose isomerase (15); Transacetolase (16); Transaldolase (17); Frutoquinase (18); Piruvato desidrogenase (19) (modificado de [2, 32] [3] [33] [10]).

do gene que codifica para a produção da subunidade D ainda são capazes de produzir celulose II [31]. A Figura 3 representa um modelo da rota metabólica para a biossíntese da celulose por *G. xylinus*.

Avanços na produção da celulose bacteriana

A formação da membrana de CB pode ocorrer não apenas em meio estático, mas também em cultivos dinâmicos, ou seja, agitados, como em biorreatores ou em frascos com agitação, feitos com o objetivo de aumentar a produção pois nestes casos o material produzido tem baixa resistência mecânica, e se apresenta na forma de pellet ou como um emaranhado de fibras. Apesar disso, a utilização destes métodos objetiva por aumentar a produção de CB para fins industriais. Durante a formação da membrana no meio de cultura é possível inserir diversos materiais no meio de cultura para o desenvolvimento de compósitos à base de CB [1], esta forma de obtenção de compósitos pode ser considerada uma inserção “*in situ*”, pois acontece durante o cultivo de *Gluconacetobacter xylinus*, que insere materiais na sua rede de fibras através da difusão dos mesmos no meio de cultura, o que leva à formação de estruturas com qualidades adicionais. As adições “*in situ*” vêm sendo bastante utilizadas na literatura, exemplos como hidroxiapatita [34] e colágeno [35] em regeneração óssea guiada e nanotubos de carbono [36] [37], que possui diversas aplicações tecnológicas. Essa possibilidade de inserção de materiais nas fibras de CB, não só através do cultivo, mas também

com a membrana *in natura*, levaram recentemente à uma multiplicação das pesquisas com a CB. Além disso, as fibras em escala nanométrica da CB [7] explicam a alta resistência mecânica, que durante a dinâmica de sua biossíntese, através da automontagem de camadas formadas pela sobreposição de fibras oriundas dos poros de Gx [38],[3, 39, 40], formam uma resistente trama que através de sua manipulação e utilização, abrem diversas possibilidades de inovações tecnológicas e aplicações comerciais e científicas [8], [41], [1]. Pode-se encontrar maiores detalhes e exemplos a respeito das inserções feitas “*in situ*” na **Tabela em anexo**, que mostra o que têm sido feito na literatura.

Existe atualmente, um grande interesse com relação ao aumento substancial da produtividade da CB, diversos autores têm trabalhado sobre este enfoque, utilizando diferentes formas de cultivo como em biorreatores e cultivos agitados, em contraste com o cultivo tradicional de meio de cultivo estático, além de variações nas condições de suplementação. O melhor rendimento por litro encontrado na literatura foi de 15,3g/L em 50 horas de cultivo, outros resultados podem ser encontrados na **Tabela 2** [9], [1].

Quase que a totalidade da produção mundial de celulose para usos comerciais é feita pela obtenção através das plantas [7]. Para a obtenção desta celulose vegetal (CV) é necessário a sua separação de outros compostos como hemicelulose e lignina, através de reações extremamente poluentes que ao serem realizadas produzem compostos como os organoclorados, entre outros, igualmente nocivos ao meio

Tabela 2. Maiores produções de Celulose Bacteriana encontradas na literatura.

Bactéria	Fonte de Carbono	Suplementação	Tempo de Cultivo (horas)	Produção (g/L)	Ref.
<i>G. xylinus</i> BRC 5	Glicose	Etanol e oxigênio	50	15,3	[75]
<i>G. xylinus</i> BPR 2001	Melaço	-	72	7,82	[52]
<i>G. xylinus</i> BPR 2001	Frutose	Agar e oxigênio	72	14,1	[64]
<i>G. xylinus</i> BPR 2001	Frutose	ágar	56	12	[64]
<i>G. xylinus</i> ssp. <i>sucrofermentans</i>	Vários	Ácido Acético	101	28,4	[77]. [78]
<i>G. xylinus</i> ssp. <i>sucrofermentans</i> BPR 2001	Frutose	oxigênio	52	10,4	[68]
<i>Acetobacter</i> SP A9	Glicose	Etanol e oxigênio	192	15,2	[74]
<i>G. xylinus</i> ssp. <i>sucrofermentans</i> BPR 2002	Frutose	Agar e oxigênio	44	8,7	[68]

