



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

**RODRIGO MELO BEZERRA DE ALBUQUERQUE**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA BLENDAS  
BIODEGRADÁVEL À BASE DE CELULOSE  
BACTERIANA (CB) E POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)  
PARA APLICAÇÃO COMO EMBALAGEM ATIVA  
PARA ALIMENTOS**

Recife

2019

**RODRIGO MELO BEZERRA DE ALBUQUERQUE**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA BLENDA  
BIODEGRADÁVEL À BASE DE CELULOSE  
BACTERIANA(CB) E POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)  
PARA APLICAÇÃO COMO EMBALAGEM ATIVA  
PARA ALIMENTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo

Co- orientadoras: Profa. Dra. Andrea Fernanda de Santana Costa e Profa. Dra. Raquel Diniz Rufino

**Recife**

**2019**

Albuquerque, R. M. B.

**Desenvolvimento de uma blenda biodegradável à base de celulose bacteriana (CB) e polihidroxibutirato (PHB) para aplicação como embalagem ativa para alimentos, 2019. 129p.**

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2019.

1. Celulose bacteriana; 2. Polihidroxibutirato; 3. Embalagens ativas; 4. Compósitos; 5. biocompatibilidade; 6. Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Centro de Ciências e Tecnologia.

**DESENVOLVIMENTO DE UMA BLENDAS BIODEGRADÁVEL  
À BASE DE CELULOSE BACTERIANA (CB) E  
POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) PARA APLICAÇÃO COMO  
EMBALAGEM ATIVA PARA ALIMENTOS**

**RODRIGO MELO BEZERRA DE ALBUQUERQUE**

**Examinadores:**

---

**Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo (Orientadora)**  
**Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP**

---

**Prof. Dr. Marcos Barbosa Lima (Membro Interno)**  
**Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP**

---

**Profa. Dra. Glória Maria Vinhas (Membro Externo)**  
**Universidade Federal de Pernambuco - UFPE**

Defendida em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Coordenadora: Prof. Dra. Galba Maria de Campos Takaki**

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais Ana Maria Queiroz Bezerra de Melo e Ronaldo Bezerra de Albuquerque que sempre acreditaram nos meus sonhos. Aos pais que a vida me deu Edna Maria Ferreira da Silva e José Carlos da Silva (*in memoriam*) por abrirem sua porta quando menos esperava. À minha irmã Amanda Melo Bezerra de Albuquerque por toda serenidade nos momentos difíceis. À minha esposa Ana Barbara Emília Gomes Melo, minha maior incentivadora.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a realização de alguns dos meus sonhos. Pela permissão de falhar e aprender para evoluir como ser humano. Por Sua voz “invisível” que sempre ecoou dentro do meu peito, não permitindo que eu desistisse.

À minha Orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leonie Asfora Sarubbo, por toda sabedoria em gerir as dificuldades encontradas no caminho com muita paciência. Tenho a convicção de que jamais chegaríamos nesse ponto sem a sua competência.

Às Profas. Dras. Andrea Fernanda de Santana Costa e Raquel Diniz Rufino pela valiosa colaboração e apoio durante o desenvolvimento experimental da pesquisa.

À Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki, Coordenadora do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais da UNICAP pelo atendimento prestado.

À 12<sup>a</sup> turma do mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais da UNICAP pelo companheirismo e amizade.

Ao Reitor da UNICAP, Pe. Pedro Rubens Ferreira de Oliveira, S. J. pela oportunidade em desenvolver este trabalho nesta universidade.

À Profa. Dra. Glória Maria Vinhas pela disponibilização do laboratório de Materiais Poliméricos do Departamento de Engenharia Química da UFPE e pelo direcionamento das análises a serem realizadas.

Ao colega Ivo Diego de Lima Silva, do Departamento de Engenharia Química da UFPE, pela disponibilidade em colaborar com o desenvolvimento dos experimentos com o PHB.

À Dra. Fabíola Carolina Gomes de Almeida e aos colegas Hugo Morais Meira e Cláudio José Galdino da Silva Júnior pela colaboração com o desenvolvimento dos experimentos.

Ao técnico Lucas Ferreira da Costa, dos laboratórios da UNICAP, pela paciência e ajuda conferida ao longo do Mestrado.

Ao Prof. Dr. Marcos Lima Barbosa pelas análises no MEV do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da UNICAP.

Ao técnico e colega Msc. Elias José da Silva, do Departamento de Química

Fundamental da UFPE, pelas análises de caracterização das blendas.

A todos os colegas do grupo de pesquisa da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leonie Asfora Sarubbo e, em especial, a Hugo Morais Meira, por compartilhar seus conhecimentos ao longo desta pesquisa.

Ao Sr. Eduardo Brondi, da Biocycle PHB Industrial S.A., pela gentileza em fornecer o PHB para o desenvolvimento do projeto.

À Maria Isabel Silveira e ao Sr. Alan Dela Líbera, por providenciar o transporte do PHB da cidade de Serrana, em São Paulo, até Recife.

Ao CNPq, CAPES, FACEPE e FINEP pelo suporte financeiro aos laboratórios do Centro de Ciências e Tecnologia da UNICAP.

Aos meus Pais Ana Maria e Ronaldo Bezerra por toda educação dada e pelas lições de vida me tornando cada vez mais forte. Agradeço também pelo respeito e apoio em todas as minhas decisões. À minha irmã que sempre foi a minha face de calma quando chegavam os meus desesperos.

À minha esposa Ana Bárbara por toda paciência, pois nos momentos mais difíceis foram suas palavras e atenção que me fizeram não desistir. Obrigado por me compreender com todo seu amor.

Aos meus amigos que me incentivavam sempre, em especial a Bruno César, que fazia questão de escutar sobre meu trabalho e problemas encontrados.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS .....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT .....	14
CAPÍTULO I .....	15
1. INTRODUÇÃO .....	16
2. OBJETIVOS .....	19
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos Específicos.....	19
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1. EMBALAGENS ATIVAS.....	20
3.2. POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS.....	21
3.2.1. Celulose bacteriana (CB).....	26
3.2.1.1. Resíduos industriais utilizados na produção de CB.....	32
3.2.1.2. Influência das condições de cultivo na produção de CB.....	33
3.2.1.3. Recuperação e purificação da CB.....	36
3.2.1.4. Blendas e compósitos de CB.....	37
3.2.2. Polihidroxialconoatos (PHAs)/ Polihidroxibutirato (PHB).....	422
3.3. BLENDEAS DE CB E PHB.....	46
3.3.1. Blendas formadas por microcristais/nanofibras de CB .....	48
3.3.2. Síntese in situ e ex situ de blendas de CB/PHB.....	49
3.4. ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO DA ÍNDIA.....	Erro! Indicador não definido.
3.5. PERSPECTIVAS DAS BLENDEAS DE CB E PHB PARA USO INDUSTRIAL.....	52
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
CAPÍTULO II.....	71
<i>ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO JOURNAL OF FOOD ENGINEERING</i> .....	72
RESUMO.....	73
1. Introdução .....	744
2. Materiais e métodos .....	766
2.1. ....	766
.....	766
2.2. ....	766
.....	766

2.3. Meio de crescimento e manutenção padrão do micro-organismo	766
2.4. Meio de produção da celulose	766
2.5. Preparo do pré-inoculo	766
2.6. Preparo do inóculo e condições de cultivo	777
2.7. Lavagem e purificação da película de CB	77
2.8. Preparação da blenda de CB e PHB por dissolução	77
2.9. Incorporação do óleo essencial de Cravo da Índia à blenda	77
2.10. Permeabilidade ao óleo	77
2.11. Flexibilidade	78
2.12. Solubilidade em água	78
2.13. Atividade antimicrobiana da blenda de CB/PHB contendo óleo essencial	78
2.14. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	78
2.15. Propriedades mecânicas	78
2.16. Difractometria de Raio-X (DRX)	79
2.17. Análise termogravimétrica	79
2.18. Reflectância total atenuada e espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (ATR/FTIR)	79
2.19. Análises estatísticas	79
3. Resultado e discussão	80
3.1. Rendimento das membranas de CB	80
3.2. Permeabilidade ao óleo, flexibilidade e solubilidade em água	80
3.3. Caracterização das blendas de CB/PHB contendo óleo essencial	81
3.4. Caracterização das blendas de CB/PHB por MEV	81
3.5. Atividade antimicrobiana da blenda de CB/PHB contendo óleo essencial	82
3.6. Ensaio Mecânicos	83
3.7. Difractometria de Raio-X (DRX)	84
3.8. Análise Termogravimétrica (TGA)	86
3.9. Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR)	87
Conclusões	89
Agradecimentos	90
Referências	90
5. REFERÊNCIAS	91
CAPÍTULO III	94
CONCLUSÕES GERAIS	955



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1</b>	Polímeros biodegradáveis .....	24
<b>Figura 2</b>	Estrutura química da cadeia $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)-glicana (celulose) e as ligações de hidrogênio intramolecular e intermolecular de celulose.....	27
<b>Figura 3</b>	(a) CV tem um aspecto fibroso e (b) CB assemelha-se a um gel.....	29
<b>Figura 4</b>	Estrutura geral dos PHAs.....	43

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1</b>	Coloração do filme de CB e da blenda de CB/PHB.....	78
<b>Figura 2</b>	Micrografia eletrônica de varredura do filme seco de CB (a); filme seco de PHB (b) e da blenda de CB/PHB (c). Magnitude: 1500x.....	79
<b>Figura 3</b>	Crescimento de <i>E. coli</i> em amostras da blenda de CB/PHB contendo óleo de cravo em função do tempo. Amostras da blenda sem o óleo essencial e o do meio de cultivo foram usadas como controle.....	80
<b>Figura 4</b>	Tensão Máxima (MPa) e Alongamento (%) das amostras de PHB, de CB, da blenda de CB/PHB e da blenda impregnada com óleo de cravo (CB/PHB/OEC).....	81
<b>Figura 5</b>	DRX das amostras de PHB, de CB, da blenda de CB/PHB e da blenda impregnada com óleo de cravo (CB/PHB/OEC).....	83
<b>Figura 6</b>	TGA das amostras de PHB, de CB, da blenda de CB/PHB e da blenda impregnada com óleo de cravo (CB/PHB/OEC).....	84
<b>Figura 7</b>	Espectros de PHB, de CB, da blenda de CB/PHB e da blenda impregnada com óleo de cravo (CB/PHB/OEC).....	86
<b>Figura 8</b>	Representação gráfica da Análise de Componentes Principais do PHB, da CB, da blenda de CB/PHB e da blenda de CB/PHB impregnada com óleo de cravo (CB/PHB/OEC).....	87

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1</b>	Classificação dos tipos de plásticos (ASTM 6400-04) .....	23
<b>Tabela 2</b>	Produtores industriais de alguns polímeros biodegradáveis e suas aplicações.....	25
<b>Tabela 3</b>	Propriedades mecânicas da CB em relação a outros materiais.....	28
<b>Tabela 4</b>	Bactérias, fontes de carbono, suplementos, tempo de cultivo e rendimentos em celulose bacteriana.....	35
<b>Tabela 5</b>	Blendas de celulose bacteriana e áreas de aplicação.....	41

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1</b>	Dados de decomposição térmica das amostras de PHB, de CB, da blenda de CB/PHB e da blenda impregnada com óleo de cravo (CB/PHB/OEC) obtidos a partir das curvas de TGA.....	85
-----------------	---	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CB – Celulose bacteriana  
CRA - Capacidade de retenção de água  
CV – Celulose vegetal  
DRX - Difractometria de Raio-X  
FTIR - Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier  
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura  
OEC - Óleo essencial de Cravo  
PBS - Poli(butileno succinato) (PBS))  
PBSA - Adipato de polibutileno succinato  
PCL - Poli( $\epsilon$ -caprolactonas)  
PCL - Policaprolactona  
PE - Polietileno  
PEG - Polietilenoglicol  
PET - Politereftalato de etileno ou polietileno tereftalato  
PGA - Poliglicolídeo  
PHA – Polihidroxialcanoato  
PHB – Polihidroxibutirato  
PHH - Polihidroxihexanoato  
PHO - Poli-hidroxioctanoato  
PHV - Polihidroxivalerato  
PLA - Polilactato ou poliácido lático  
PP - Polipropileno  
PS - Poliestireno  
PTFE - Politetrafluoretileno  
PVA - Acetato de polivinila  
PVC - Policloreto de vinila  
TAA - Taxa de absorção de água  
TGA - Análise termogravimétrica  
TLA - Taxa de liberação de água

## RESUMO

A crescente necessidade de preservação ambiental aumenta e intensifica o uso de recursos renováveis na obtenção de filmes poliméricos como embalagens para manter e/ou melhorar a qualidade dos alimentos. Nesse contexto, blendas à base dos polímeros de celulose e polihidroxialcanoatos (PHA) são candidatas em potencial para essa finalidade devido às propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade. A celulose é um dos polímeros naturais mais abundantes na terra e é produzida principalmente por plantas, embora muitas bactérias, especialmente as pertencentes ao gênero *Gluconacetobacter*, produzam uma forma muito peculiar de celulose com propriedades mecânicas e estruturais que podem ser exploradas em numerosas aplicações industriais. O polihidroxibutirato (PHB), por sua vez, é um polímero biodegradável bacteriano com propriedades termoplásticas que o tornam um candidato em potencial para a substituição de polímeros não degradáveis. Nesse sentido, no presente trabalho, membranas de CB foram produzidas pela bactéria *Gluconacetobacter hansenii* UCP 1619 usando o meio padrão Hestrin-Schramm (HS) modificado, contendo 1,5% de glicose e 2,5% de milhocina. Após a purificação da membrana de CB, uma blenda à base de CB e PHB foi preparada a partir da combinação entre membranas de CB puras com 30% de PHB em ácido acético. Em seguida, o óleo essencial de cravo foi adicionado como agente antimicrobiano. As blendas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, difração de raios X, análise térmica e ensaios mecânicos. As análises por microscopia eletrônica de varredura revelaram um revestimento homogêneo da superfície CB por deposição do PHB. Outras análises como permeabilidade do óleo, flexibilidade e solubilidade em água também foram realizados e demonstraram a melhoria do material obtido pela mistura dos dois polímeros. A adição do óleo essencial reduziu substancialmente o crescimento microbiano e melhores propriedades mecânicas e térmicas na blenda foram observadas frente à membrana de CB pura. O novo material, composto por uma blenda de CB e PHB, aditivada com óleo de cravo pode encontrar aplicações importantes como embalagem ativa para alimentos, considerando as propriedades atrativas da blenda e sua natureza biodegradável, como embalagem biocompatível e eficiente para uso industrial na indústria alimentícia.

**Palavras-chave:** Celulose bacteriana; *Gluconacetobacter hansenii*; resíduos industriais; PHB; óleos essenciais; biocompósitos; blendas; embalagens ativas para alimentos.

## ABSTRACT

The increasing need for environmental preservation increases and intensifies the use of renewable resources in obtaining polymer films as packaging to maintain and / or improve food quality. In this context, blends based on cellulose polymers and polyhydroxyalkanoates (PHA) are potential candidates for this purpose due to the properties of biodegradability and biocompatibility. Cellulose is one of the most abundant natural polymers on earth and is mainly produced by plants, although many bacteria, especially those belonging to the genus *Gluconacetobacter*, produce a very peculiar form of cellulose with mechanical and structural properties that can be exploited in numerous industrial applications. Polyhydroxybutyrate (PHB), in turn, is a biodegradable bacterial polymer with thermoplastic properties that make it a potential candidate for the substitution of non-degradable polymers. In this sense, BC membranes were initially produced by the bacterium *Gluconacetobacter hansenii* UCP 1619 using standard Hestrin-Schramm (HS) modified medium containing 1.5% glucose and 2.5% corn steep liquor. After purification of the BC membrane, a BC and PHB-based blends was prepared from the combination of pure BC membranes with 30% PHB in acetic acid. Then the clove essential oil was added as an antimicrobial agent. The blends were characterized by scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, X-ray diffraction, thermal analysis and mechanical testing. Scanning electron microscopy revealed a homogeneous coating of the BC surface by deposition of PHB. The new blends can find important applications, since better mechanical properties were observed in front of the pure BC membrane. Studies of permeability, flexibility, retention and water absorption were also performed. The addition of the essential oil substantially reduced the microbial growth and better mechanical properties in the blend were observed against the pure BC membrane. The new material, composed of a BC and PHB blend, added with clove oil can find important applications as an active food packaging, considering the attractive properties of the blend and its biodegradable nature, as a biocompatible and efficient packaging for industrial use in the food industry

**Keywords:** bacterial cellulose, *Gluconacetobacter hansenii*; industrial waste; PHB; essential oils; biocomposites; blends; food active packaging.

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUÇÃO

As embalagens de alimentos são essenciais para a contenção de produtos, proteção, preservação, conveniência, para fornecer informações sobre o produto e comunicar a marca, entre outros (FERREIRA et al., 2016). No entanto, o problema crucial da utilização de plásticos para a embalagem é o resíduo pós-consumo, uma vez que a embalagem é, de longe, o maior contribuinte (63%) de resíduos plásticos (GREEN FACTS, 2011). Além disso, alguns materiais são difíceis de reutilizar e estima-se que menos de 14% dos materiais de embalagem plásticos sejam recicláveis (TUMWESIGYE et al., 2016).

Uma vez que a maior parte dos materiais utilizados não são biodegradáveis e permanecem no ambiente durante longos períodos de tempo, continuam a constituir ameaças para a saúde humana e para o ambiente (PLASTICS EUROPE, 2015a).