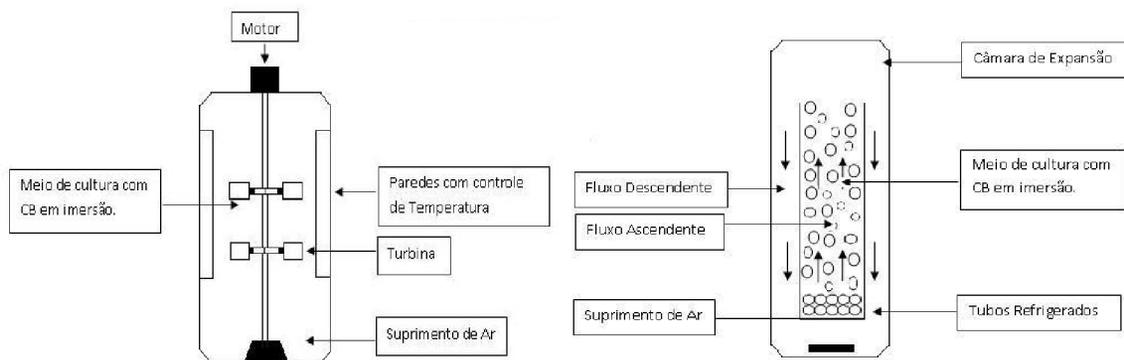


Figura 4. Tipos de Biorreatores Utilizados na produção de celulose bacteriana. Em a) Biorreator de Tanque Agitado e b) Biorreator Airlift;

ambiente [42, 43]. Em contraste com a obtenção da CV, a celulose bacteriana tem processos de *downstream* e *upstream* simples, não contendo qualquer composto indesejado, com economia de produção, que após a eliminação de *G. xylinus*, e o processo de desidratação, pode ser prontamente utilizável [11]. Têm-se, com isso, um produto com elevada aplicabilidade industrial, mais versátil, econômico e também ecologicamente sustentável, tanto pela diminuição de impacto ambiental ao eliminar o a produção de efluentes tóxicos, como também pela não utilização de terras agricultáveis para a produção de madeira, aumentando assim, a disponibilidade de áreas para a produção de alimentos.

A CB pode ser produzida 365 dias por ano, independente das condições climáticas ou ambientais, sua produção através do cultivo de *G. xylinus* em ambiente laboratorial ou controlado, permite essa capacidade. Apesar de todas essas qualidades, ainda não existe uma planta de produção de CB em grande escala, devido à falta de otimização do cultivo, ocasionando baixos rendimentos, incompatíveis com a demanda por celulose na produção de papel, por exemplo.

Haja vista as inúmeras aplicações da CB e seu caráter sustentável e a atual perspectiva de mercado para com a celulose e seus derivados [44], é oportuna a comparação de produtividades entre celulose bacteriana e vegetal. Neste caso comparando 1 hectare de eucalipto com Incremento Médio Anual (IMA) de 50 m³, e considerando uma densidade básica de aproximadamente 500 kg por m³, têm-se um IMA de 25 toneladas por hectare ano. Com um plantio de 7 anos com um teor de aproximadamente

45% de celulose, tem-se em torno de 80 toneladas de celulose por hectare após 7 anos de cultivo [45]. A mesma produção seria alcançada com a celulose bacteriana a um rendimento hipotético de 15 gramas por litro em 50 horas (média de 0,3 gramas por hora), em um biorreator de 500 m³ tem-se uma produção de celulose bacteriana equivalente a 1 hectare de eucalipto em sete anos, produzida em aproximadamente 22 dias, além de ser um produto puro e ecologicamente sustentável. Na **figura 4** encontram-se dois tipos de biorreatores que podem ser utilizados na produção de CB, que são uma saída ao cultivo estático.

Com isso, o mecanismo de biossíntese de CB pode ter sido compreendido, a excreção e a formação da mesma tem atingido um grau elevado de elucidção, o novo enfoque na otimização da produção de CB pode ser pela biologia molecular da bactéria, através do mapeamento do seu genoma, abrindo novas perspectivas pela manipulação da via metabólica de CB ou via clonagem de seus genes em outros microrganismos com maior potencial de produção. Nobles e Brown [46] clonaram genes de *G. xylinus* na cianobactéria *Synechococcus leopoliensis*, mimetizando a produção de celulose, e obtiveram bons resultados, que podem ser levados à escala industrial, principalmente na utilização da celulose como substrato para a produção de biocombustíveis de segunda geração, como o etanol de celulose, devido à ausência de cristalinidade do material encontrado pelos autores. Ishida e colaboradores [47] bloquearam a produção de ácido acético através de uma mutação da linhagem de *G. xylinus* BPR 2001, dando o nome de EP1 para a linhagem mutante, para avaliar o rendimento de

celulose, o resultado foi uma diminuição na produção de celulose em comparação com a linhagem não transformada. De fato o meio sem acetona, tornou-se heterogêneo, diminuindo a aeração e a razão de oxigênio solúvel, o que mostra que a acetona tem importância no cultivo pela diminuição de viscosidade e conseqüente aumento da aeração e da difusão de substratos no meio. Estes exemplos mostram algumas das possibilidades a serem alcançadas pela biotecnologia atual, que em ritmo crescente, pode contribuir com novos avanços neste campo [48].

Perspectivas

A perspectiva para aumento da produção de celulose bacteriana pode levar à oportunidade de substituir a celulose oriunda do setor florestal, o que teria implicações econômicas, sociais e ambientais, mas uma adaptação gradual seria necessária para o atual setor, mesmo em se tratando de aplicações

específicas para a CB. Do ponto de vista ambiental e agropecuário grandes oportunidades surgiriam, devido à uma maior disponibilidade de terras agricultáveis ou espaço para reflorestamento com espécies nativas, com recuperação da fauna e flora [49]. Com isso um novo enfoque para produtos oriundos da biotecnologia de microorganismos seria dado, como o que ocorreu na década de 70 com o apoio governamental ao pró-álcool, têm-se hoje uma área em pleno desenvolvimento, com perspectivas internacionais e baseada na utilização de um microorganismo, a *Saccharomyces cerevisiae*, na produção de etanol, o mesmo pode ocorrer com a CB, que sob o apoio adequado, pode levar à um novo patamar de desenvolvimento tecnológico ao país.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro das agências Brasileiras CNPQ, CAPES e FAPESP

I. A. N. Donini, Denise T. B. De Salvi, F. K. Fukumoto, W. R. Lustri, H. S. Barud, R. Marchetto, Y. Messaddeq, S. J. L. Ribeiro. Biosynthesis and recent advances in production of bacterial cellulose.

Abstract: The present paper discusses the recent advances about the biosynthesis and production of bacterial cellulose (BC), from gram-negative, aerobic and acetic acid *Gluconacetobacter xylinus* (*Gx*). The BC differs from his vegetal pair, mainly due his feature of nanometric fibers, as opposed to micrometric feature of vegetal cellulose, are extruded through the cellular wall of *Gx*, thereby the macroscopic structure of BC is mechanically and physically more resistant, open big opportunities of biological and technological applications, apart from that obtained by vegetal cellulose. The actual challenge is in the grown of production of BC, which deals a superior understanding of his biosynthesis, to makes possible a later genetic-biochemical manipulation derived from recent advances in molecular biology. Are related works using the BC for production of composites and also what is being done of more actual with this biological material.

Keywords: Bacterial Cellulose; *Gluconacetobacter*; advances; biosynthesis.

Referências

- [1] M. Shoda, Y. Sugano, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 10 (1) (2005) 1.
- [2] J. L. Chávez-Pacheco, S. Martínez-Yee, M. Contreras-Zentella, E. Escamilla-Marván, *TIP.* 7 (2004) 26.
- [3] P. Ross, R. Mayer, M. Benziman, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 55 (1991) 35.
- [4] I. M. Saxena, R. Brown, *Ann. Bot.* 96 (2005) 9.
- [5] Y. Yamada, K. Hoshino, T. Ishikawa, *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 61 (1997) 1244.
- [6] A. J. Brown, *J. Chem. Soc.* 49 (1886) 432.
- [7] M. N. Belgacem, A. Gandini, *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, Elsevier, Amsterdam, 2008.
- [8] W. K. Czaja, D. J. Young, M. Kawecki, R. M. Brown Jr, *Biomacromolecules* 8 (2007) 1.
- [9] W. Czaja, A. Krystynowicz, S. Bielecki, R. M. Brown Jr, *Biomaterials* 27 (2006) 145.
- [10] D. Klemm, D. Schumann, U. Udhardt, S. Marsch, *Prog. Polym. Sci.* 26 (9) (2001) 1561.
- [11] R. Jonas, L. F. Farah, *Polym. Degrad. Stab.* 59 (1998) 101.