Dentre a possibilidade de fornecimento de novos materiais biodegradáveis para uso em embalagens, destaca-se a celulose. A celulose é um polímero natural produzido por plantas (GOMES et al., 2013; COSTA et al., 2017; RECOUVREUX, 2008).

O aumento da demanda de derivados de celulose vegetal (CV), por outro lado, aumentou o consumo de madeira como matéria-prima, causando desmatamento e questões ambientais globais (PARK et al., 2003). Embora as plantas sejam as maiores fontes de celulose, vários tipos de bactérias são capazes de produzir celulose como fonte alternativa.

O polímero linear da celulose é fortemente associado devido às ligações de hidrogênio. A formação das fibras do polímero ocorre devido às interações intermoleculares geradas entre as cadeias, e as interações intramoleculares por sua vez garantem a rigidez da estrutura (COSTA et al., 2017). A fórmula molecular da CB é a mesma da celulose vegetal, porém, suas propriedades físicas e químicas são diferentes. O polímero microbiano leva vantagem sobre o vegetal pois pode ser obtido com maior pureza, por possuir maiores graus de polimerização e cristalinidade, maior força de tensão e maior capacidade de armazenamento de água. As fibrilas de celulose bacteriana são aproximadamente 100 vezes mais finas do que a celulose oriunda de plantas (CHAWLA et al., 2009), o que a torna um material altamente poroso com capacidade para ser utilizado no tratamento de feridas, por atuar como barreira física e por permitir a transferência de antibióticos e outras substâncias (HUNGUND, GUPTA; 2010).

A celulose bacteriana apresenta elevada pureza, uma vez que não está associada com outros componentes, tais como a lignina e a hemicelulose da CV, e devido à sua rede nanofibrillar em 3D, mostra capacidade de absorção de água (a membrana inicial possui aproximadamente 99% de água) e alta resistência à tração (COSTA et al., 2017). Essas propriedades singulares, em conjunto com outras características, como biocompatibilidade e biodegradabilidade, resultam no caráter renovável e em uma ampla gama de aplicações na área biomédica e em vários outros domínios tecnológicos, tais como membranas para

dispositivos de áudio, papel eletrônico e como material de reforço em nanocompósitos transparentes/translúcidos (WU; LIU, 2012). A CB também tem sido sugerida na produção de embalagens, tecidos, alimentos saudáveis, cosméticos, produtos farmacêuticos, reforço de papéis de alta qualidade, diafragmas para transdutores eletroacústicos, revestimentos, reforço para filmes óticamente transparentes, entre outros (LI et al., 2015; PECORARO et al., 2008; WANG et al. 2011; KLEMM et al., 2005; DONINI et al., 2010).

O meio padrão utilizado para o cultivo de CB, o meio Hestrin-Schramm (HS), descrito em 1954, tem um elevado custo, pois requer a suplementação de glicose, extrato de levedura e peptona para o cultivo (COSTA et al., 2017). Considerando que o meio de fermentação representa 30% do custo total de um processo fermentativo, este desempenha um papel crítico nas fermentações microbianas. Assim, a utilização de meios de cultura alternativos e de baixo custo torna-se fundamental na redução dos custos globais e na obtenção de um maior rendimento em CB vislumbrando sua aplicação industrial.

Novas fontes de carbono que atendam às necessidades de alto rendimento de celulose e de baixo custo devem ser encontradas para a produção da CB (ÇAKAR et al., 2014). A produção de CB a partir de resíduos agrícolas e resíduos industriais, que incluem resíduos de alimentos, palha de trigo, resíduos de frutas, resíduos de glicerol e resíduos de têxteis à base de algodão tem sido demonstrado. A vantagem em usar resíduos agrícolas ou industriais não só fornece uma maneira barata de produzir a CB, mas também funciona como uma proposta ambiental (LI et al., 2015). Além disso, a utilização de tais materiais residuais não só melhora a sustentabilidade da produção de celulose por micro-organismos, mas também diminui a poluição ambiental associada ao descarte de resíduos industriais.

A despeito das características atrativas da CB, a falta de propriedades antibacterianas, antioxidantes e magnéticas, por exemplo, limita sua aplicação em algumas áreas. Como resultado, inúmeras blendas e compósitos de CB vem sendo sintetizados para superar suas limitações e aumentar suas aplicações. Blendas de CB conferem propriedades antimicrobianas, cicatrizantes, condutoras, magnéticas e ópticas para CB (SHAH et al., 2013).

As blendas formadas por polímeros biodegradáveis utilizados como embalagem, obtidos a partir de recursos renováveis, representam uma alternativa aos plásticos derivados do petróleo, uma vez que sua degradação conduz a resíduos não tóxicos ou não prejudiciais para o ambiente. No entanto, muitos desses polímeros utilizados em embalagens são pobres em propriedades mecânicas e térmicas. Para superar essas limitações, uma alternativa promissora tem sido a produção de bio-nanoblendas. Estes materiais apresentam barreiras reforçadas, mecânicas e térmicas devido ao seu tamanho nanométrico (URBINA et al., 2016). Nesse sentido, a combinação da CB como os polímeros poli-hidroxialcanoatos (PHA) surge como alternativa promissora no fornecimento de embalagens.

Os poli-hidroxicanoatos (PHA) são uma família de biopolímeros intracelulares biodegradáveis sintetizados obtidos por fermentação microbiana como grânulos intracelulares de armazenamento de carbono e energia. Entre a família dos polímeros de PHA, o poli-3-hidroxicaproatato (PHB) é produzido pela *Ralstonia eutropha*. O PHB é um polímero biocompatível, biodegradável e termoplástico, com as propriedades do tipo plástico oferecendo a possibilidade de substituição potencial de polímeros não degradáveis atualmente usados como polietileno e polipropileno. PHB tem uma alta temperatura de fusão (~175 °C), embora a instabilidade térmica e fragilidade têm sido as principais desvantagens em aplicações potenciais. Por outro lado, a BC está entre os substratos que podem garantir o reforço necessário ao PHB (VIJAYENDRA; SHAMALA, 2013).

Nesse contexto, a crescente demanda por alimentos minimamente processados e produtos frescos apresenta problemas reais em relação à qualidade e segurança desses produtos. Por esta razão, novos métodos para inibir o crescimento microbiano em alimentos e que mantenham o frescor, a qualidade e a segurança do produto têm sido desenvolvidos. Um dos métodos mais utilizados é o empacotamento antimicrobiano (SOUZA et al., 2010). A embalagem antimicrobiana prolonga o período de defasagem do crescimento microbiano e reduz a taxa de crescimento e o número máximo de crescimento de micróbios. A embalagem ativa está atraindo mais atenção da indústria de alimentos e embalagens devido à crescente demanda por produtos sem conservantes. Baixos níveis de conservantes totais no sistema de embalagem, em comparação com a quantidade de conservantes adicionados diretamente nos alimentos, também são desejáveis (HAN; FLOROS, 2007).

Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um novo material polimérico ainda não descrito na literatura, composto por uma blenda de CB/PHB aditivada com óleo essencial de cravo, com a finalidade de funcionalizar o filme como ativo antimicrobiano e sobretudo biodegradável que possa ser utilizado para a indústria de alimentos perecíveis.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Produzir uma blenda de CB e PHB incorporado com óleo essencial de cravo-da-Índia que apresente viabilidade de aplicação como embalagem ativa em alimentos.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Produzir CB utilizando meio alternativo previamente formulado.
- Formular uma blenda de CB contendo 30% de PHB a partir da combinação dos polímeros por um novo método de dissolução.
- Caracterizar as blendas quanto à permeabilidade a óleo, solubilidade em água e flexibilidade.
- Adicionar o óleo essencial de cravo especificamente como agente antibacteriano da blenda obtida.
- Determinar a atividade antibacteriana do óleo essencial de cravo da Índia na blenda obtida.
- Determinar as propriedades mecânicas da blenda.
- Caracterizar a estabilidade térmica da blenda.
- Caracterizar a morfologia e os arranjos dos polímeros formadores da blenda.
- Caracterizar a cristalinidade da blenda.
- Caracterizar a interação entre as fibras dos polímeros constituintes da blenda.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1. EMBALAGENS ATIVAS**

As embalagens de alimentos são essenciais para a contenção de produtos, proteção, preservação, conveniência, para fornecer informações sobre o produto e comunicar a marca, entre outros (FERREIRA et al., 2016). Essencialmente, a concepção de uma embalagem resulta da combinação da ciência de alimentos, de processamento e de preservação, uma vez que ela deve estender a vida útil dos produtos alimentares, reduzindo o desperdício (TRINETTA, 2016). As embalagens plásticas representam quase 40% do mercado europeu dos plásticos e são essenciais para o processamento, o armazenamento, o transporte, a proteção e a conservação dos alimentos (PLASTICS EUROPE, 2012; 2015a). Na verdade, mais de 50% de todos os produtos europeus são embalados em plásticos, e este sucesso comercial é devido a uma combinação de propriedades como flexibilidade, resistência, leveza, estabilidade, impermeabilidade e facilidade de esterilização. Estas características tornam os plásticos materiais ideais para quase todos os consumidores comerciais e industriais (PLASTICS EUROPE, 2015b). De acordo com a Associação de fabricantes de plásticos da Europa (PLASTICS EUROPE, 2015a), a produção de plásticos tem crescido globalmente e é estável na Europa (57 Mton por ano). Este sucesso dos plásticos vem do fato de que muitos deles podem ser moldados, extrudados e fundidos em diferentes formas, filmes/membranas ou espumas (PLASTICS EUROPE, 2015a,c).

O polietileno (PE), o polipropileno (PP) e o politereftalato de etileno ou polietileno tereftalato (PET) são os mais utilizados no setor da embalagem (AMERICAN CHEMISTRY CONCIL, 2015), mas o policloreto de vinila (PVC) e o poliestireno (PS) também são facilmente encontrados nas embalagens de alimentos devido à resistência biológica e excelentes propriedades de barreira à água (PLACKETT, 2011). O verdadeiro êxito dos plásticos na indústria de embalagens alimentares é conseguido com a combinação de todas as características referidas (em especial a leveza) e a sua utilização para ajudar a manter os alimentos frescos e livres de contaminação (AMERICAN CHEMISTRY CONCIL, 2015). A vida de prateleira estendida dos produtos alimentares tem sido relatada para diferentes alimentos com uma embalagem simples; por exemplo, o pepino desembrulhado perde umidade dentro de três dias, mas 1,5 g de embalagem de plástico pode manter um pepino fresco por 14 dias. Algumas embalagens plásticas mais complexas podem prolongar em três vezes o prazo de validade de produtos específicos devido a propriedades únicas, como embalagens seccionáveis, agentes antimicrobianos, sistemas de controle de umidade e soluções de embalagens de atmosfera modificada. Além disso, espera-se que no futuro próximo mais

inovações estejam disponíveis em grande escala e a baixo preço, como absorvedores e emissores de substâncias gasosas naturais para prolongar a vida útil dos produtos, biosensores que detectam bactérias ou identificação por rádio-frequência para informar sobre a integridade dos produtos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2011). As membranas plásticas são geralmente produzidas por extrusão, co-extrusão, fundição, revestimento por extrusão, laminação por extrusão e metalização. Estes processos têm vantagens e desvantagens dependendo do polímero utilizado e da espessura necessária, normalmente inferior a 250 µm (PLACKETT, 2011).

No entanto, o problema crucial da utilização de plásticos para a embalagem é o resíduo pós-consumo, uma vez que a embalagem é, de longe, o maior contribuinte (63%) de resíduos plásticos (GREEN FACTS, 2011). Além disso, alguns materiais são difíceis de reutilizar e estima-se que menos de 14% dos materiais de embalagem plásticos sejam recicláveis (TUMWESIGYE et al., 2016). De acordo com o relatório “Plastics-The facts 2014/2015” (PLASTICS EUROPE, 2015a), apesar de as soluções de reciclagem e recuperação de energia terem aumentado desde 2006, a disposição em aterros continua a ser a maior solução para o plástico no final da vida, gerando 9,5 M toneladas de resíduos plásticos (38% do total) em 2012, para a UE27 + Suíça e Noruega. Uma vez que a maior parte dos materiais utilizados não são biodegradáveis e permanecem no ambiente durante longos períodos de tempo, continuam a constituir ameaças para a saúde humana e para o ambiente (PLASTICS EUROPE, 2015a). A outra solução utilizada, a incineração para recuperação de energia, tem um impacto ambiental severo (como para a maioria dos resíduos sólidos ou combustíveis), que pode incluir algumas partículas transportadas pelo ar e gases de efeito estufa (GREEN FACTS, 2011).

De acordo com esses fatos e sabendo que, nas últimas décadas, tem sido observado um rápido crescimento no uso de polímeros sintéticos, e se prevê que o valor poderia multiplicar por quatro até o ano 2100 como resultado da crescente população humana, será necessário utilizar 25% da produção mundial de petróleo apenas para a fabricação de plásticos (PLACKETT, 2011). Tendo em conta este cenário, uma opção válida para superar este problema ambiental é o uso de polímeros de base biológica obtidos a partir de recursos renováveis.

### **3.2. POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS**

A palavra polímero origina-se do grego *poli* (muitos) e *mero* (unidades de repetição). Dessa forma, um polímero é uma macromolécula composta por muitas unidades de repetição (meros) ligadas por uma ligação covalente. A matéria-prima para a formação de um polímero

é um monômero, ou seja, uma molécula com uma unidade de repetição. Os polímeros podem ser divididos em três classes principais: plásticos, borrachas e fibras. Essa classificação depende do tipo de monômero (estrutura química), tamanho da cadeia e do tipo de ligação covalente. Para a síntese de polímeros, é necessário que pequenas moléculas (monômeros) se liguem entre si, formando a cadeia polimérica (CANEVAROLO, 2010).

Os polímeros sintéticos convencionais são produzidos a partir de derivados do petróleo, um recurso natural não renovável, e apresentam diversos problemas ambientais decorrentes principalmente de sua difícil degradação que pode levar centenas de anos. No entanto, seu uso pela sociedade está intensificado devido às suas propriedades interessantes, como resistência mecânica, leveza, inércia química e baixo custo de produção e processamento (RHIM et al., 2013). O seu uso é diversificado incluindo-se em algumas aplicações para as quais anteriormente eram usados outros materiais, tais como metais, vidro, madeira e papel. Sendo também usados em aplicações industriais, domésticas e ambientais, desde garrafas, embalagens, sacos de supermercado, latas de conserva, tintas, passando pelos cobertores, tapetes, escovas de dente, pneus ou suportes para componentes elétricos, os polímeros encontram-se presentes em quase a totalidade dos utensílios de uso cotidiano (COUTINHO et al., 2004). Para a produção de embalagens destina-se aproximadamente 40% da produção dos polímeros sendo que metade desta produção é destinada para embalagens de alimentos (RHIM et al., 2013). Em particular, para as embalagens plásticas têm-se métodos de descartes limitados e isto está gerando uma preocupação global crescente com respeito aos danos ambientais e também com relação ao esgotamento dos recursos naturais causados por embalagens plásticas convencionais que não são biodegradáveis. Dessa forma, é necessário buscar alternativas mais sustentáveis de produção, utilização e descarte para os polímeros visando diminuir os impactos causados ao meio ambiente.

Neste sentido nas últimas duas décadas, houve um crescente interesse público e científico com relação ao uso e desenvolvimento de biopolímeros (plásticos biodegradáveis). Além dos biopolímeros possuírem as tão desejadas propriedades físicas e químicas dos plásticos sintéticos convencionais, eles podem ser obtidos a partir de fontes renováveis (RHIM et al., 2013). Para a produção de embalagens, os biopolímeros são considerados como uma forma sustentável para substituição dos polímeros não biodegradáveis e não renováveis.

Biopolímeros ou plásticos biodegradáveis são materiais poliméricos, em que pelo menos um passo no processo de degradação ocorre através do metabolismo de organismos encontrados no ambiente (RHIM et al., 2013). Em condições apropriadas de temperatura, umidade e disponibilidade de oxigênio, a biodegradação leva à fragmentação ou desintegração dos plásticos sem resíduos tóxicos ou perigosos.

Para a indústria de polímeros e consumidores é importante fazer a distinção entre biopolímeros e materiais biodegradáveis. De acordo com a norma da American Society for

Testing and Materials (ASTM D-5488-94de1, 1994) um material biodegradável é definido como "material capaz de sofrer decomposição em dióxido de carbono, metano, água, compostos inorgânicos ou biomassa em que o mecanismo predominante é a ação enzimática dos micro-organismos, que pode ser medida por testes padronizados, em um período de tempo especificado, refletindo a viabilidade do descarte".

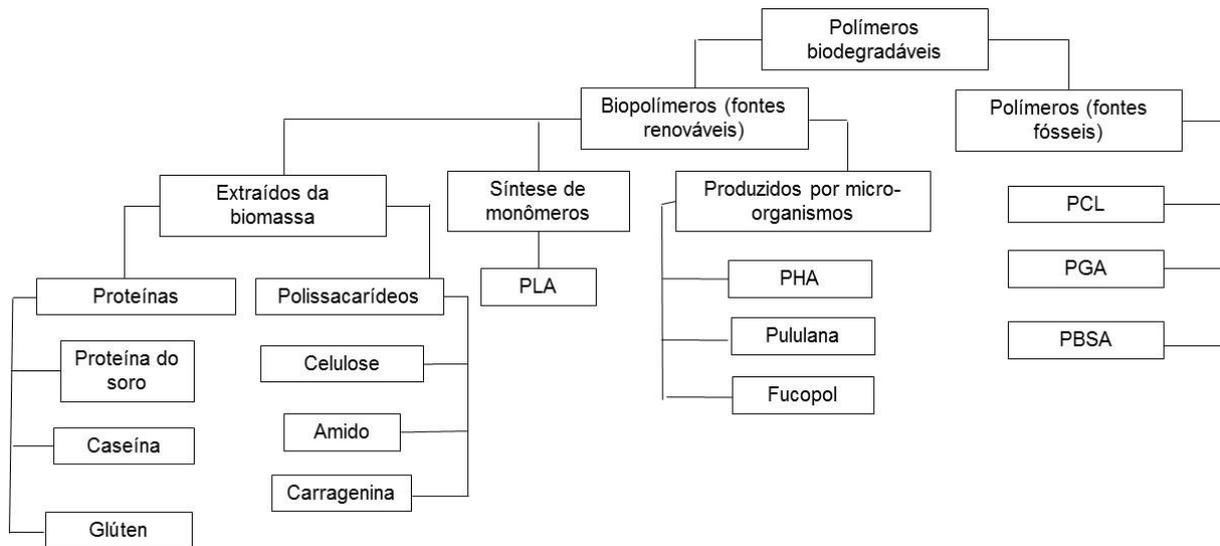
De acordo com a ASTM 6400-04, os termos mais utilizados para classificação dos tipos de plásticos encontram-se na Tabela 1.