- [12] C. Legnani, C. Vilani, V. L. Calil, H. S. Barud, et al., *Thin Solid Films* 517(3)(2008) 1016.
- [13] L. C. de Santa Maria, A. L. C. Santos, P. C. Oliveira, H. S. Barud, et al., *Mater. Lett.* 63 (9-10)(2009) 797.
- [14] H. S. Barud, R. M. N. Assunção, M. A. U. Martinez, J. Dexpert-Ghys, et al., *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 46 (3) (2008) 363.
- [15] H. S. Barud, C. A. Ribeiro, M. S. Crespi, M. A. U. Martinez, et al., *J. Therm. Anal. Calorim.* 87 (2007) 815.
- [16] E. Chanliaud, M. J. Gidley, *Plant J.* 20 (1)(1999) 25.
- [17] C. J. Grande, F. G. Torres, C. M. Gomez, O. P. Troncoso, J. Martínez-Pastor. *Materials Science and Engineering: C.* 29, 4 (2009), 1098.
- [18] E. E. Brown, Washington State University, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). (2007) 125 p.
- [19] R. J. B. Pinto, P. Marques, M. A. Martins, C. P. Neto, T. Trindade, *J. Colloid. Interface Sci.* 312 (2)(2007) 506.
- [20] H. S. Barud, R. M. N. Assunção, M. A. U. Martinez, J. Dexpert-Ghys, et al., *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 46 (3)(2008) 363.
- [21] J. Cai, S. Kimura, M. Wada, S. Kuga, *Biomacromolecules.* 12, (2009) 87.
- [22] Barud, H. S. ; Legnani, C. ; Quirino, W. G. ; Caiu, J. M. A. ; Messaddeq, Y. ; Ribeiro, S. J. L.. *Revista Fapesp*, 164, (2009) 70.
- [23] I. Cleenwerck, M. De Wachter, A. Gonzalez, L. De Vuyst, P. De Vos, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59 (2009) 1771.
- [24] W. S. Williams, R. E. Cannon, *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (10)(1989) 2448.
- [25] M. Swissa, Y. Aloni, H. Weinhouse, M. Benizman, *J. Bacteriol.* 143(3)(1980) 1142.
- [26] A. Krystynowicz, M. Koziolkiewicz, A. Wiktorowska-Jeziarska, S. Bielecki, et al., *Acta Biochim. Pol.* 52 (3)(2005) 691.
- [27] A. G. Matthyse, S. White, R. Lightfoot, *J. Bacteriol.* 177 (4)(1995) 1069.
- [28] N. S. Han, J. F. Robyt, *Carbohydr. Res.* 313 (2) (1998) 125.
- [29] R. M. Brown Jr, I. M. Saxena, *Plant Physiol. Biochem.* 38 (1-2)(2000) 57.
- [30] S. Kawano, K. Tajima, H. Kono, T. Erata, et al., *J. Biosci. Bioeng.* 94 (3)(2002) 275.
- [31] I. M. Saxena, K. Kudlicka, K. Okuda, R. M. Brown, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 5735.
- [32] N. Hoenich, *BioResources.* 1(2)(2006) 270
- [33] Y. Amor, C. H. Haigler, S. Johnson, M. Wainscott, D. P. Delmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (20)(1995) 9353.
- [34] Y. Z. Wan, Y. Huang, C. D. Yuan, S. Raman, et al., *Mater. Sci. Eng. C*, 27 (4)(2007) 855.
- [35] H. Luo, G. Xiong, Y. Huang, F. He, et al., *Mater. Chem. Phys.* 110 (2-3)(2008) 193.
- [36] R. Jung, H. S. Kim, Y. Kim, S. M. Kwon, et al., *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* 46 (12)(2008) 1235.
- [37] Z. Yan, S. Chen, H. Wang, B. Wang, et al., *Carbohydr. Res.* 343 (1)(2008) 73.
- [38] A. Hirai, F. Horii, *ICR Annual Report*, 6 (1999) 28.
- [39] R. M. Brown, J. H. M. Willison, C. L. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73 (12)(1976) 4565.
- [40] M. Hornung, R. Biener, H. P. Schmauder, *Eng. Life Sci.* 9 (4)(2009) 342.
- [41] D. Klemm, B. Heublein, H. P. Fink, A. Bohn, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (22)(2005) 3358.
- [42] C. P. Santos, I. N. Reis, J. E. B. Moreira, L. B. Brasileiro, *Química Nova na Escola* 14 (2001) 3.
- [43] A. F. J. Bellote, H. D. da Silva, C. A. Ferreira, G. C. Andrade, *Bol. de Pesquisa Florestal, Colombo*, 37 (1998) 99.
- [44] R. L. G. Mattos, A. C. V. Valença, *BNDES Setorial, Rio de Janeiro*, 12 (2000) 93.
- [45] J. L. Gomide, J. L. Colodette, R. C. de Oliveira, C. M. Silva, *Revista Árvore*, 29 (1)(2005) 129.
- [46] D. R. Nobles, R. M. Brown, *Cellulose*, 15 (5)(2008) 691.
- [47] T. Ishida, Y. Sugano, T. Nakai, M. Shoda, *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 66 (8)(2002) 1677.
- [48] S. Valla, H. Ertesvag, N. Tonouchi, E. Fjaervik, *Bacterial cellulose production: Biosynthesis and applications*. Editor: B. H. A. Rehm, *Microbial production of biopolymers and polymer precursors*, Caister Academic Press, Norfolk, Reino Unido, (2009), 43.
- [49] T. L. Juvenal, R. L. G. Mattos, *BNDES Setorial, Rio de Janeiro*, 16 (2002) 3.
- [50] A. Hirai, M. Tsuji, H. Yamamoto, F. Horii, *Cellulose*, 5 (3)(1998) 201.
- [51] C. H. Haigler, R. M. Brown, M. Benziman, *Science*, 210 (4472)(1980) 903.
- [52] J. R. Colvin, D. E. Witter, *Protoplasma*, 116 (1)(1983) 34.
- [53] S. Bae, M. Shoda, *Biotechnol. Prog.* 20 (5)(2004) 1366.
- [54] S. O. Bae, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67 (1)(2005) 45.
- [55] A. Shirai, M. Takahashi, H. Kaneko, S. I. Nishimura, et al., *Int. J. Biol. Macromol.* 16 (1994) 297.
- [56] O. M. Astley, E. Chanliaud, A. M. Donald, M. J. Gidley, *Int. J. Biol. Macromol.* 32 (1-2)(2003) 28.
- [57] X. Yu, R. H. Atalla, *Int. J. Biol. Macromol.* 19 (2)(1996) 145.
- [58] S. K. Cousins, R. M. Brown, *Polymer*, 38 (4)(1997) 897.
- [59] T. Iwata, L. Indrarti, J. I. Azuma, *Ceulose*, 5 (3) (1998) 215.
- [60] C. Tokoh, K. Takabe, M. Fujita, H. Saiki, *Cellulose*, 5 (4) (1998) 249.
- [61] S. E. C. Whitney, M. G. E. Gothard, J. T. Mitchell, M. J. Gidley, *Plant Physiol.* 121 (1999) 657.
- [62] K. Doman, Y. M. Kim, M. R. Park, D. H. Park, *J. Microbiol. Biotechnol.* 9 (6)(1999) 704.
- [63] G. Joseph, G. E. Rowe, A. Margaritis, W. Wan, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78 (9)(2003) 964.
- [64] S. Yamanaka, J. Sugiyama, *Cellulose*, 7 (3)(2000) 213.
- [65] D. N. Thompson, M. A. Hamilton, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91 (9)(2001) 503.
- [66] M. Seifert, S. Hesse, V. Kabrelian, D. Klemm, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 42 (3)(2003) 463.
- [67] S. Bae, Y. Sugano, M. Shoda, *J. Biosci. Bioeng.* 97 (1) (2004) 33.

- [68] S. E. C. Whitney, E. Wilson, J. Webster, A. Bacic, et al., *Am. J. Bot.* 93 (2006) 1402.
- [69] E. E. Brown, M. P. G. Laborie, *Biomacromolecules*, 8 (2008) 3074.
- [70] L. L. Zhou, D. P. Sun, L. Y. Hu, Y. W. Li, J. Z. Yang, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34 (7) (2007) 483.
- [71] M. Phisalaphong, N. Jatupaiboon, *Carbohydr. Polym.* 74 (3) (2008) 482.
- [72] A. Kurosuni, C. Sasaki, Y. Yamashita, Y. Nakamura, *Carbohydr. Polym.* 76 (2) (2009) 333.
- [73] M. Pomet, J. Juntaro, J. Y. Y. Heng, A. Mantalaris. *Biomacromolecules*, 9 (6) (2008) 1643.
- [74] H. Son, M. Heo, Y. Kim, S. Lee. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 33 (2001) 1.
- [75] J. W. Hwang, Y. K. Yang, J. K. Hwang, Y. R. Pyun and Y. S. Kim. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 88 (2) (1999) 183.
- [76] N. Suwannapinunt, J. Burakorn, S. Thaenthancee, S. Suranaree *J. Sci. Technol.* (2007) **14(4), 357**.
- [77] Joris, K., PhD thesis, University of Gent, Belgium, 1993.
- [78] E.J. Vandamme, S. De Baets, A. Vanbaelen, K. Joris, *P. De Wulf. Polymer Degradation and Stability*, 59 (1998) 93.