Por outro lado, os biopolímeros são materiais poliméricos totalmente derivados de recursos renováveis. Embora os biopolímeros sejam biodegradáveis, nem todos os materiais biodegradáveis são considerados biopolímeros. Como exemplos, a policaprolactona (PCL), o poliglicolídeo (PGA) e o adipato de polibutileno succinato (PBSA) são materiais biodegradáveis, mas não são classificados em biopolímeros porque são produzidos a partir de recursos não renováveis (produtos químicos de origem fóssil) (Figura 1).

**Tabela 1.** Classificação dos tipos de plásticos (ASTM 6400-04) (KLOSS, 2007)

<b>Tipo de plástico</b>	<b>Definição</b>
<b>Biodegradável</b>	Plástico degradável no qual a degradação é resultada pela ação de micro-organismos de ocorrência natural, tais como bactérias, fungos e algas.
<b>Compostável</b>	Plástico que sofre degradação por processos biológicos durante a compostagem, produzindo CO <sub>2</sub> e água, componentes inorgânicos e biomassa a uma taxa significativa quando comparada com outros materiais compostáveis conhecidos e que não deixam quaisquer materiais visíveis, perceptíveis e tóxicos.
<b>Degradável</b>	Plástico capaz de sofrer uma mudança significativa em sua estrutura química sob condições ambientais específicas, resultando em perda de algumas propriedades. As mudanças podem ser avaliadas por ensaios padronizados e que são utilizados em plásticos convencionais.

**Figura 1.** Polímeros biodegradáveis (FERREIRA et al., 2016)



Os biopolímeros são geralmente classificados de acordo com a origem de sua matéria-prima:

1. Polímeros diretamente extraídos/removidos diretamente da natureza, como carboidratos de plantas (amido, celulose, alginato, ágar, etc.) e de origem animal ou vegetal como proteína de soja, glúten de trigo, gelatina, colágeno, etc.
2. Polímeros sintéticos biodegradáveis, produzidos por síntese química a partir de monômeros derivados de fontes renováveis, como o polilactato ou poliácido láctico (PLA), um poliéster alifático termoplástico derivado de monômeros de ácido láctico, o poli (butileno succinato) (PBS) e as poli ( $\epsilon$ -caprolactonas) (PCL). O próprio monômero é produzido por fermentação de carboidratos como matérias-primas.
3. Polímeros produzidos por micro-organismos (incluindo micro-organismos geneticamente modificados) , como alguns polissacarídeos (por exemplo, goma gelana e pululana), polihidroxialcanoatos (PHAs) e polihidróxibutiratos (PHB), além de várias blendas, comercializados por diferentes companhias (GALGANO, 2015; MENSITIERI et al., 2011).

De acordo com a Organização Europeia de Bioplásticos, os biopolímeros obtidos de recursos renováveis têm de ser biodegradáveis e compostáveis, o que permite sua eliminação no solo, sendo mais eficientes em termos energéticos do que se reciclados, podendo atuar como fertilizantes e condicionadores do solo (GALGANO, 2015; SIRACUSA et al., 2008). A Tabela 2 mostra alguns produtores industriais de polímeros biodegradáveis, bem como os tipos de polímeros produzidos e algumas de suas aplicações.

A utilização de biopolímeros (a partir de recursos renováveis e biodegradáveis) em embalagens tem reconhecido mérito em função da contribuição dessa ação para o

desenvolvimento sustentável, uma vez que é possível eliminar os resíduos plásticos que se acumulam na natureza. Esta solução é particularmente interessante para embalagens de alimentos, uma vez que estes tipos de materiais são geralmente contaminados por resíduos alimentares que constituem um perigo para a saúde na triagem e reciclagem mecânica (CRUZ-ROMERO; KERRY, 2008).

**Tabela 2.** Produtores industriais de alguns polímeros biodegradáveis e suas aplicações (KLOSS, 2007)

<b>Produtor</b>	<b>Marca Registrada</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Materiais</b>
Bayer	BAK 1095	Filmes e chapas	Poliéster amidas
Idroplast	Agribag	Distribuidor químico	Poli(álcool vinílico) PVA
Biotec	Bioplast	Filmes e chapas	Amido termoplástico
Novamont	MasterBi	Mantas protetoras de plantações e vasos	Amido / policaprolactona (PCL)
Solvay S.A.	CAPA,600	Liberação controlada de fertilizantes	Policaprolactona (PCL)
Cargill	Eco PLA	Mantas protetoras de plantações e vasos	Poli(ácido láctico) (PLA)
Dow			
Eastman	Eastar Bio	Cobertura de raízes	Copoliésteres
Novon	Degra-Novon	Mantas protetoras de plantações e vasos	Amido modificado
TPS, Inc.	Vinex	Embalagens para produtos químicos	Poli(álcool vinílico) PVA
BSL	Sconace II	Filmes e vasos	Amido modificado
Du Pont	Biomax	Mantas protetoras de plantações e vasos	Resinas poliéster
PHB Industrial	PHB	Embalagens, tubetes de reflorestamento e outras aplicações baseadas na injeção.	Poli(hidro)butirato (PHB) produzido por bactéria
Basf	Ecoflex	Fabricação de embalagens flexíveis, colaminação com papel filme para plasticultura.	Copoliéster de 1,4-butanodiol, ácido adípico e ácido terefálico

Basf	Ecobras	Embalagens injetadas, tubetes para reflorestamento, sacolas plásticas e embalagens para cosméticos	É um combinado do Ecoflex e um polímero vegetal à base de milho
------	---------	--	---

---

### 3.2.1. Celulose bacteriana (CB)

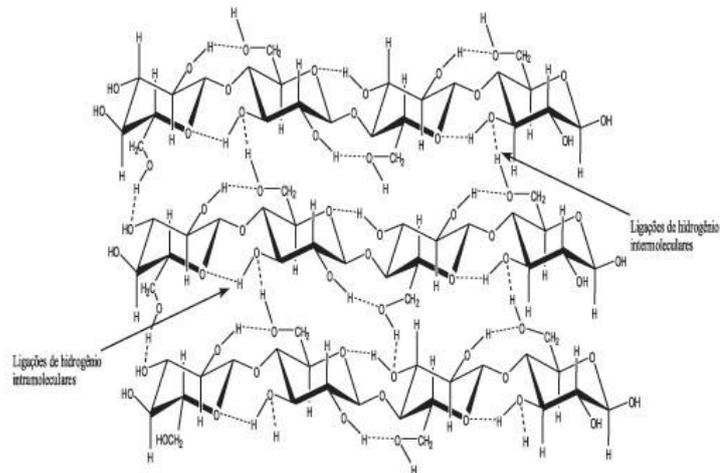
A celulose é um dos polímeros naturais mais abundantes na Terra. Com uma produção estimada de  $10^{14}$  toneladas por ano e de grande importância econômica, ela pode ser encontrada em diferentes formas de vida como em plantas verdes, fungos, protozoários e procariontes. A maioria desses polímeros é produzida por plantas, sendo por isso denominada de celulose vegetal (CV) (GOMES et al., 2013). A celulose é o principal componente da parede celular de plantas, contendo impurezas como lignina, pectina e hemicelulose. O aumento da demanda de derivados de celulose vegetal (CV) no mundo aumentou o consumo de madeira como matéria-prima, causando desmatamento e consequentes problemas ambientais em nível global (PARK et al., 2012). Industrialmente, a celulose é muito usada na produção de papel, na indústria madeireira, como emulsificador, agente dispersante, agente gelificante, entre outras. Atualmente, a madeira do eucalipto tem sido uma das principais fontes industriais de celulose sendo composta por celulose (40 a 45%), lignina (25 a 30%), hemiceluloses (30%) e extrativos (até 4%). Embora as plantas sejam as maiores fontes de celulose, vários tipos de bactérias são capazes de produzir celulose como fonte alternativa.

Classificada como um carboidrato, a celulose  $(C_6H_{10}O_5)_n$  é um polímero que contém carbono, hidrogênio e oxigênio, sendo formada por cadeias lineares não ramificadas de moléculas  $\beta$ -D-glicose unidas por ligação do tipo  $\beta$ -1,4-glicosídicas que interagem umas com as outras através de ligações de hidrogênio intramolecular e intermolecular (Figura 2). A estrutura polimérica inicia sua formação quando duas moléculas de glicose se unem e formam a celobiose, considerada a unidade estrutural de repetição da molécula de celulose. As microfibrilas de celulose, que são moléculas longas e rígidas, se formam por ligações de hidrogênio, responsáveis pela rigidez da cadeia e pela formação de fibras retas e estáveis que elevam a resistência mecânica e fazem com que a celulose seja insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos (UL-ISLAM et al., 2012; SANTOS et al., 2015;).

A microfibrila celulósica resulta da íntima associação de quatro fibrilas elementares agrupadas por uma monocamada de hemicelulose, sendo posteriormente circundadas em uma matriz de hemicelulose e lignina (associadas entre si por meio de interações físicas e ligações covalentes). A estrutura resultante desse arranjo químico é denominada fibrila

elementar, que apresenta características de insolubilidade em água e alto grau de cristalinidade (ANTÔNIO et al., 2012).

**Figura 2.** Estrutura química da cadeia  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4)-glicana (celulose) e as ligações de hidrogênio intramolecular e intermolecular de celulose (ANTÔNIO et al., 2012).



A estrutura cristalina da celulose explica a alta resistência axial e o módulo da celulose. Um valor de 134 GPa (137 kgf/cm<sup>2</sup>) foi determinado para o módulo de elasticidade dos cristais de celulose, utilizando difração XRD e fibras de celulose deformadas sob um estresse constante (SAKURADA et al. 1962). Este módulo está no mesmo nível que o de outras fibras de reforço, mas com uma densidade mais baixa (MOON et al., 2011). As fibras de madeira e lignocelulósicas têm um módulo de elasticidade muito menor em comparação com a celulose cristalina (cerca de 30 Gpa no caso das fibras de cânhamo). Para aproveitar ao máximo as propriedades mecânicas dos cristais de celulose, a estrutura complexa de madeira ou fibras lignocelulósicas deve ser quebrada para liberação dos cristais de celulose. Embora a primeira imagem de nanocristais de celulose em microscópio eletrônico de transmissão preparados por hidrólise ácida da celulose vegetal tenha sido publicada por Mukherjee e Woods (1953), foi mérito de Favier et al. (1995) enfatizar a importância dos nanocristais de celulose para reforço de polímero. Seus primeiros estudos abriram uma nova era, a nanocelulose e nanocompositos à base de celulose, que ainda são amplamente estudados e começaram a ser produzidos em plantas piloto e, alguns, em grande escala. A nanocelulose é importante porque reúne a mesma força material, flexibilidade, biocompatibilidade, disponibilidade e baixo custo. As principais desvantagens da nanocelulose quando utilizada para a preparação de nanocompositos de polímeros, são alta absorção de umidade, estabilidade térmica limitada e alta hidrofiliabilidade, sendo necessárias mais pesquisas para resolver esses problemas.

Inicialmente, a nanocelulose foi classificada em três tipos (KLEMM et al., 2011): (i) celulose nanofibrilada fabricada por tratamento mecânico como processo principal (LAVOINE et al., 2012), (ii) nanocristais de celulose / nanovigas preparadas por hidrólise ácida (HABIBI et al., 2010; HENRIQUE et al., 2015) e (iii) celulose bacteriana. A Nanocelulose produzida a partir de solução ou derretimento por eletrospinning, utilizando forças elétricas, foi adicionada nesta classificação em revisões recentes (THAKUR, 2015). Dependendo da fonte, a celulose pode ser classificada em celulose sintetizada em plantas superiores, incluindo árvores, em plantas inferiores, como algas, por alguns animais (tunicados), fungos, amebas ou por algumas bactérias (DUFRESNE, 2012).

A CB, também denominada de biocelulose, é o resultado da extrusão do material por bactérias aeróbicas e se apresenta como nanofibras (10-50 nm) orientadas uniaxialmente. Microfitas com largura de 1 a 9 nm apresentam uma nanoestrutura singular, elevado grau de polimerização, entre 2.000 a 6.000 e propriedades mecânicas indicadas ao desenvolvimento de biomateriais e como reforço para biocompósitos quando comparada com outros materiais (Tabela 3).

As microfibrilas de CB foram primeiramente descritas por Muhlethaler, em 1949, sendo cerca de 100 vezes menores do que as de CV (CHAWLA et al., 2009; GAYATHRY; GOPALASWAMY, 2014). A rede fibrosa de CB é feita a partir de três nanofibras dimensionais bem arrumadas que resultam na formação de uma folha de hidrogel com elevada área superficial e porosidade (ESA et al. 2014).

**Tabela 3.** Propriedades mecânicas da CB em relação a outros materiais

<b>Material</b>	<b>Módulo de Young (GPa)</b>	<b>Resistência à tração (MPa)</b>	<b>Deformação (%)</b>
<b>Celulose Bacteriana (CB)</b>	15 – 35	200 - 300	1,5 - 2,0
<b>Polipropileno (PP)</b>	1 - 1,5	30 - 40	100 - 600
<b>Poli(tetraftalato de etileno) (PET)</b>	3 – 4	50 - 70	50 - 300
<b>Celofane</b>	2 -3	20 - 100	15 - 40

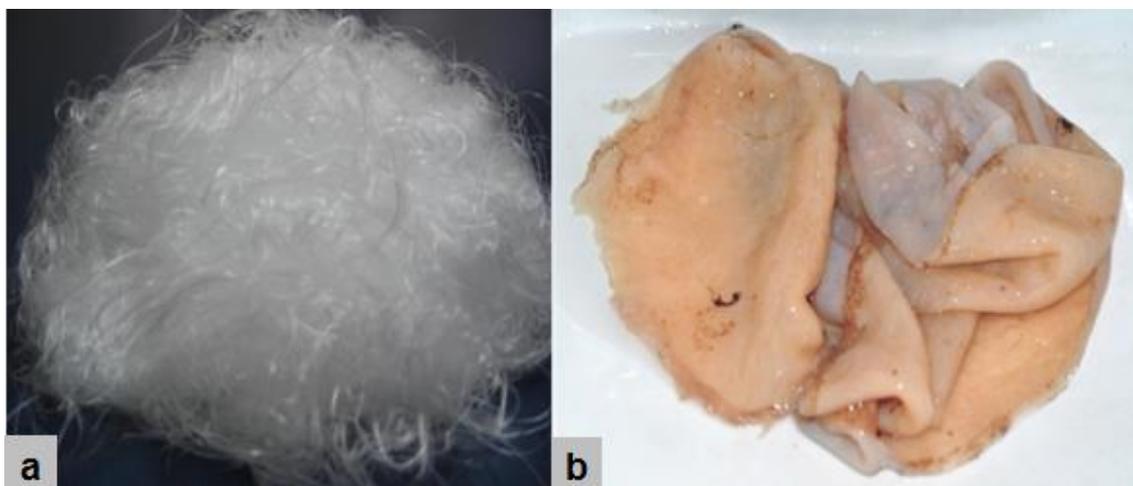
Fonte: KLEMM et al. (2006)

As ligações de hidrogênio inter e intra-molecular mantêm as cadeias de celulose juntas, conferindo também às fibras de CB uma baixa solubilidade e alta retenção de água, além de elevada pureza, resistência mecânica, elasticidade, flexibilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, ausência de toxicidade, além de não ser alérgica (ESA et al. 2014), sendo pesquisada no meio científico como uma promessa potencial para utilização em várias áreas

do conhecimento (KLEMM et al., 2006; PECORARO et al.; 2008; DONINI et al., 2010; WANG et al., 2011).

A CV se difere de seu par biológico principalmente devido ao seu caráter de fibras micrométricas, enquanto que a CB apresenta caráter de fibras nanométricas e são extruídas através da parede celular da bactéria (DONINI et al., 2010). Visualmente, a diferença entre a CV e a CB refere-se tanto à aparência quanto ao teor de água. A CV tem um aspecto fibroso, enquanto que a CB se assemelha a um gel (Figura 3). No entanto, os grupos funcionais que caracterizam a CB são os mesmos que os da CV.

**Figura 3.** (a) CV tem um aspecto fibroso e (b) CB assemelha-se a um gel (DONINI et al., 2010).



Um filme de CB, com estrutura tridimensional e propriedades únicas é obtido quando o processo fermentativo é submerso estático (CHAWLA et al., 2009), produzindo um biomaterial de alta cristalinidade (60-90%) quando comparado com a CV (~40 %) e especialmente com a fibra do algodão (~70 %) (ROSS et al., 1991, BROWN et al., 1996; BARUD et al., 2007; PIGOSSI et al., 2015).