Anexo 1 - Adições “in situ” durante o cultivo de *Gluconacetobacter xylinus*.

BACTÉRIA	MEIO (COMPOSIÇÃO)	Condições	SUPLEMENTOS(S)	RESULTADOS	Referencia(S)
<i>G. xylinus</i>	-	-	Carboximetilcelulose	In vivo a gênese das fitas é diferente da formação da fita padrão. Fibrilas de pequeno diâmetro e consequentemente fitas de menor espessura. Agregados e película apresentam birrefringência, sobreposta e entrecruzada camadas de celulose contendo fibrilas orientadas paralelamente	[50] [51-53], [33], [54]
<i>G. xylinus</i>	-	-	fosfoglicomanana	Orientação das fibrilas em paralelo e retardo da agregação das fibrilas	[53]
<i>G. xylinus</i>	Calcofluor	-	Calcofluor White S1	Modificação da celulose pela ausência da união das fibrilas impedindo a cristalização, no entanto, a membrana torna se cristalina no estado seco	[51]
<i>G. xylinus</i>	-	-	Hidroxietilcelulose metilcelulose	In vivo, alteração da formação das fitas ; modificação do tamanho das fibras e diâmetro menor	[50]
<i>G. xylinus</i>	-	-	Congo Red	Diminuiu a produção das fitas de CB no meio de cultura	[52]
<i>G. xylinus</i>	Hestrin-Schramm	28° C por 7 dias em condições estáticas e sob agitação	N-acetilglicosamina (GlcNAc) e alguns sais de amônio.	Resultados satisfatórios utilizando 1.4% glicose e 0.6% GLENAC	[55]
<i>G. xylinus</i>	-	-	Xilana	A largura das fitas diminui devido ao controle da agregação das subunidades de fibrilas	[53]
<i>G. xylinus</i>	Hestrin-Schramm	-	Xiloglucana	Modificação do tamanho das fibrilas e aumento da extensibilidade numa única direção	[53], [33],[50], [56]
<i>G. xylinus</i>	-	-	2,6-diclorobenzonitrila (DCB), um herbicida que em determinadas concentrações, inibe a biossíntese de CB	Produção de celulose II na presença de DCB 12 µM	[57]
<i>G. xylinus</i>	-	-	Tinopal	Intensifica as forças de Van der Waals na etapa inicial de cristalização da celulose	[58]