Brown, em 1886, observou que durante o processo de fermentação do vinagre, a bactéria *Gluconacetobacter xilinus*, anteriormente *Acetobacter xylinum* e atualmente denominada de *Gluconacetobacter hansenii*, é capaz de sintetizar CB na presença de glicose e oxigênio (HESTRIN; SCHRAMM, 1954; DONINI et al., 2010; RANGASWAMY et al., 2015), formando uma manta gelatinosa, a qual foi observada pela primeira vez na superfície de fermentação do vinagre. Após análise microscópica, a presença da referida bactéria foi constatada na manta.

A fermentação para a produção de CB é realizada tanto em condições estáticas, ou sob condições de agitação. Diferentes formas de celulose são produzidas sob estas

condições. A formação de uma película tridimensional interconectada reticularmente foi relatada sob condição estática, enquanto a condição agitada produz partículas de celulose irregulares de forma semelhante a esferas (TANSKUL et al., 2013). O processo de formação de celulose sob condições estáticas é regulado por alimentação de ar na superfície do meio e o rendimento depende moderadamente da concentração da fonte de carbono (BUDHIONO et al., 1999). O aumento do tempo de crescimento irá aumentar a formação de CB juntamente com hidrogênio e ligações C-H (SHEYKHNAZARI et al., 2011). A síntese da CB atinge o seu limite quando o crescimento da película na área inferior do meio, aprisiona todas as bactérias, que se tornam inativas devido ao fornecimento insuficiente de oxigênio (BORZANI; SOUZA, 2010). O processo semicontínuo na condição estática é recomendado em escala industrial, uma vez que consegue aumentar a produtividade BC em relação ao processo contínuo (ESA et al. 2014).

Alguns gêneros de bactérias como *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Agrobacterium* e *Alcaligenes* produzem um polímero linear de celulose fortemente associado através das ligações de hidrogênio que são responsáveis pela formação das fibras de celulose com a mesma estrutura química da CV e com propriedades físicas e mecânicas relevantes para a produção dos biomateriais (DONINI et al., 2010). Bactérias acéticas pertencentes à família *Acetobacteraceae* do gênero *Acetobacter* produzem CB especialmente quando são usados manitol, etanol, n-butanol, glicerol e lactato como fontes de carbono para o crescimento celular, tendo em vista que não hidrolisam o amido nem a lactose e são quimiorganotróficas (DE LEY et al. 1984, HOLT et al., 1994, ASHTAVINAYAK et al., 2016).

A produção de CB pelas bactérias do gênero *Gluconacetobacter* foi um estudo que aconteceu visando avaliar a biossíntese deste biopolímero e extrapolá-las para o processo em plantas industriais. Essas bactérias são gram-negativas e se apresentam em forma de bastão, com alta tolerância a substâncias ácidas, crescem em valores de pH menores que 5,0, são não patogênicas e necessitam, em especial, de um suprimento contínuo de oxigênio e carbono para que a produção de CB extracelular seja eficiente (IGUCHI et al., 2000; KLEMM et al, 2001; PECORARO et al., 2008; BARUD, 2010; ESA et al. 2014). Esse gênero produz uma CB que apresenta propriedades únicas, incluindo elevada resistência mecânica à tração, possibilidade de inserções de materiais para obtenção de compósitos, elevada capacidade de retenção de água, elevada cristalinidade e uma estrutura de rede ultrafina e fibra altamente pura. Essas propriedades permitem muitas aplicações na área biomédica, como biossensor, na área de alimentos, têxtil e em outras indústrias (HUNGUND; GUPTA, 2010).

Para a bactéria, a CB funciona como mecanismo de flotação, permitindo ao micro-organismo permanecer em uma interface ar/líquido para obter oxigênio com maior facilidade para seu crescimento. Atua como barreira física que protege a bactéria da radiação

ultravioleta, aumenta a capacidade de colonizar substratos e seu caráter higroscópico permite a retenção de umidade, prevenindo a desidratação do substrato (DONINI et al., 2010).

Atualmente, a *G. xylinus* é considerada como micro-organismo modelo na biossíntese, cristalização e obtenção de propriedades estruturais de CB. 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 -glucana. A segunda 1-4 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. O resultado desse processo é a formação de uma estrutura tridimensional resistente denominada microfibrila (DONINI et al., 2010). Os mais de 100 poros existentes na membrana desse micro-organismo proporcionam a extrusão da celulose para formar uma fibrila elementar que apresenta um diâmetro aproximado de 3,5 nm. Cerca de 46 fibrilas adjacentes juntam-se através de ligações de hidrogênio para formar uma fita, que tem uma largura variando de 40 a 60 nm. As fitas rolam para cima para formar a fibra, que ficam emaranhadas com as outras fibras dispersas no meio de cultura. As fibras entrelaçadas formam uma película gelatinosa denominada *Zooglea*, que contém cerca de 98 % (w/w) de água e apresenta-se sobre a superfície do meio de cultura líquido. Sua espessura depende do tempo de cultura e, geralmente, pode chegar a 1 ou 2 cm (PECORARO et al., 2008).

As características estruturais da CB estão diretamente relacionadas a dois fatores: a origem a estirpe, a qual determina a razão  $I\alpha/I\beta$ , que consistem em duas diferentes estruturas cristalinas, uma monoclinica - celulose  $I\beta$ , e outra triclinica - celulose  $I\alpha$  (LIMA et al., 2015) e a composição do meio de cultura, que influencia o tamanho da cadeia. Tais características determinam também o grau de cristalinidade e conseqüentemente as propriedades físico-químicas da CB.

A estrutura nanométrica e porosa da membrana produzida pela CB é um material que age como uma barreira física contra bactérias. Pode ser desidratada, mas, devido à elevada capacidade absorvente, a CB se reidrata quando entra em contato com líquidos, com a capacidade de absorver o mesmo volume de líquido original (CZAJA et al., 2007).

Estudos sobre a cinética de crescimento dos micro-organismos auxiliam os estudos para obtenção da membrana de CB com a espessura desejada, utilizando por base os processos fermentativos. Observando a possibilidade do aumento substancial da produtividade da CB, diversos autores vêm trabalhando o tema, utilizando diferentes formas de cultivo em biorreatores e cultivos agitados, em contraste com o cultivo tradicional estático, além de variações nas condições de suplementação (DONINI et al., 2010).

### **3.2.1.1. Resíduos industriais utilizados na produção de CB**

O meio padrão utilizado para a manutenção e produção de CB, o meio Hestrin-Schramm (HS), descrito em 1954, tem custo elevado, pois requer a suplementação de glicose, extrato de levedura e peptona. Pesquisas recentes têm se concentrado na tentativa para produzir a CB a um custo mais reduzido usando diferentes estirpes de bactérias produtoras de celulose e fontes alternativas de carbono e nitrogênio. Tais pesquisas que visam a descoberta de fontes de carbono alternativas e de baixo custo que sirvam de substrato são de extrema importância para a viabilidade da produção de CB em uma escala significativa que permita a substituição da celulose vegetal pelo biopolímero bacteriano, uma vez que o custo de produção associado ao substrato em processos fermentativos referentes à produção de CB são responsáveis por até 65% do custo total de produção (JOZALA et al., 2014; TSOUKO et al., 2015).

Resíduos estão se tornando matérias-primas interessantes para o meio industrial, devido a uma maior consciência ambiental das empresas e da população. Os resíduos industriais vêm sendo utilizados para substituir os compostos sintéticos como uma alternativa relativamente barata para reduzir ou substituir a fonte de carbono de maneira que o cultivo da celulose bacteriana alcance aplicações industriais de grande escala (KONGRUANG, 2008; CAVKA et al., 2013; HUANG et al., 2014; KIZILTAS, et al., 2015).

Muitos trabalhos têm sido realizados no sentido de testar novas fontes de carbono de baixo custo para a produção de CB. O futuro potencial para a CB está muito além das aplicações existentes, especialmente para a produção de grandes quantidades a partir de matérias-primas de baixo custo, e pode incluir materiais têxteis especiais, materiais funcionais avançados e embalagens (CAVKA et al., 2013). A produção de CB a partir de resíduos agrícolas e resíduos industriais, que incluem resíduos de alimentos, palha de trigo (CHEN et al., 2007; 2010; HONG; QIU, 2008; KONGRUANG, 2008), resíduos de frutas (KONGRUANG, 2008), resíduos de glicerol e resíduos têxteis à base de algodão (HONG; QIU 2008) tem sido demonstrada. A vantagem em usar resíduos agrícolas ou industriais não só fornece uma maneira barata de produzir a CB, mas também funciona como uma proposta ambiental (LI et al., 2015). Além disso, a utilização de tais materiais residuais não só melhora a sustentabilidade da produção de celulose por micro-organismos, mas também reduz a poluição ambiental associada ao descarte de resíduos industriais (LI et al., 2015).

Os resíduos da agroindústria estão sendo utilizados para substituir a água e/ou compostos que são fontes de carbono e nitrogênio visando minimizar custo e agregar valor à produção de CB (ANDRADE et al., 2010). Muitos substratos estão sendo utilizados como meio de cultura para a produção da CB, desde que nesses meios ocorra a fermentação de açúcares e carboidratos de plantas. Leite, soro de leite, água de coco, resíduos agrícolas como leite,

frutas em decomposição, sucos, cerveja, vinhos não pasteurizados ou esterilizados, chás verde ou preto, líquido do sisal, dentre outros, têm sido citados (KLEMM et al., 2006; CZAJA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2010).

Os arranjos das nanofibrilas de CB produzidas em substratos cuja composição apresente resíduos agroindustriais foram estudados por Carreira et al. (2011) e Fernandes e Martendal. (2016), em experimentos realizados com extrato de casca de uva, cerveja, soro de queijo e azeite com ou sem adição de suplementos (carbono e/ou nitrogênio). Tyagi e Suresh (2016) e Çakar et al. (2014) utilizaram melaço de cana de açúcar. Wu et al. (2014) testou o efluente de uma fábrica de doces. O líquido de sisal (suco de sisal) e o suco de caju vêm sendo utilizados nas pesquisas desenvolvidas pela EMBRAPA Tropical – Fortaleza/Ceará, Brasil, para a produção de CB como fonte alternativa de carbono (ANDRADE et al., 2010). Compostos como manitol, sacarose de qualidade alimentar (açúcar), sacarose e xarope foram testadas por Mohammadkazemi et. al. (2015). Gomes et al. (2013) usou resíduo da produção de azeite em substituição da água do meio de cultivo padrão HS. A água residuária lipídica proveniente do beneficiamento do milho foi utilizada por Huang et al. (2014) como meio de cultivo. O extrato retirado de madeira Bordo Vermelho (*Acer Rubrum*) foi testado por Kiziltas et al. (2015). Todos os resíduos apresentaram êxito na produção de CB quando incubados em condições agitadas ou estáticas, sob pH controlado ente 4-7, temperatura entre 26-30° C durante, no mínimo, 7 dias.

### **3.2.1.2. Influência das condições de cultivo na produção de CB**

Além da composição do meio de cultivo, a influência de parâmetros como pH, temperatura e aeração, agitação e tempo de cultivo exercem influência na produção de CB (JUNG et al., 2005; ZYWICKA et al., 2015).

A produção de celulose bacteriana (CB) pode ser obtida em laboratório utilizando cultivos em meios sólidos e líquidos. Cultivos em culturas estáticas, cultivos em culturas agitadas em agitador orbital ou em biorreator são métodos utilizados em pesquisas de laboratório para a produção de CB. Diferentes formas de celulose são produzidas sob estas condições (SANI; DALMAN 2010; MOOSAVI-NASAB; YOUSEFI; 2011).

Em condições estáticas é necessário regular a aeração do meio e a concentração da fonte de carbono para que uma película tridimensional, interconectada reticularmente, semelhante a um couro branco, seja produzida e emerja para a interface ar-líquido quando acontece a oxidação incompleta de diversos açúcares e álcoois do meio de cultura (KLEMM et al., 2006; WU et al., 2014). O aumento do tempo de crescimento aumenta a formação de CB juntamente com hidrogênio e ligações de C-H (SHEYKHNAZARI et al., 2011). A síntese

da CB atinge o seu limite quando o crescimento da película em direção ao interior do meio aprisiona todas as bactérias, as quais se tornam inativas devido ao fornecimento insuficiente de oxigênio (BORZANI; SOUZA, 1995).

Quando o experimento acontece sob agitação ou em condição agitada, são produzidas partículas de celulose irregulares, semelhantes a esferas (TANSKUL et al., 2013). O processo semi-contínuo na condição estática é recomendado em escala industrial, uma vez que permite aumentar a produtividade de CB em relação ao processo contínuo (ESA et al. 2014). A CB produzida sob agitação apresenta baixa resistência mecânica, na forma de pellet ou como um emaranhado de fibras; no entanto, esse método objetiva aumentar a produção de CB para fins industriais (DONINI et al., 2010).

Por outro lado, o crescimento das bactérias produtoras de celulose e os rendimentos do polímero são reduzidos em meios estáticos, mesmo nos meios de cultura de composição mais favorável. O período de cultivo pode variar de 10 dias a 6 semanas, dependendo da cepa utilizada (DUDMAN, 1960). Uma das possíveis causas para a baixa taxa de crescimento bacteriano é a dificuldade na transferência de oxigênio e de nutrientes para o interior da película. Segundo Lee et al. (2016), o rendimento típico na produção de CB em meios estáticos é de 5 g/L após 27 dias de cultivo.

O advento das pesquisas que estudam a produtividade de CB em meios agitados surgiu da necessidade de diminuir este longo tempo necessário para a produção em culturas estáticas. Dudman et al., (1960) mostram que o tempo de 3 – 4 semanas normalmente necessário para a produção em culturas estáticas é reduzido para 2 – 4 dias em culturas agitadas e a estrutura química da celulose em ambos os casos é exatamente a mesma. Em 4 dias, foi observado um rendimento de 2,5g/L. A taxa de crescimento bacteriano também foi significativamente maior, embora o rendimento tenha sido menor do que o conseguido em condições estáticas. Isto é explicado devido ao fato de a agitação ter a desvantagem de promover a mutação das cepas produtoras de celulose em mutantes não produtores. Na tentativa de produzir CB de forma mais viável economicamente, novos biorreatores vêm sendo utilizados de forma a aumentar a taxa de crescimento e produtividade bacteriana ao mesmo tempo em que se tenta evitar ao máximo a mutação das cepas produtoras e principalmente reduzir o custo da produção.

O pH ótimo para a produção da celulose bacteriana irá depender do micro-organismo produtor. De acordo com a literatura, o melhor valor de pH está situado entre 4 e 7. Alguns estudos variaram o pH do meio de 4,5 a 7,5, e a maior produção de CB foi em pH 6,5 (SON; HEO, 2001). Porém, industrialmente, além da atenção dada à produtividade, empresas que fabricam o polímero para fins biomédicos utilizam valores entre 4 e 4,5 a fim de evitar contaminação do meio durante o cultivo (JONAS; FARAH, 1998). É importante salientar que a adição de um tampão para evitar a redução do pH durante o processo fermentativo é

necessária para se alcançar o maior rendimento possível, devido à produção de metabólitos de caráter ácido, como os ácidos glucônico, láctico e acético, que podem levar a oscilações indesejáveis de pH.

Son e Heo (2001) estudaram o efeito da temperatura na produtividade da bactéria *Acetobacter sp.* A9 entre 20<sup>o</sup> C e 40<sup>o</sup> C. O melhor valor encontrado foi de 30<sup>o</sup> C. A temperatura afeta não só a produtividade, como também a morfologia e a estrutura cristalina do polímero. Hirai et al. (1997) mostraram que a CB produzida pela bactéria *A. xylinum* ATCC 23769 em meio HS à 4<sup>o</sup> C era formada por bandas de celulose II, ao passo que o polímero produzido em 28<sup>o</sup> C levou à uma morfologia formada por tiras de celulose I.

O Oxigênio dissolvido no meio de cultura é essencial para o metabolismo celular e não é importante apenas no rendimento, mas também na qualidade do polímero final (SHIRAI et al., 1994). Por outro lado, elevadas taxas de oxigênio dissolvido podem aumentar a concentração de ácido glucônico, o que pode inviabilizar a célula e reduzir o rendimento de CB. Concentrações reduzidas de oxigênio, por outro lado, impedem o crescimento bacteriano e a produção do biopolímero.

De acordo com Hestrin e Schramm (1954), a produção de CB por *G. xylinus* utilizando 2% de glicose, com pH entre 5,0 e 7,0 e temperatura entre 25°C a 37°C como condições de cultivo, foram consideradas ótimas para o cultivo estático, uma vez que após duas horas de cultivo já foi observada a produção de um gel viscoso na interface líquido/ar. Para a referida bactéria, fontes de carbono como frutose, sacarose, glicerol, manitol, lactose, maltose, sorbitol e cultivo em agitador orbital já foram testados sem sucesso para a formação da membrana de CB.

De acordo com Donini et al. (2010), o melhor rendimento em CB relatado na literatura foi de 15,3 g/L após 50 horas de cultivo estático, como ilustrado na Tabela 4.