Anexo 1 - continuação

BACTÉRIA	MEIO (COMPOSIÇÃO)	Condições	SUPLEMENTO(S)	RESULTADOS	Referência(S)
<i>G. xylinus</i>			Complexos lignina-carboidratos, polissacarídeos hemicelulósicos, glicuronoxilana, arabinogalactana	Modificação da cristalinidade e resistência da CB com relação ao tratamento com bases fortes	[59]
<i>G. xylinus</i> ATCC 10245	Hestrin-Schramm		0,2% acetil glicomanana (w/v) extraída da pinha	A presença de acetil glicomanana causa uma modificação das fibras tornando a rede mais frouxa, além da diminuição da fase Ia. Estes resultados são semelhantes utilizando CMC ou xiloglucana	[60]
<i>G. xylinus</i> ATCC 53524	-	-	Glicomanana, galactomanana	Indução da coalescência das fibrilas e redução drástica da cristalinidade	[61]
<i>G. xylinus</i> ATCC 10821	-	-	Dextrana e sacarose alternasacarose	Produção de celulose bacteriana solúvel e com uma nova estrutura	[62]
<i>G. xylinus</i> ATCC 53524	Hestrin-Schramm	pH 6,2 a 30 °C a 50 rpm	Pectina (0,5%) com diferentes concentrações de cálcio	Há pouca afinidade da celulose com a pectina. Este fato explica a formação da camada média das plantas ricas em pectina e pobres em celulose. A rigidez e persistência nas propriedades mecânicas são devido às fibrilas de celulose mesmo na presença considerável da quantidade de pectina e cálcio	[16, 63]
<i>G. aceti</i> AJI 2368	Modificado	-	Tenamicina e meclimama	Síntese de fitas finas comparando com a CB pura	[64]
<i>G. xylinus</i> 10821 e <i>G. xylinus</i> 23770	Hestrin-Schramm	pH 5,0 a 30°C por 14 dias	Clorofenicol e Ácido nalidixico	Síntese de fitas grossas e maiores comparando com CB pura	[64]
<i>G. xylinus</i> BPR 2001	Naritomi modificado: frutose, CSL	pH 5 sob agitação a 175 rpm e biorreatores por 7 dias a 28 °C	Efluentes alimentícios	Ambas as bactérias produzem celulose em todos os suplementos utilizados. A bactéria 23770 produziu 17% a mais de celulose em comparação como meio controle	[65]
			Poliacrilamida 0 - 3 %	Formação de estêras de CB com diferentes tamanhos	[63]

Anexo 1 - continuação

BACTÉRIA	MEIO (COMPOSIÇÃO)	Condições	SUPLEMENTO(S)	RESULTADOS	Referência(S)
<i>G. xylinus</i>	Hestrin-Schramm	Estático por 14 dias	CMC, PVA, MC: 0,5%, 1% e 2% (w/v)	Produção de flocos e aumento na produção de CB. O material obtido apresenta uma estrutura porosa e ocorre um aumento da capacidade de absorção de água (potem não é proporcional com o aumento da quantidade de CMC ou MC adicionada ao meio). Tais resultados são obtidos utilizando 0,5 % de MC, 2% de CMC e 0,5% de PVA	[66]
<i>G. xylinus</i> BPR 2001 e EPI	CLS, Frutose, solução de vitaminas	Estático	Agar 0 - 1%(w/v)	BPR 2001: produção de CB de 8,0 g/l para 12,8 g /L com 0,4% de Agar. EPI: de 11,6 g/l para 5,5 g/l com 0,6% de agar. A produtividade está associada com o aumento da viscosidade do meio ocasionada pelo acetan (def: polímero similar a xantana, constituído de uma cadeia alternada de resíduos de glicose com uma cadeia pentasacárida)	[67]
<i>G. xylinus</i> BPR 2001	CLS, frutose	-	Melaço	O melaço pode ser utilizado a uma concentração menor que 20 g/l para a produção de CB. Para a produção de CB é essencial a presença de frutose em qualquer proporção	[54]
<i>G. xylinus</i> ATCC 53524	Hestrin-Schramm	30 ° C por 48 horas, estático e agitação a 50 rpm	Xiloglucana (0,5%)	Culturas estáticas resultaram maior incorporação de xiloglucana aos compostos. Há uma alteração na razão entre as fases Ia e Ib. Menor a massa molecular da xiloglucana utilizada, menor a quantidade incorporada nos compostos. Quanto maior o peso molecular maior o entrecruzamento	[68]

Anexo 1 - continuação

BACTÉRIA	MEIO (COMPOSIÇÃO)	Condições	SUPLEMENTO(S)	RESULTADOS	Referência(S)
<i>G. xylinus</i> ATCC 23769	Hestrin-Schramm	Estático e sob agitação a 500 rpm a 29° C por 7 dias	Polióxido de etileno (PM 10 ⁵ g/mol) de 0,5%, 1%, 2%, 3% e 5%(w/w).	As nanofibras de CB tornam-se menores por se agregarem em largas fitas. Há uma diminuição do ponto de fusão dos compostos ocasionado pelo depósito da PEO bem como outro fator que contribui são restos celulares (bactérias). A PEO também favorece a fase cristalina correspondente a fase β em relação à α da CB. O tratamento da CB é realizada com água ao invés de NaOH e não é eficiente para a remoção dos debris celulares somente na remoção de restos de meios de cultura. A lavagem com água, no entanto remove a PEO	[69]
<i>G. xylinus</i> NUST4.1	Glicose, sacarose, CSL, (NH ₄) ₂ SO ₄ , KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ ·7H ₂ O com	pH 6,0 a 29°C	Algnato de sódio de 0 a 0,1%(w/v)	Frascos sob agitação: ocorre um aumento da produção de 3,7g/l para 6,0 com 0,04% de NaAlg. Realizado em bioreatores: de 1,09 g/l para 1,7g/l com 0,04% de NaAlg. apresenta uma estrutura porosa e presença de partículas (NaAlg) em sua superfície. Ocorre também uma diminuição da fase α e a cristalinidade da CB que não aumenta com a adição de algnato por que há aumento na viscosidade do meio	[70]
<i>G. xylinus</i> isolada da nata de coco	Água de coco, sacarose, sulfato de amônio, ácido acético	Estático por 5 dias	Quitosana de peso molecular de 30 e 80 com grau de acetilação de 0,85	Quitosana deve ser utilizada a uma concentração < 75%(w/v), ou pode ocorrer inibição na produção. Aumento na densidade das fibras (não forma poros). Aumento da resistência mecânica e da capacidade de retenção hídrica proporcionais à quantidade de quitosana utilizada. Não apresenta atividade antibactericida. Não alterou a cristalinidade da CB	[71]

Anexo 1 - continuação

BACTÉRIA	MEIO (COMPOSIÇÃO)	Condições	SUPLEMENTO(S)	RESULTADOS	Referência(S)
<i>G. xylinus</i> NBRC13693	controle; Hestrin-Seltramm meio II; sucos de frutas; meio III sucos de frutas com fontes de nitrogênio	pH 6,0	sucos de laranja, pera, japonesa, uva, abacaxi e maçã filtrados e esterilizados	Produção de CB com todos os sucos porem com melhores resultados com a laranja. De vários componentes da laranja foi possível obter CB; de 100g de laranja obteve-se 0,65g/l de CB (peso seco)	[72]
<i>G. xylinus</i> X-2	0,3%(w/w) de chá verde; 5 % (w/w) de sacarose;	—	2,2%(w/v) de colágeno tipo I	Alteração da estrutura cristalina da CB. Nanofibrilas de maior diâmetro e aspecto poroso	[35]
<i>G. xylinus</i> BPR 2001	Meio H-S modificado (substituição de glicose por frutose)	Agitação a 150 rpm a 30°C por 7 dias	Fibras naturais como o sisal	Ocorre deposição das nanofibrilas de CB sobre as fibras naturais dispostas de forma randômica. Isto por que ambos contem grande quantidade de grupos OH. Para melhorar a interação entre os dois polímeros as fibras eram previamente tratadas com acetona que removeia os compostos hidrofóbicos para facilitar a penetração da CB. No entanto observa uma diminuição da força e modulo de Young resultado da separação das fibras, resultando em uma estrutura não coesiva. Nos bioreatores ocorre deposição de CB no interior das fibras, oposto do ocorre nos frascos sob agitação, na qual há o depósito na superfície das fibras naturais	[73]