**Tabela 4.** Bactérias, fontes de carbono, suplementos, tempo de cultivo e rendimentos em celulose bacteriana (CHAWLA, 2009)

<b>Bactéria</b>	<b>Fonte de Carbono</b>	<b>Suplementação</b>	<b>Tempo de cultivo (h)</b>	<b>Rendimento (g/L)</b>
<b><i>G.xylinum BRC 5</i></b>	<i>Glicose</i>	<i>Etanol + Oxigênio</i>	50	15,30
<b><i>G. hansenii</i></b>	<i>Glicose</i>	<i>Oxigênio</i>	48	1,72
<b><i>G. hansenii</i></b>	<i>Glicose</i>	<i>Etanol</i>	72	2,50
<b><i>Acetobacter sp. V6</i></b>	<i>Glicose</i>	<i>Etanol</i>	192	4,16
<b><i>Acetobacter sp. A9</i></b>	<i>Glicose</i>	<i>Etanol</i>	192	15,20
<b><i>G. xylinum BPR2001</i></b>	<i>Melaço</i>		72	7,82

<i>G. xylinum</i> BPR2001	Frutose	Ágar e Oxigênio	72	14,10
<i>G. xylinum</i> BPR2001	Frutose	Ágar	56	12,00
<i>G. xylinum</i> ssp.	Frutose	Oxigênio	52	10,40
<b>Sucrofermentans</b>				
<b>BPR2001</b>				
<i>G. xylinum</i> ssp.	Frutose	Ágar e Oxigênio	44	8,70
<b>Sucrofermentans</b>				
<b>BPR2001</b>				
<i>G. xylinum</i> E25	Flucose		168	3,5
<i>G. xylinum</i> K3	Manitol	Chá Verde	168	3,34
<i>G. xylinum</i> IFO 13773	Glicose	Lignosulfato	168	10,10
<i>G. xylinum</i> NUST4.1	Glicose	Alginato de Sódio	120	6,00
<i>G. xylinum</i> IFO 13773	<b>Melaço</b>		<b>168</b>	<b>5,76</b>
<i>Gluconacetobacter</i> sp	<b>Glicerol</b>		<b>144</b>	<b>5,63</b>
<b>RKY5</b>				

### 3.2.1.3. Recuperação e purificação da CB

A celulose bacteriana, apesar de não possuir outros compostos em sua composição como ocorre com a celulose vegetal, precisa passar por processos de recuperação. Impurezas como células e componentes do meio de cultivo devem ser retiradas para que a celulose pura seja obtida e o rendimento calculado (CHAWLA et al., 2009).

Chawla et al (2009) descreve os principais processos de purificação do polímero bacteriano, tanto para aplicações gerais quanto para aplicações médicas, as quais exigem um tratamento mais refinado. O principal processo de purificação de celulose bacteriana é o tratamento com álcali (hidróxido de sódio ou potássio), ácidos orgânicos como ácido acético ou lavagens repetidas com água de osmose reversa ou com água quente. Estas metodologias podem ser usadas separadamente ou em conjunto. Quando o polímero final se destina a aplicações médicas, tratamentos subsequentes devem ser realizados para que células bacterianas e toxinas sejam retiradas da celulose. Uma das metodologias mais utilizadas consiste em processar delicadamente a película do polímero entre duas folhas de papel absorvente, o qual retira aproximadamente 80% da fase líquida e então submergir o polímero em NaOH a 3% por 12 hs. O procedimento é repetido por três vezes e então a película é incubada em solução de HCl, prensada e lavada com água destilada. Finalmente, a película é esterilizada em autoclave ou por irradiação com Co<sup>60</sup>.

#### 3.2.1.4. Blendas e compósitos de CB

As blendas são misturas físicas entre dois ou mais polímeros, enquanto que os compósitos são misturas de um polímero com qualquer outro material que funcione como carga, reforço, ou seja, os compósitos são constituídos por dois tipos de materiais individuais: a matriz e o material de reforço. A matriz atua como um andaime e suporta o material de reforço, enquanto que os reforços adicionam propriedades físico-químicas e biológicas à matriz.

Uma reação sinérgica gera propriedades que não estão presentes nos materiais individuais. A ampla gama de matrizes e materiais de reforço permite a síntese de vários materiais com propriedades otimizadas. Diversos materiais naturais e compostos foram usados ao longo da história; no entanto, o primeiro material composto produzido em escala industrial foi a fibra de vidro, que foi introduzida por Owens Corning, em 1935. A combinação de fibra de vidro com polímero plástico produziu uma estrutura muito mais forte que estabeleceu a fundação para a indústria de polímeros reforçados com fibras. Blendas de polímeros ganharam uma grande atenção devido às suas propriedades físico-mecânicas melhoradas e aplicações múltiplas relativas ao polímero *in natura*. Os materiais de reforço de natureza particular, tais como partículas de argila, óxidos metálicos, carbonatos e materiais fibrosos, por sua vez, não só reforçaram os polímeros, como também introduziram várias características biológicas aos compósitos poliméricos (SHAH et al., 2013).

Embora a celulose bacteriana possua propriedades únicas que fazem com que seja um polímero muito promissor em termos de aplicabilidade, existem algumas limitações ao seu uso, devido à falta de propriedades antibacterianas e falta de transparência óptica por exemplo (ESA et al., 2014). Pesquisas vem sendo feitas, na tentativa de eliminar essas limitações. Assim, blendas e compósitos de CB formados por misturas poliméricas ou por adição de materiais de reforço vêm sendo estudados. A celulose bacteriana possui uma natureza porosa devido à distribuição das fibras em sua composição, o que faz com que seja possível a adição de diversos materiais nesses poros. Os materiais adicionados podem conferir então, características físico-químicas e biológicas ainda mais significativas ao biopolímero (SHAH et al., 2013). A adição do composto de reforço pode se dar de duas maneiras diferentes: *in situ*, quando a inserção ocorre durante o cultivo da bactéria, com o composto difundindo do meio de cultura para a rede de fibras formada; e *ex situ*, quando o polímero é impregnado de aditivo após sua formação (ESA et al., 2014).

Durante a formação da membrana de CB no meio de cultura, é possível inserir diversos materiais no próprio meio para o desenvolvimento de blendas e compósitos à base de CB. Esta forma de obtenção de blendas ou compósitos pode ser considerada uma inserção "*in situ*", pois acontece durante o cultivo da bactéria, que insere materiais na sua rede de fibras

através da difusão dos mesmos no meio de cultura, levando à formação de estruturas com qualidades adicionais (ESA et al., 2014). As adições “*in situ*” vêm sendo bastante utilizadas na literatura. Essa possibilidade de inserção de materiais nas fibras de CB, não só através do cultivo, mas também com a membrana *in natura*, têm conduzido recentemente à uma multiplicação das pesquisas com a CB.

A CB pode ser produzida em diferentes tamanhos e formas, com aplicações nas áreas médica, de engenharia, na produção de papel, na indústria têxtil, na ótica, eletrônica, acústica, cosméticos, de produtos farmacêuticos, como pele artificial temporária para feridas e queimaduras, como produtos odontológicos, como vasos sanguíneos artificiais, na separação de DNA, como papel eletrônico, em aditivos para tintas, em revestimentos, como reforço para filmes opticamente transparentes, na nutrição, em produtos têxteis especiais e como embalagens (IGUCHI et al., 2000; KLEMM et al., 2001; SVENSSON et al., 2005; BÄCKDAHL et al., 2006; WANG et al., 2011; CAVKA et al., 2013; LI et al., 2015).

As aplicações mais promissoras de nanomateriais de celulose incluem pacotes de fibras leves e compósitos com excelentes propriedades de resistência e potencialmente algumas funcionalidades adicionais, modificação de propriedades reológicas de líquidos e suspensões em vários campos industriais, filmes transparentes como materiais de barreira, substratos para eletrônicos impressos e monitores eletrônicos, hidrogéis para aplicações médicas e aerogéis para filtragem e isolamento. Com base em patentes e análise de mercado, as aplicações de maior interesse industrial estão relacionadas a papel e embalagens, revestimentos, produtos farmacêuticos, compósitos e eletrônicos (KANGAS, 2014).

Várias aplicações promissoras da CB na área médica e farmacêutica vem sendo descritas. O tratamento de ferimentos crônicos como úlceras e escaras envolve a aplicação de diversos materiais (hidrocolóides, hidrogéis, membranas sintéticas ou biológicas) que propiciem um ambiente úmido para o ferimento de modo que a cura seja facilitada. O material ideal deve possuir características de pele artificial, tanto estruturalmente como funcionalmente (CHAWLA et al., 2009). As características esperadas de um material para este tipo de tratamento são: não-toxicidade, biocompatibilidade, não ser inflamável, habilidade de barreira perante infecções, habilidade de controle de perda de fluido, habilidade de redução de dor durante o tratamento, habilidade de manter umidade, permitir a introdução ou transferência de medicamentos para o ferimento, absorver secreções que ocorrem durante a cicatrização, apresentar alta capacidade mecânica, elasticidade e facilidade na cura da ferida (CHAWLA et al., 2009). A celulose bacteriana apresenta a porosidade necessária para permitir a transferência de antibióticos e outros medicamentos para o ferimento e consegue também funcionar como uma barreira física a entrada de corpos estranhos na ferida. Pode-se dizer que a CB satisfaz os requisitos necessários para ser considerado um curativo moderno para o tratamento de ferimentos (CZAJA et al., 2006).

A membrana XCell® é um biomaterial de celulose fabricada pela *Xylos Corporation* e está sendo usada para tratar pacientes que sofrem de úlceras venosas crônicas, provando ser mais eficaz do que os materiais convencionais no tratamento das anomalias cutâneas crônicas e muito eficaz em promover a remoção de tecidos mortos, na redução da dor, na reconstituição dos tecidos e na aceleração da cicatrização (CZAJA et al., 2007). Curativos de CB para queimaduras dérmicas profundas apresentaram resultados eficazes para a cicatrização de queimaduras (PIATKOWSKI et al., 2011).

A empresa *Nexfill* produz o curativo feito de biocelulose obtida da bactéria *G. xylinum*. Pesquisas sobre as propriedades do biomaterial possibilitaram a comercialização do Nexfill®, um curativo seco a base celulose bacteriana, atóxico e hipoalergénico utilizado em tratamentos de pele, desde queimaduras de segundo grau ou tratamentos de feridas úmidas com perda de pele, com ou sem sangramento, tratamento de úlceras crônicas ou de pressão, úlceras vasculares e diabéticas. A membrana apresenta elevada resistência ao rasgo e impede a contaminação micro-organismos patogênicos, acelera o processo de cicatrização e proporciona alívio imediato da dor e bloqueia a radiação ultravioleta (NEXFILL, 2016).

A empresa brasileira *Bionext* produz CB para aplicações médicas e utiliza a estirpe *Bionext*®'s. A empresa utiliza a técnica de compressão e aquecimento para secar as membranas que apresentam características de textura originais, apresentando diferentes espessuras de 20 a 500 µm (BIONEXT, 2016).

A *Gore-Tex*® é um biocompósito produzido a partir da mistura de CB, politetrafluoretileno (PTFE), uretano e nylon, e age com sucesso nas inflamações dentárias, promovendo uma significativa formação óssea. A CB associada ao PTFE é utilizada para tratar defeitos ósseos em regeneração tecidual localizada. O PTFE não poroso é uma barreira alternativa eficaz para o tratamento de defeitos ósseos (NANAMI et al., 2011).

Outra área interessante de pesquisa médica da CB é a engenharia de tecidos sanguíneos (Tissue Engineered Blood Vessels – TEBV), onde a membrana pode auxiliar no tratamento de doenças vasculares fornecendo pequenos enxertos no sistema circulatório favorecendo a circulação de sangue em vias obstruídas (BÄCKDAHL et al., 2006).

A celulose bacteriana encontra aplicações na área da elétrica devido ao caráter da sua estrutura fibrosa em rede formada por fibras manométricas. Em função de sua aparência semelhante ao papel, a CB está sendo pesquisada para utilização como papel eletrônico, preparando a folha de celulose como um condutor (ou semicondutor) elétrico mediante a deposição de íons em torno das microfibrilas e depois imobilizando corantes eletrocromicos dentro da microestrutura, apresentando vantagens como refletividade semelhante ao papel, flexibilidade, contraste e biodegradabilidade (CZAJA et al., 2007).

Cheng et al. (2009) indicam, em seus estudos com estirpes geneticamente modificadas de *Acetobacter xylinum* para produzir uma grande quantidade de gel de celulose

bacteriana, uma produção em grande escala utilizando 130 biorreatores de 1000 L de capacidade. De acordo com os autores, em 72 horas a produção em biorreator forneceria CB para a indústria de papel com redução de impactos ambientais mediante a diminuição das emissões de CO<sub>2</sub> e a preservação do reflorestamento.

Uma aplicação muito interessante do potencial de fibras de celulose bacteriana combinadas com nanopartículas metálicas é no seu uso como membranas trocadoras de prótons em células combustíveis. CB carregada com nanopartículas metálicas de Pd- e Pt- apresentaram grande potencial como oxidantes de hidrogênio em células combustíveis (EVANS et al., 2003; YANG et al., 2009). Evans et al. (2003) estudou paládio e celulose bacteriana, mostrando capacidade da mistura de catalisar a geração de hidrogênio quando a CB foi incubada com ditonito de sódio, gerando uma corrente elétrica a partir de hidrogênio num eletrodo de membrana utilizado como polieletrólito (GADIM et al., 2014).

Nogi et al. (2009) desenvolveram um painel reforçado, plano e transparente formado por um compósito de nanofibras de CB com resina acrílica de baixo coeficiente de expansão térmica. A eficácia deste compósito como substrato para um display plano foi comprovada sintetizando um diodo orgânico emissor de luz (OLED). O sistema exibiu eletroluminescência e apresenta alta capacidade para ser utilizado na síntese de displays comerciais.

Nos países asiáticos, principalmente nas Filipinas, a CB tem sido utilizada na forma de uma sobremesa nativa indígena chamada nata de côco, um glicídico obtido por fermentação estática utilizando a bactéria *G. xylinus* em leite de coco ou água de coco (DANESI; WOSIACKI, 1998; NUGROHO; AJI 2015). Após o cultivo da bactéria, a película espessa de celulose é lavada, fervida e cozinhada com xarope de açúcar para formar coquetéis e gelatinas. A referida sobremesa, servida na forma de cubos gelatinosos, possui textura suave, macia e de fácil mastigação, além de não possuir colesterol, possuir baixo teor de gorduras e calorias (ESA et al., 2014).

A CB também tem sido empregada na indústria de alimentos como embalagem para proteger e preservar os alimentos, especialmente em atendimento ao apelo ambiental para o uso de embalagens biodegradáveis. Nesse sentido, embalagens de CB têm sido desenvolvidas por serem resistentes à água e biodegradáveis. Por outro lado, o fato do polímero não possuir propriedades antibacterianas e antioxidantes faz com que seja necessária a formação de compósitos de CB/aditivos (TANG et al., 2012; SONIA; PRIYA DASAN, 2013; ARRIETA et al., 2014; GAO et al., 2014).

O papel obtido tanto por culturas estáticas quanto agitadas apresentaram propriedades de resistência à óleos, o que o torna útil na indústria de embalagens como um todo (SUWANNAPINUNT et al., 2007).

Na agricultura, Mohite e Patil (2014) estudaram o efeito da CB no solo e concluíram que o polímero aumenta a capacidade máxima de retenção de água pelo solo e que a porosidade também é influenciada diretamente pela presença do biopolímero.

A aplicação da CB como bioadsorvente tem sido investigada na remoção de metais pesados em função de suas propriedades como alta cristalinidade, alta capacidade de reter água, alta porosidade e resistência mecânica (REZAEI et al., 2005; MIN et al., 2011; ZHU et al., 2011).

Outra aplicação encontrada para CB é como matéria prima na produção de derivados de celulose, como carboximetilcelulose, hidroximetilcelulose, acetato de celulose e metil celulose (PATENTS, 2015).

A Tabela 5 apresenta algumas blendas e compósitos orgânicos e inorgânicos, bem como sua funcionalidade, aplicabilidade, o material de reforço e os autores que vem pesquisando essas inovações.

**Tabela 5.** Blendas e compósitos de celulose bacteriana e áreas de aplicação (ESA et al., 2014)

<b>Área de aplicação</b>	<b>Material de reforço</b>	<b>Função</b>	<b>Referências</b>
<b>Eletrônica</b>	Nanoplaquetas de grafite	Condutividade Elétrica	(ZHOU et al., 2013)
<b>Eletrônica</b>	Poli (ácido 4-estirenosulfônico)	Bateria Redox	(GADIM et al., 2014)
<b>Biomédica/Industrial</b>	Quitosana	Nanofilmes	(FERNANDES et al., 2009)
<b>Biomédica</b>	Hidróxiapatita	Engenharia de Tecido Ósseo	(TAZI et al., 2012)
<b>Biomédica</b>	Nanopartículas de Prata	Curativo Antimicrobiano	(ZHANG; FANG; CHEN, 2013)
<b>Biomédica</b>	Parafina	Suporte Ósseo	(ZABOROWSKA et al., 2010)
<b>Eletrônica</b>	Poliuretano	Filme Substrato de LED	(UMMARTYOTIN et al., 2012)

### 3.2.2. Polihidroxialcanoatos (PHAs)/ Polihidroxibutirato (PHB)

Os PHAs são poliésteres de origem natural, produzidos por uma larga variedade de bactérias a partir de materiais de reserva intracelular. Estão presentes no citoplasma das células sob a forma de grânulos rodeados por uma membrana (BUCCI, 2003).

Os PHAs são biodegradáveis, biocompatíveis e opticamente ativos e vêm sendo reconhecidos como potenciais substitutos para os plásticos convencionais derivados do petróleo (PRADELLA, 2006). Quando descartados, podem ser depositados nos aterros sanitários sem que interfiram na decomposição de outros materiais presentes no lixo. Podem ser misturados à matéria orgânica e aproveitados como fertilizantes, além de existir a possibilidade de serem reciclados (BUCCI, 2003).

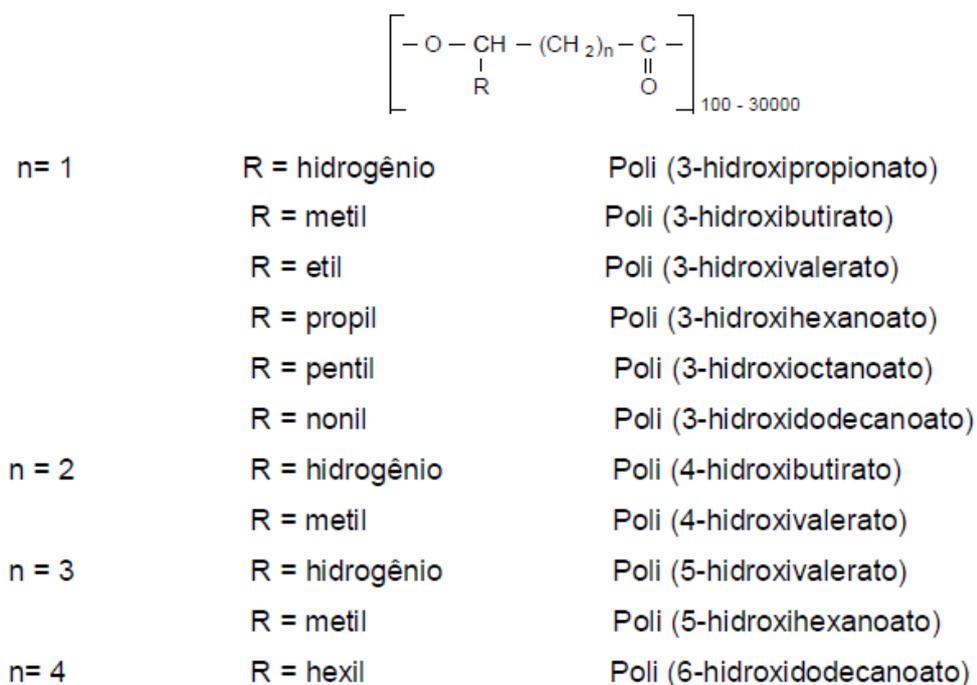
O alto custo do processo de produção do PHA, entretanto, o torna mais caro em comparação com os plásticos sintéticos derivado do petróleo. Esforços estão sendo realizados em todo o mundo para produzir produtos de menor custo através das seguintes estratégias: (a) utilização de estirpes microbianas adequadas para a obtenção de rendimentos elevados, (b) utilização de fontes de carbono e nitrogênio menos dispendiosas, (c) estratégias alternativas de fermentação, (d) construção de recombinantes potenciais para produzir PHA de cadeia curta (PHC), PHA de cadeia média ou copolímeros destas, (e) crescimento rápido e fermentações com alta densidade celular, (f) construção de recombinantes com vários genes de PHA sintase de PhaA, PhaB, PhaC, PhaJ, etc. para obter polímero de diferentes qualidades e (g) fácil recuperação de PHA (VIJAYENDRA; SHAMALA, 2013).

Cerca de 100 diferentes monômeros de alcanoato são encontrados como constituintes do PHA em diversas bactérias. Essa variedade traz como vantagem a possibilidade de poder sintetizar polímeros com as mais variadas propriedades (REDDY et al., 2003). A massa molar dos PHAs pode variar de 50.000 a 1.000.000 Da. O polihidroxibutirato (P3HB) constituído por monômeros de 3-hidroxibutirato, é o PHA mais bem caracterizado e o acumulado com maior frequência por bactérias, mas outros polímeros desta classe são produzidos por uma variedade de organismos: estes incluem poli-4-hidroxibutirato (P4HB), polihidroxi valerato (PHV), o Polihidroxihexanoato (PHH), o poli-hidroxioctanoato (PHO) e seus copolímeros (BUCCI, 2003).

Com base nas unidades monoméricas, os PHAs são classificados em: (1) PHA de cadeia curta, que consistem principalmente em monômeros contendo 4-5 átomos de carbono, como o PHB, que é um monômero de 4 átomos de carbono e (2) PHA de cadeia média, que contêm 6-14 átomos de carbono.

Os membros desta família, com a fórmula estrutural geral mostrada na Figura 4, podem apresentar grandes variações em suas propriedades, de plásticos rígidos e cristalinos, a plásticos flexíveis com boas propriedades de impactos, a fortes elastômeros, o que depende

do tamanho do grupo alquila, R, bem como da composição do polímero (CHANDRA; RUSTIGI, 1998).



**Figura 4.** Estrutura geral dos PHAs (VIEGAS, 2005)

Os PHAs são acumulados como grânulos intracelulares a níveis que alcançam 90% do peso seco das células e parecem desempenhar um papel como dissipadores de carbono e equivalentes de redução, ou seja, a produção ocorre em resposta a condições de estresse fisiológico, principalmente em condições nas quais os nutrientes são limitados. O polímero é principalmente um produto de assimilação de carbono (a partir de glicose ou amido) e é empregado por micro-organismos como uma forma de molécula de armazenamento de energia a ser metabolizado quando outras fontes de energia comuns não estão disponíveis. Várias vias estão envolvidas na síntese de PHA por espécies específicas. A biossíntese microbiana de PHB começa com a condensação de duas moléculas de acetil-CoA para dar acetoacetil-CoA que é posteriormente reduzida a hidroxibutiril-CoA. Este último composto é então utilizado como monômero para polimerizar PHB. Os PHAs também são obtidos por vias de síntese de ácidos graxos ou de degradação de ácidos graxos em que uma grande variedade de substratos é utilizada para a produção do polímero. Cerca de 300 espécies de micro-organismos produzem PHA. Destes, *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacterium* sp., *Bacillus* spp., *Methylobacterium* sp., *Pseudomonas oleovorans* e

*Rhizobium* spp. podem produzir quantidades substanciais de PHA (VIJAYENDRA; SHAMALA, 2013).

O poli-3-hidroxi-butirato (PHB) (com o grupo alquila  $R=CH_3$ ) pertence ao grupo dos PHAs de cadeia curta, com monômeros contendo de 4 a 5 átomos de carbono. A empresa *Imperial Chemical Industrie* (ICI), desenvolveu e patenteou, em 1981, um processo de manufatura de PHB, baseada na fermentação de açúcares pela bactéria *Alcaligenes eutrophus* (BUCCI, 2003; GHANBARZADEH; ALMASI, 2013).

O PHB possui propriedades termoplásticas, que lhe permite ser moldado ou transformado em filmes para aplicações diversas. São utilizados em várias áreas, agricultura, marinha, apresentação de remédios e nos ramos de embalagens de alimentos, fármacos e produtos de higiene pessoal e, por serem biocompatíveis, têm potencial para aplicações médico-veterinárias, como suturas, suportes de culturas de tecido para implantes, encapsulação de fármacos para liberação controlada. (BUCCI 2003; ASSIS, 2009).

O PHB no estado sólido é um material semicristalino, apresentando uma fase cristalina e outra amorfa. O grau de cristalinidade em filmes de PHB cristalizados a partir do estado fundido pode variar entre 60 e 90%. Este caráter semicristalino é responsável por todas as propriedades físicas e mecânicas desse polímero (TADA, 2009). A massa molar do PHB produzido por bactérias está na faixa de 10.000 a 3 .000.000 (NASCIMENTO, 2001).

O PHB já é comercializado sob diferentes nomes comerciais, como Biocycle, Biomer, Enmat, Mirel, Nodax ou Biopol. O PHB tipo P226, de Biomer, por exemplo, mostra uma resistência à tração de 24-26 MPa, módulo de elasticidade de 1.7-2.0 GPa e um alongamento à ruptura abaixo de 9%, sendo um material rígido e quebradiço. Esse comportamento pode ser correlacionado com sua alta cristalinidade, perto de 60% (MATWEB, 2016).

A transição vítrea em um polímero semicristalino corresponde à mudança do estado vítreo para o estado líquido, em sua fase amorfa (CANEVAROLO, 2010). A temperatura na qual ocorre a transição vítrea é denominada temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). Em temperaturas abaixo da  $T_g$ , os segmentos de cadeia e grupos pendentes apresentam mobilidade restrita e acima da  $T_g$ , as moléculas poliméricas apresentam mobilidade translacional, além dos graus de liberdade rotacionais e vibracionais (CANEVAROLO, 2010). A  $T_g$  de polímeros semicristalinos relaciona-se com variáveis as experimentais (preparação da amostra, história térmica, taxa de aquecimento ou resfriamento), os parâmetros moleculares (taticidade, massa molar, ramificações, etc.), com o grau de cristalinidade. A  $T_g$  do PHB está em torno de 4 – 5° C, e está diretamente relacionado à sua massa molar e ao seu grau de cristalinidade (NASCIMENTO, 2001; TADA 2009)

A alta cristalinidade associada à  $T_g$ , também, relativamente alta faz com que os filmes de PHB sejam muito frágeis, dessa forma, são preferíveis copolímeros com unidades contendo outros grupos alquila (especialmente  $R=C_2H_5$ ) (GHANBARZADEH; ALMASI, 2013).

Dentre as propriedades do PHB estão (JACQUEL et al., 2007; TOKIWA et al., 2009): (a) insolubilidade em água e relativamente resistente à degradação hidrolítica. Isto diferencia o PHB da maioria dos outros plásticos biodegradáveis atualmente disponíveis, que são ou solúveis em água ou sensíveis à umidade; (b) boa permeabilidade ao oxigênio; (c) boa resistência ultra-violeta mas fraca resistência a ácidos e bases; (d) solubilidade em clorofórmio e outros hidrocarbonetos clorados; (e) biocompatibilidade e, portanto, adequado para aplicações médicas; (f) ponto de fusão de 175°C e temperatura de transição vítrea de 2°C; (g) resistência à tração 40 MPa, próximo do polipropileno; (h) afunda-se na água (enquanto o polipropileno flutua), facilitando sua biodegradação anaeróbia nos sedimentos; (i) não tóxico e (j) menos "pegajoso" quando derretido, tornando-se um material potencialmente atrativo para roupas no futuro.

O PHA pode ser introduzido em películas e filmes (BABEL et al., 1990). Ao contrário do alumínio, que não é biodegradável, o filme de PHA é uma alternativa à folha de alumínio na preparação de caixas de papel resistentes à água ou papelão, tornando-o completamente biodegradável (LAUZIER et al., 1993). A propriedade de barreira de gás do PHA é explorada na preparação de papel revestido e películas, que podem ser utilizados para produzir cartões para embalagem de leite, enquanto que a propriedade de barreira à umidade é útil na concepção de fraldas e toalhas sanitárias juntamente com algumas aplicações em filmes hospitalares especiais (HOCKING; MARCHESSAULT, 1994). O PHA pode ser moldado por sopro em várias formas (SATKOWSKI et al., 2010). O PHA tem aplicações em vários campos, tais como embalagens, impressão e fotografia, processamento de plásticos, têxteis, indústrias de química fina, biocombustíveis, indústria da saúde, purificação de proteínas e distribuição específica de fármacos, etc. (PHILIP et al., 2007; KABILAN et al., 2012).

Os filmes de PHA estão sendo utilizados como suportes biodegradáveis para fertilizantes e embalagens de herbicidas. No campo médico, o PHA é utilizado na preparação de produtos de higiene feminina descartáveis, suturas, pinos ortopédicos, curativos cirúrgicos, materiais de suporte em vasos sanguíneos (extentes), implantes de células oculares, substitutos da pele, hemostáticos e substitutos da medula óssea e como transportador biodegradável na liberação de fármacos. Alguns outros usos do PHA incluem filmes de embalagens, recipientes e utensílios descartáveis de alimentos, lâminas de barbear, fraldas, produtos de higiene feminina, frascos de xampu, recipientes de cosméticos, xícaras, etc. (CHEN, 2009). Alguns destes produtos foram comercializados pela *Proctor and Gamble*, *Biomers*, *Metabolix* e várias outras empresas (CLARINVAL; HALLEUX, 2005).

A propriedade de absorção de óleo da película de PHA pode ser explorada para aplicação comercial em produtos cosméticos para a preparação de películas de transferência de óleo (SUDESH et al., 2007). As principais vantagens dos PHAs são sua natureza biodegradável, biocompatibilidade e capacidade de formação de filme com propriedades

semelhantes ao polipropileno. Além da fundição em filmes, também pode ser usado em processos de termoformação e extrusão por fusão para revestir papel e cartão. Para melhorar as propriedades mecânicas das películas de PHA, prepararam-se misturas poliméricas de PHA produzidas por *E. coli* recombinante utilizando glicerol, polietilenoglicol (PEG) e acetato de polivinila (PVA), individualmente, na proporção de 1:1, sendo estas películas avaliadas por espectroscopia de infra-vermelho com transformada de fourrier (FTIR) e Microscopia eletrônica de varredura (MEV) (SHAMALA et al., 2009).

Entre estes, a película da mistura de P(HB-co-HV):PVAc apresentou a mais elevada resistência à tração, de 7,1 MPa e uma percentagem de alongamento de 180%, enquanto que a película controle de P(HB-co-HV) teve uma resistência à tração de 28 Mpa e alongamento de 14%. No entanto, a película de P(HB-co-HV):PEG apresentou a menor resistência à tração, de 1,6 Mpa, e a mistura P(HB-co-HV):glicerol apresentou o menor alongamento (18%). Uma combinação de películas de PHA e PLA, que têm uma taxa de transmitância de dióxido de carbono relativamente elevada, pode ser utilizada para picar blocos de queijo ou PHA e PLA também podem ser utilizados para preparar garrafas moldadas por sopro, caixas, recipientes e copos para embalar bebidas não carbonatadas (WEBER et al., 2002). As potenciais aplicações comerciais do polímero PHA foram revistas (ORTS et al., 2008). Como o calor de combustão dos ésteres metílicos de PHA (20-30 kJ/g) é muito próximo do etanol (27 kJ/g), ele pode ser usado como biocombustível e a adição de 10% dos ésteres aumenta o calor de combustão do etanol de 30 a 35 kJ/g (CHEN, 2009). Verificou-se que o PHA é um material alternativo adequado para a concepção de vários dispositivos para aplicação médica, tais como implantes cardíacos, suturas, malhas, andaimes de engenharia de tecidos e microesferas para administração de fármacos (BRIGHAM; SINSKEY, 2012).

### **3.3. BLENDA DE CB E PHB**

As blendas baseadas em películas CB e diferentes biopolímeros atraíram uma atenção crescente nos últimos anos por seu potencial de aplicação na biomedicina e engenharia. O método de impregnação, que envolve a imersão da película de CB em uma solução de polímero, foi relatado por diferentes autores como uma abordagem para a preparação de polihidroxialcanoatos/compostos de CB (BARUD et al., 2011; ZHIJIANG et al., 2011). Uma troca anterior de solvente da película de CB é necessária para substituir a água por um solvente adequado.

As membranas de blendas foram preparadas por Barud et al. (2011) por imersão da membrana inchada de CB em solução de PHB com diferentes concentrações em clorofórmio. As imagens de microscopia eletrônica de varredura revelaram que a membrana de CB foi

revestida homoganeamente pelo polímero e sugeriu que a solução de PHB penetra nos poros de CB e precipita como micropartículas dentro da rede de microfibrilas da CB. O conteúdo relativo de PHB cristalino aumentou significativamente para amostras com mais de 50% em peso de PHB. Este método levou a membranas de blendas CB/PHA com estrutura de fibra mais densa e propriedades mecânicas melhoradas, que foram explicadas pela boa adesão interfacial e pelas fortes interações entre CB e PHB. Uma blenda constituída por PHB e CB foi preparada pela impregnação de uma película úmida de CB em uma solução de PHB em clorofórmio e liofilização por vários dias, de modo a obter um material poroso (ZHIJIANG et al., 2011).

O efeito de reforço foi demonstrado pelo aumento da resistência à tração com mais de 100% comparado ao PHB puro. A investigação morfológica por microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo (FESEM) revelou uma boa dispersão das nanofibrilas de CB em PHB. As nanofibrilas de CB favoreceram a cristalização do PHB, observando-se maior cristalinidade do PHB em blendas. Os testes de biocompatibilidade, usando células de fibroblasto de pulmão de hamster chinês mostraram uma melhor adesão celular das blendas de PHB/CB em comparação com o PHB puro. Em outro trabalho, os autores relataram a preparação de filmes de PHB/CB altamente transparentes, usando o mesmo procedimento, mas a partir de películas de BC secas e mantendo a CB impregnada com solução de PHB à temperatura ambiente até a evaporação completa do clorofórmio (ZHIJIANG; GUANG, 2011).

A alta transparência da blenda foi explicada pela boa homogeneidade das esferas de CB e nanofibrilas de CB, ambas menores que o comprimento de onda dos raios visíveis. O composto foi termicamente mais estável do que o PHB puro, mostrando um aumento da temperatura de decomposição em 55°C. A resistência à tração, o alongamento à ruptura e o módulo de Young foram reforçados em 150, 300 e 120%, respectivamente, em comparação com o PHB. Blendas com melhores características para aplicações para curativos ou para engenharia de tecidos foram preparadas a partir de poli(3-hidroxi butirato-co-4-hidroxi butirato) (P (3HB-co-4HB)) e películas secas de CB, em proporção igual, por dissolução em ácido trifluoroacético e liofilização da solução (ZHIJIANG et al. , 2012). A investigação revelou uma rede tridimensional e uma estrutura altamente porosa para a blenda, que mostrou propriedades mecânicas muito melhores (resistência à tração e módulo de Young) em comparação com a matriz pura. A adição de CB levou à maior taxa de biodegradação, como resultado dos testes realizados em soluções tampão, e à melhor biocompatibilidade, como afirmado nos estudos de adesão celular. Os compostos preparados por imersão de uma película de gelatina em CB em 5% em peso de solução de PHBV no clorofórmio foram investigados como materiais para aplicações médicas (ZAHARIA et al., 2014).

### 3.3.1. Blendas formadas por microcristais/nanofibras de CB

Uma boa dispersão de CB na matriz polimérica é obrigatória para obter blendas com propriedades melhoradas, embora isso seja muito difícil de se alcançar devido às fortes ligações inter e intra-moleculares em cada componente. Além disso, o caráter altamente hidrofílico da CB dificulta sua dispersão na matriz de PHA, que é de natureza hidrofóbica. A desintegração física seguida da modificação química da película de CB é uma rota promissora para tornar ambos os componentes mais compatíveis.

Nanoblendas com propriedades mecânicas melhoradas foram obtidas por um método de substituição do solvente a partir de poli (3-hidroxoctanoato) (P (3HO)) e microcristais acetilados de CB (BASNETT et al., 2012). As películas de CB úmidas foram desintegradas mecanicamente usando um liquidificador e tratadas com ácido sulfúrico para obter microcristais de CB. A água foi completamente removida da suspensão de microcristais de celulose por adição sucessiva de ácido acético anidro seguida de separação centrífuga. Os microcristais de CB foram quimicamente modificados com anidrido acético e, em seguida, adicionados em uma solução de P(3HO) em clorofórmio. Um aumento de 10 vezes no módulo de Young foi observado no composto com 25% de microcristais. A modificação química dos microcristais de CB diminui sua hidrofiliidade, conforme demonstrado pelas medidas do ângulo de contato, melhorando a compatibilidade com a matriz P(3HO). Blendas com CB mostraram maior taxa de degradação e proliferação celular em comparação com a matriz pura (BASNETT et al., 2012).

Nanoblendas do copolímero de PHBV (7 e 40% de conteúdo de valerato) e 1,3% em peso de *pellets* de CB, obtidos por hidrólise ácida de películas molhadas moídas e troca de solvente em clorofórmio, foram preparadas por fundição em solução usando clorofórmio como solvente (MARTINEZ- SANZ et al., 2014). Nenhuma melhoria das propriedades mecânicas do PHBV foi observada após a adição de *pellets* de CB, mas a estabilidade térmica e as propriedades de barreira de água e oxigênio para o nanoblenda com baixa quantidade de CB melhoraram (MARTINEZ-SANZ et al., 2014).

Por outro lado, Ruka et al. (2014) relataram uma boa dispersão de nanofibras de 2% em peso de CB na matriz de PHB, utilizando nanofibras produzidas pela sonicação de películas de CB em clorofórmio. Em seguida, não foram obtidos filmes compostos por solução misturando PHB com nanofibras de BC em clorofórmio e posterior moldagem. A incorporação de nanofibras de CB bem dispersas levou à melhoria significativa das propriedades mecânicas, em comparação com o PHB puro, um aumento de 43% da resistência e de 59% do módulo de tração (RUKA et al., 2014).

Em um trabalho mais recente, Martinez-Sanz et al. (2015) relataram uma melhor dispersão de *pellets* de CB no PHBV ao combinar as técnicas de *eletrospinning* e mistura por

fusão. Os pellets de CB foram incorporados em dois tipos de PHBV (com 9% e 16% de hidroxivalerato), sintetizados por fermentação microbiana utilizando resíduos da indústria alimentar e em um PHBV comercial com 3% de hidroxivalerato. Os nanocompositos exibiram propriedades de barreira melhoradas, mas não se observou aumento significativo de propriedades mecânicas. As nanofibras de CB também foram obtidas pela desfibrilação da película de CB usando um método verde. Os filmes feitos pela técnica de fundição da solução, de PHB e CB desfibrilados melhoraram a adesão e proliferação celular em comparação com PHB puro (PANAITESCO et al., 2016).

### **3.3.2. Síntese *in situ* e *ex situ* de blendas de CB/PHB**

Ruka et al. (2013) relataram pela primeira vez a preparação de nanoblendas de BC pela adição de diferentes concentrações de PHB diretamente no meio de cultura de celulose bacteriana. A formação do composto CB / PHB foi confirmada pelo aumento significativo do peso da película com o aumento da concentração de PHB e pelos resultados da análise de FTIR. Isso também foi suportado pelas imagens de SEM, mostrando PHB tanto na superfície de fibrilas BC como incorporadas na rede de celulose. Embora os testes de tração realizados em puro pellicle de BC e BC / PHB apresentaram diminuição da resistência à tração e do módulo após a adição de PHB, esta via é promissora na obtenção de blendas de BC diretamente do estágio de cultura (RUKA et al., 2013).

A polimerização por enxerto de PHB na CB em presença de uma lacase de fungo, como ferramenta de enxerto, ou na sua ausência, foi relatada por Iqbal et al. (2014). A investigação morfológica mostrou uma dispersão homogênea de PHB na rede da CB, preenchendo completamente os espaços entre as nanofibras, no caso da blenda injetada assistida com lacase e uma estrutura menos homogênea na ausência de lacase. O reforço com a CB hidrofílica aumentou a tensão superficial da matriz polimérica, conforme esperado. A CB teve uma boa influência sobre as propriedades térmicas e mecânicas da matriz de PHB, mas ambos as blendas (com ou sem lacase) apresentaram pouca resistência à tração e módulo em relação à CB. A análise dos resultados publicados sobre blendas de PHA/BC indicou resultados promissores, mas também a necessidade de pesquisas para encontrar novas soluções para melhorar nas propriedades mecânicas e térmicas do PHA usando CB, bem como para diminuir os custos de fabricação (PANAITESCO et al., 2016).

## **3.4. ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO DA ÍNDIA**

A alimentação pode ser um veículo direto de diversos patógenos ou toxinas indesejáveis, e para evitar o contato ou a propagação de micro-organismos em alimentos são

utilizados conservantes sintéticos que podem trazer riscos à saúde (MOREIRA et al., 2005; POLÔNIO; PERES, 2009), além de apresentarem possível desenvolvimento de resistência por parte das bactérias (BERALDO et al., 2013). Por conta da disseminação da informação sobre o mal que pode ser causado por esses conservantes sintéticos, alguns produtos tiveram sua aceitação reduzida no mercado (MOREIRA et al., 2005).

Com essa rejeição mercantil, produtos de origem natural, como óleos essenciais, ganharam espaço no mercado e conseqüentemente na indústria. Isto decorre do fato de algumas espécies vegetais possuírem óleos com ações flavorizantes, com ações antibacterianas e antioxidantes (SILVESTRE et al., 2010), que de acordo com Tepe et al. (2004), a busca por novos agentes antimicrobianos e antioxidantes já acontece há muitos anos, por conta da resistência dos micro-organismos aos conservantes sintéticos. Essa busca por agentes naturais levou a intensificação de estudos de algumas espécies de vegetais antes não muito conhecidas, mas muitas vezes com ação já comprovada pela utilização popular.

Os óleos essenciais exercem diversas funções importantes, e podem ser extraídos de várias partes das plantas (folhas, flores, troncos,...) (LIMA et al., 2006). Os componentes químicos dos óleos essenciais incluem diferentes estruturas, como: terpenos, sesquiterpenos, fenólicos, fenilpropanóicos, alifáticos não-terpênicos, heterocíclicos, álcoois, cetonas, aldeídos, ácidos carboxílicos, ésteres e acetatos; cada um com sua característica aromática e ação bioquímica específicas. Existem registros da utilização dos óleos essenciais no antigo Egito, bem como na Idade Média e perpassando pelo início do século XX, por meio de tratados de Aromaterapia. Atualmente, novas nomenclaturas como Aromacologia e Aromatologia têm evidenciado a ação dos óleos essenciais como bactericida, analgésica, sedativa, estimulante, antifúngica, antipruriginosa, antidepressiva, repelente de insetos, entre outras (WOLFFENBUTTEL, 2007).

Os óleos essenciais são distinguidos quimicamente como combinações complexas de compostos de baixo peso molecular, sendo alguns extremamente voláteis. Boa parte das características farmacêuticas descritas para plantas medicinais são atribuídas aos óleos essenciais, que são encontrados em estado líquido à temperatura ambiente, com aparência incolor ou clara. Essas substâncias não se misturam à água e podem ser retiradas por diferentes processos, sendo os mais comuns: enfloração (*enflurage*), destilação por arraste de vapor d'água, prensagem, extração com solventes orgânicos (de forma contínua ou descontínua) e extração por dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) supercrítico (PROBST, 2012). Apesar de serem constituídos de diversos componentes químicos, os óleos essenciais geralmente apresentam uma substância majoritária, que representa a maior parte de sua composição (MAIA; DONATO; FRAGA, 2015)

Dentre os óleos essenciais, destaca-se o proveniente do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), que ganhou notoriedade em vários setores por conta da sua diversidade de utilização, que vai desde a culinária à medicina. O cravo faz parte da família das Mirtáceas e é originário das ilhas Molucas, na Indonésia. Também é conhecido como craveiro-da-índia, cravina-de-tunis, cravo-de-cabecinha, cravoária e rosa-da-índia, e sua utilização teve grande importância na antiguidade, sobretudo, na culinária, em condimentos e temperos. Seu óleo essencial possui efeito anti-inflamatório, anestésico, cicatrizante, anti-séptico e também pode agir no tratamento de infecções por fungos e outros micro-organismos (UFSC, 2012).

Sendo compostos voláteis, as técnicas para seu estudo e identificação de seus compostos mais utilizada são a cromatografia gasosa com detector de massas e por ionização de chama (AFFONSO et al., 2014). A partir destas técnicas pode-se extrair os componentes dos óleos, bem como determinar suas concentrações. Oliveira et al (2009) ao extraírem o óleo essencial dos botões florais, folhas verdes, folhas secas em estufa, pedúnculos e folhas secas ao sol do cravo-da-índia identificaram que o óleo essencial de cravo da Índia é composto de 80 a 90% de eugenol,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, acetato de eugenila e óxido de cariofileno, com variações das quantidades de cada composto a depender da parte da planta analisada, sendo o  $\beta$ -cariofileno o segundo componente principal (cerca de 10%) na maioria das partes e o acetato de eugenila nos botões florais secos. Ribeiro (2010), utilizando a técnica com detector de massas para identificação e quantificação do óleo de cravo, encontrou valores de 52,53% de eugenol, 37,25% de cariofileno, 4,11% de humuleno, 4,05% de acetato de eugenila e 2,05% de copaneol, já Matan et al. (2006) encontraram concentrações 70 a 80% de ácido cinâmico e 4 a 7% de eugenol.

A ação antimicrobiana do óleo essencial do cravo-da-índia é discutida e cientificamente comprovada em vários trabalhos (ASCENÇÃO; FILHO, 2013; BERALDO et al., 2013; AFFONSO et al., 2014), onde todos eles associam os princípios ativos do óleo a presença do alilbenzeno chamado de eugenol, componente majoritário do óleo de cravo e outras especiarias, porém o efeito depende da concentração de eugenol livre e do tempo de exposição do tecido ao composto (AFFONSO et al., 2014; SOUZA, 2007). A utilização do eugenol não está ligada apenas ao uso literal dessa substância, mas outros alilbenzenos como o safrol, metileugenol e a vanilina, que podem ser obtidos a partir do eugenol.

Binatti et al (2016) analisando a ação antimicrobiana de diversas especiarias concluíram que o cravo-da-índia forneceu o melhor resultado, inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* e *S. typhimurium*. Moreira et al. (2005), observaram que o OE de *S. aromaticum* possui ação bactericida e bacteriostática sob *Escherichia coli*. Silva et al. (2009) comprovaram a ação bactericida dos óleos de cravo-da-

índia, capim cidreira e canela, os quais foram capazes de zerar a contagem de colônias de *E. coli* ao final de 24 horas de experimentação. Além de agirem nas bactérias o óleo de *S. aromaticum* também apresenta ação sobre leveduras (HAMMER et al., 1999) e fungos filamentosos (SOUZA et al., 2004; VIEGAS et al., 2005).

O mecanismo de ação da propriedade antibacteriana do eugenol é explicado pela capacidade que essa substância apresenta de adentrar na membrana citoplasmática bacteriana e causar danos a mesma. O eugenol consegue alterar a permeabilidade da membrana, possibilitando a entrada de solutos, vazamento de íons e grande perda de componentes celulares. Além disso, o eugenol colapsa a integridade da membrana que libera proteínas intracelulares e bloqueando o crescimento celular bacteriano, o que diminui a probabilidade das bactérias gerarem algum mecanismo de resistência (DEVI et al., 2010). O fator estrutural que explica essa atividade antimicrobiana do eugenol é à presença de uma dupla ligação nas posições  $\alpha$ ,  $\beta$  da cadeia lateral e a um grupo metila localizado na posição  $\gamma$ . Geralmente, bactérias gram-negativas são mais resistentes a óleos essenciais com características antimicrobianas. Contudo, El-Baky e Hashem (2016) relataram que o óleo essencial de cravo-da-índia apresentou maiores efeitos contra bactérias gram negativas quando comparado com outros óleos essenciais. Além disso, esses autores demonstraram que a concentração mínima inibitória do óleo do cravo da índia é menor, quando comparado com outros óleos. O que mostra a versatilidade de possíveis atividades dos princípios ativos desse óleo, mesmo em pequenas quantidades.

As ações antifúngicas do eugenol estão ligadas a ações inibitórias na formação dos tubos germinativos dos fungos, onde o eugenol inibe completamente a formação das hifas fúngicas. Contudo, essa ação inibitória depende da dose utilizada (EL-BACKY; HASHEM, 2016). Sendo assim, o óleo essencial do cravo-da-índia pode ser utilizado como agente complementar aos produtos que atuam na preservação dos alimentos, com o intuito de inibir e controlar o desenvolvimento de micro-organismos, prolongando a conservação do alimento e diminuindo o risco de infecções alimentares.

### **3.5. PERSPECTIVAS DAS BLENDS DE CB E PHB PARA USO INDUSTRIAL**

O futuro potencial para a BC está muito além das aplicações hoje existentes, especialmente se as pesquisas forem capazes de desenvolver processos para a produção em grande escala a partir de matérias-primas de baixo custo ou utilizando resíduos agroindustriais.

A substituição da CV pela CB trará, no futuro próximo, avanços tecnológicos, ambientais, econômicos e sociais no sentido de permitir a aplicação de um novo insumo biotecnológico, de possibilitar a recuperação ambiental através do fim do desmatamento e do consequente reflorestamento de espécies nativas, de movimentar o mercado através das inúmeras aplicações industriais e de propiciar o bem-estar e a qualidade de vida à população mundial.

Espera-se, de acordo com Donini et al., (2010), que um novo enfoque seja permitido para esse produto oriundo da biotecnologia de micro-organismos, igualmente ao que ocorreu na década de 70 com o apoio governamental ao pró-álcool, através da utilização de *Saccharomyces cerevisiae* na produção de etanol, permitindo a criação de uma área em pleno desenvolvimento nacional.

No tocante ao desenvolvimento de compósitos e blendas de CB para uso em embalagens, a sustentabilidade exige um bom equilíbrio entre as questões ambientais, econômicas e sociais. Os biopolímeros podem ser considerados sustentáveis em termos de fornecimento de materiais, água e energia e geração de resíduos. Além disso, a viabilidade dos produtos, os recursos humanos e o desenvolvimento tecnológico também devem ser ponderados sob um ponto de vista de sustentabilidade. Os produtos biodegradáveis são geralmente mais caros do que os polímeros fabricados a partir de produtos petroquímicos, mas esta circunstância está mudando gradualmente, seja pela colheita de materiais, processamento e tecnologias de conversão, bem como economias de escala. Com as crescentes demandas de plástico no mundo, as preocupações dos consumidores com o meio ambiente e o uso de produtos ecológicos cresceram. Além disso, foram implementadas novas regulamentações, nomeadamente nos países da União Européia, restringindo a utilização de materiais tradicionais, o que levou a um grande desenvolvimento em materiais de embalagem biodegradáveis (CRUZ-ROMERO; KERRY, 2008). Tais acontecimentos constituem as bases para o desenvolvimento dos produtos biotecnológicos como a CB.

No Brasil, a produção de PHB se beneficiou da presença e abundância de substratos de baixo custo fornecidos pela indústria sucroalcooleira (TADA, 2009). O atrelamento da produção de PHB com a produção em usina sucroalcooleira junto com todas as suas vantagens (substrato de baixo custo, energia, solventes para extração, etc) permitiu que o custo de produção do PHB pela PHB Industrial seja o menor do mundo. Porém, esse preço ainda é superior aos preços dos polímeros sintéticos provenientes da indústria petroquímica, o que dificulta a ampla comercialização do PHB (SQUIO; ARAGÃO, 2004).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFONSO, R. S.; LESSA, B.; SLANA, G. B. C. A.; BARBOZA, L. L.; ALMEIDA, F. V.; LIMA, A. L. S.; SOUZA, F. R.; FRANÇA, T. C. C.. Quantificação e Caracterização dos Principais Componentes do Extrato Etanólico de Cravo-da-Índia *Syzygium aromaticum* [L] Merr. et Perry. **Revista Virtual de Química**, v.6, n.5, p.1316-1331, 2014. DOI: 10.5935/1984-6835.20140086
- ALMEIDA, D. M. **Biofilme de blenda de féculas de batata e cellulose bacteriana na conservação de fruta minimamente processada**. 2010. 283f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos Agroindustriais) - Pós Graduação em Processos Biotecnológicos Agroindustriais. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- AMERICAN CHEMISTRY CONCIL. Lifecycle of a plastic product. Available online: <http://plastics.americanchemistry.com/Life-Cycle#uses> (accessed on 2 December 2015).
- ANDRADE, F. K.; PERTILE, R. A. N.; DOURADO, F.; GAMA, F. M. Bacterial cellulose: properties, production and applications. **Nova Science Publishers**, p. 427 - 458, 2010.
- ANTÔNIO, R. V.; RECOUVREUX, D. O. S.; NAZARIO, A. C.; TIMBONI, D.; FERRARINI, E.; RODOWANSKI, G. P.; CAUDURO, M. T.; PERES, S. S. Produção de celulose bacteriana a partir de diferentes substratos. 2012. In: **Simpósio de Integração Científica e Tecnológica do Sul Catarinense**. Revista Técnico Científica, v. 3, n. 1, 2012.
- AROMALÂNDIA – **Óleos essenciais**. (2002). Disponível em: <<http://aromalandia.isonfire.com>>, acesso em: 25 jan. 2018.
- ARRIETA, M. P. FORTUNATI, E.; DOMINICI, F.; RAYON, E.; LOPEZ, J.; KENNY, J.M. PLA-PHB/cellulose based films: Mechanical, barrier and disintegration properties. **Polymer Degradation and Stability**, v. 107, p. 139–149, 2014. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2014.05.010
- ASCENÇÃO, V. L.; MOUCHREK FILHO, V. E. Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (CRAVO DA ÍNDIA). **CAD. PESQ.**, São Luís, v.20, n.especial, p.137-144, 2013
- ASHTAVINAYAK, P.; ELIZABETH, H. A. Review: Gram Negative Bacteria in Brewing. **Advances in Microbiology**. v. 6, p. 195 - 209, 2016. DOI: 10.4236/aim.2016.63020
- ASSIS, E. C. **Embalagens alimentícias produzidas em polihidroxido butirato (PHB), como alternativa ao gerenciamento dos resíduos sólidos urbanos**. 2009, 96f, Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnólogo em Produção) – Faculdade de Tecnologia da Zona Leste, São Paulo, 2009.
- ASTM D5488-94de1. **Standard Terminology of Environmental Labeling of Packaging Materials and Packages** (Withdrawn 2002); ASTM International: West Conshohocken, PA, USA, 1994; Available online: [www.astm.org](http://www.astm.org).

BABEL, W.; RIIS, V.; HAINICH, E. Mikrobelle thermoplaste: biosynthese, eigenschaften und anwendung. **Plaste UndKautschuk**, v. 37, p. 109–15, 1990. DOI: 10.1007/BF02257247

BÄCKDAHL, H.; HELENIUS, G.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; JOHANSSON, B.R.; RISBERG, B.; GATENHOLM, P. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 2141–2149, 2006. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.10.026

BARUD, H. S. **Materiais multifuncionais baseados em celulose bacteriana**. 2010. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

BARUD, H. S.; RIBEIRO, C. A.; CRESPI, M. S.; MARTINES, M. A.; DEXPERTGHYS, J.; MARQUES, R. F. C.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Thermal characterization of bacterial cellulose-phosphate composite membranes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, n. 3, p. 815 - 818, 2007. DOI: 10.1007/s10973-006-8170-5

BARUD, H.S.; SOUZA, J.L.; SANTOS, D.B.; CRESPI, M.S.; RIBEIRO, C.A.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S.J.L. 2011. Bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) composite membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1279–1284, 2011. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.09.049

BARUD, H.S.; SOUZA, J.L.; SANTOS, D.B.; CRESPI, M.S.; RIBEIRO, C.A.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S.J.L. 2011. Bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) composite membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1279–1284, 2011.

BASNETT, P.; KNOWLES, J.C.; PISHBIN, F.; SMITH, C.; KESHAVARZ, T.; BOCCACCINI, A.R.; ROY, I. Novel biodegradable and biocompatiblepoly(3-hydroxyoctanoate)/bacterial cellulose composites. **Advances in Engineering Materials**, v. 14, p. 330–343, 2012. DOI: 10.1002/adem.201180076

BERALDO, C.; DANELUZZI, N. S.; SCANAVACCA, J.; DOYAMA, J. T.; FERNANDES JÚNIOR, A.; MORITZ, C. M. F. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.43, n.4, p.436-440, 2013. DOI: 10.1590/S1983-40632013000400006

BINATTI, Tairine Tamara; GEROMEL, Mairto Roberis; FAZIO, Maria Luiza Silva. Ação antimicrobiana de especiarias sobre o desenvolvimento bacteriano. **Hig. aliment**, v. 30, n. 260/261, p. 105-108, 2016BIONEXT - PRODUTOS. Disponível em: <<http://bionext.com.br/produtos/bionext/index.php>>. Acesso em: 10 dez. 2016.

BIONEXT - PRODUTOS. Disponível em: <<http://bionext.com.br/produtos/bionext/index.php>>. Acesso em: 10 dez. 2016.

BORZANI, W.; SOUZA, S. J. Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid media. *Biotechnology Letters*, v. 17, p. 1271–1272, 1995. DOI: 10.1007/BF00128400

BRIGHAM, C.J.; SINSKEY, A.J. Applications of polyhydroxyalkanoates in the medical industry. **International Journal of Biotechnology and Wellness Industry**, v. 1, p. 53–60, 2012. DOI: 10.6000/1927-3037.2012.01.01.03

BUCCI, D. Z. **Avaliação de embalagens de PHB (Poli (Ácido 3 - Hidroxibutírico)) para alimentos**. 2003. 146 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

BUDHIONO, A.; ROSIDI, B.; TAHER, H.; IGUCHI, M. Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system. **Carbohydrate Polymers**, v. 40, p. 137–143, 1999. DOI: 10.1016/S0144-8617(99)00050-8

ÇAKAR, F.; ÖZER, I.; AYTEKIN, A.Ö.; ŞAHIN, F. Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, p. 7–13, 2014. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.01.103

CANEVAROLO Jr, S.V. *Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros*. 3ª edição. São Paulo: Artliber Editora, 2010.

CARREIRA, P.; MENDES, J. A. S.; TROVATTI, E.; SERAFIM, L. S.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; PASCOAL NETO, C. Utilization of Residues from Agro-forest Industries in The Production of High Value Bacterial Cellulose. **Bioresources Technology**. v. 102, n. 15, p. 7354 - 7360, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.04.081

CAVKA, A.; GUO, X.; TANG, S. J.; WINESTRAND, S.; JÖNSSON, L. J.; HONG, F. Production of bacterial cellulose and enzyme from waste fiber sludge. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 1–10 2013. DOI: 10.1186/1754-6834-6-25

CHANDRA, R; RUSTIGI, R. Biodegradable Polymers. **Program, Polymer Science**, Grã Bretanha, n.23, p. 1273-1335, 1998. DOI: 10.1016/S0079-6700(97)00039-7

CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Microbial cellulose: fermentative production and applications. **Food Technology and Biotechnology**. v. 47, n. 2, p. 107–124.2009.

CHEN, G.Q. Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates. **Plastics from Bacteria**, v. 14, p 17–37, 2009 DOI: 10.1007/978-3-642-03287-5\_2

CHEN, G.Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. **Chemical Society Reviews**, 38, 2434–46, 2009. DOI: 10.1039/b812677c.

CHEN, P.; CHO, S. Y.; JIN, H-J. Modification and Applications of Bacterial Celluloses in Polymer Science. **Macromolecular Research**. v. 18, n. 4, p. 309 - 320, 2010. DOI: 10.1007/s13233-010-0404-5

CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; KESHWANI, D.; CHEN, C. Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.2, n. 142, p.276-290, 2007. DOI: 10.1007/s12010-007-0026-3

CHENG, K-C.; CATCHMARK, J. M.; DEMIRCI, A. Effect of different additives on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and analysis of material property. **Cellulose**. v. 16, n. 16, p. 1033 - 1045, 2009. DOI: 10.1007/s10570-009-9346-5

CLARINVAL, A.M.; HALLEUX, J. Classification of biodegradable polymers. In: SMITH R. ed. **Biodegradable Polymers for Industrial Applications**. Boca Raton: CRC Press, 3–56, 2005.

COSTA, A. F. S.; ROCHA, M. A. V.; SARUBBO, L. A. Bacterial cellulose: an ecofriendly biotextile. **International Journal of Textile and Fashion Technology**, v. 7, p. 11-26, 2017.

COUTINHO, B.C.; MIRANDA G.B.; SAMPAIO, G.R.; DE SOUSA, L.B.S, SANTANA, W.J.; COUTINHO, H. D.M. A importância e as vantagens do polihidroxibutirato (plástico biodegradável). **Holos**, v. 20, p. 76-80, 2004. DOI: 10.15628/holos.2004.49

CRUZ-ROMERO, M.; KERRY, J.P. Crop-based biodegradable packaging and its environmental implications. CAB Reviews. **Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 3, p. 1–25, 2008. DOI: 10.1079/PAVSNNR20083074

CZAJA, W. K.; KRYSZYNOWICKZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN JR., R. M. Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145–151, 2006. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.07.035

CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN JR, R. M. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**. v.8, n. 8, p. 1 - 12, 2007. DOI: 10.1021/bm060620d

DANESI, E. D. G.; WOSIACKI, G. Otimização da produção de nata (celulose bacteriana) por fermentação em superfície. **Food Science and Technology**. v. 18, n. 1, p. 131 - 139, 1998. DOI: 10.1590/S0101-20611998000100027

DE LEY, J.; GILLIS, M.; SWINGS, J.; Family VI. Acetobacteraceae. In: Krieg, N.R. and Holt, J.G., Eds., Bergey's. **Manual of Systematic Bacteriology**. v. 1, p. 267 - 278, 1984. DOI: 10.4236/eng.2011.34046

DEVI, K. P.; NISHA, S. A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIN, S. K.. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of ethnopharmacology**, v.130, n.1, p.107-115, 2010. DOI: 10.1016/j.jep.2010.04.025

DONINI, Í. A. N.; SALVI, D. T. B. DE; FUKUMOTO, F. K.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S.; MARCHETTO, R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v. 35 - 4: p. 165 - 178, 2010. DOI: 10.1590/S0100-46702010000400021

DUDMAN, W. F. Cellulose production by *Acetobacter* strains in submerged culture. **J Gen Microbiol**, v. 22, n. 1900, p. 25–39, 1960. DOI: 10.1099/00221287-22-1-25

DUFRESNE, A. **Nanocellulose: From Nature to High Performance Tailored Materials**. Walter De Gruyter, Berlin, 2012.

EL-BAKY, R. M. A.; HASHEM, Z. S. Eugenol and linalool: Comparison their antibacterial and antifungal activities. **African Journal of Microbiology Research**, v.10, n.44, p.1860-1872, 2016. DOI: 10.5897/AJMR2016.8283

ESA, F.; TASIRIN, S. M.; RAHMAN, N. A. Overview of bacterial cellulose production and application. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**. v. 2, p. 13 - 119, 2014. DOI: 10.1016/j.aaspro.2014.11.017

EVANS, B. R.; O'NEILL, H. M.; MALYVANH, V. P.; LEE, I.; WOODWARD, J. Palladium-bacterial cellulose membranes for fuel cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, p. 917-023, 2003. DOI: 10.1016/S0956-5663(02)00212-9

FAVIER, V.; CANOVA, G.R.; CAVAILLÉ, J.Y.; CHANZY, H.; DUFRESNE, A.; GAUTHIER, C. Nanocomposite materials from latex and cellulose whiskers. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 6, p. 351–355, 1995. DOI: 10.1002/pat.1995.220060514

FERNANDES, V. K.; MARTENDAL, C. P. Tag: roupa de bactérias - Descubra a matéria-prima mais inusitada para a fabricação de roupas. 2016. Disponível em: <<http://engenheirodemateriais.com.br/tag/roupa-de-bacterias/>>. Acesso em: 10 dez. 2016.

FERREIRA, A. R. V.; ALVES, V. D.; COELHO, I. M. Polysaccharide-Based Membranes in Food Packaging Applications. **Membranes**, v. 6, 22, 2016. DOI:10.3390/membranes6020022

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Global food losses and food waste—Extent, causes and prevention**; FAO: Rome, Italy, 2011.

GADIM, T. D. O.; FIGUEIREDO, A. G. P. R.; ROSERO-NAVARRO, N. C.; VILELA, C.; GAMELAS, J. A. F.; BARROS-TIMMONS, A.; NETO, C. P.; SILVESTRE, A. J. D.; FREIRE, C. S. R.; FIGUEIREDO, F. M. L. Nanostructured bacterial cellulose-poly(4-styrene sulfonic acid) composite membranes with high storage modulus and protonic conductivity. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, n. 10, p. 7864–7875, 2014. DOI: 10.1021/am501191t

GALGANO, F. Biodegradable packaging and edible coating for fresh-cut fruits and vegetables. **Italian Journal of Food Science**, v. 27, 2015. DOI: 10.14674/1120-1770/ijfs.v70

GAO, C.; YAN, T.; DU, J.; HE, F.; LUO, H.; WAN, Y. Introduction of broad spectrum antibacterial properties to bacterial cellulose nanofibers via immobilising  $\epsilon$ -polylysine nanocoatings. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 204–211, 2014. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2013.09.015

GAYATHRY, G.; GOPALASWAMY, G. Production and Characterization of Microbial Cellulosic Fibre From *Acetobacter Xylinum*. **Indian Journal of Fibre and Textile Research**. v. 39, p. 93 - 96, 2014.

- GHANBARZADEH, B.; ALMASI, H. Biodegradable Polymers **Biodegradation - Life of Science**, CHAMY, Dr. R. (Ed.), ISBN: 978-953-51-1154-2, InTech, jun. 2013. DOI: 10.5772/56230.
- GOMES, F. P.; SILVA, N. H. C. S.; TROVATTI, E.; SERAFIM; L. S.; DUARTE, M. F.; SILVESTRE, A. J. D.; PASCOAL NETO, C.; FREIRE, C. S. R. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue. **Biomass and Bioenergy**. v. 55, p.205 - 211, 2013.
- GREEN FACTS. Report highlights—**Trends of plastic waste in the EU**. Available online: <http://www.greenfacts.org/highlights/2011/02/trends-of-plastic-waste-in-the-eu-environment-options-for-regulatory-initiatives/> (accessed on 3 December 2017).
- HABIBI, Y.; LUCIA, L.A.; ROJAS, O.J. Cellulose nanocrystals: chemistry self-assembly, and applications. **Chemical Reviews**, v. 110, p. 3479–3500, 2010. DOI: 10.1.1.460.3455&rep=rep1&type=pdf
- HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, v.86, n.6, p.985-90, 1999. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x
- HAN, J.H.; FLOROS, J.D. Active packaging: A nonthermal process. In Tewari, G.; Juneja, V.K. (Eds.), **Advances in thermal and non-thermal food preservation** (pp. 167–183). Ames, IA, USA: Blackwell Publishing, 2007.
- HENRIQUE, M.A.; NETO, W.P.F.; SILVÉRIO, H.A.; MARTINS, D.F.; GURGEL, L.V.A.; DA SILVABARUD, H.; DE MORAIS, L.C.; PASQUINI, D. Kinetic study of the thermal decomposition of cellulose nanocrystals with different polymorphs, cellulose I and II extracted from different sources and using different types of acids. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 128–140, 2015. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.06.048
- HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochemistry Journal**, v. 58, n. 2, p. 345-352, 1954.
- HIRAI, A.; TSUJI, M.; HORII, F. Culture conditions producing structure entities composed of Cellulose I and II in bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 4, p. 239–245, 1997. DOI: 10.1023/A:1018439907396
- HOCKING, P.J.; MARCHESSAULT, R. H. Biopolyesters. In: GRIFFIN, G.J.L. ed. **Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers**. London: Blackie Academic & Professional, pp. 49–96, 1994.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Genus *Acetobacter* and *Gluconobacter*. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins, 19 th edn. Williams and Wilkins, MD, USA, v. 71, p. 84, 1994.

HONG, F.; QIU, K. An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain *Acetobacter aceti* subsp. *xylinus* ATCC 23770. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 3, p. 545 - 549, 2008. DOI: 10.1016/j.carbpol.2007.09.015

HU, G.; CHEN, J.; GAO, J. Preparation and characteristics of oxidized potato starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 291–298, 2009. DOI: 10.1016/j.carbpol.2008.10.032

HUANG, Y.; ZHU, C.; YANG, J.; NIE, Y.; CHEN, C.; SUN, D. Recent advances in bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 21, p. 1 - 30, 2014. DOI: 10.1007/BF02931175

HUNGUND, B. S.; GUPTA, S. G. Improved production of bacterial cellulose from *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v. 2, p. 127-133, 2010. DOI: :10.4172/1948-5948.1000037

IGUCHI M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose: a masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**. v. 35, n. 2, p.261 - 270, 2000. DOI: 10.1023/A:1004775229149

IQBAL, H.M.N.; KYAZZE, G.; TRONB, T.; KESHAVARZ, T. Laccase-assisted grafting of poly(3-hydroxybutyrate) onto the bacterial cellulose as backbone polymer: development and characterization. **Carbohydrate. Polymers**, v. 113, p. 131–137, 2014. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.07.00

JACQUEL, N.; LO, C-W.; WU, H-S.; WEY, Y-H.; WANG, S.S. Solubility of polyhydroxyalkanoates by experiment and thermodynamic correlations. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v. 53, p. 2704–2714, 2007. DOI: 10.1002/aic.11274

JONAS, R.; FARAH, L. F. Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1-3, p. 101–106, 1998. DOI: 10.1016/S0141-3910(97)00197-3

JOZALA, A. F.; PÉRTILE, R. A. N.; SANTOS, C. A.;EBINUMA, V. C. S.; SECKLER, M. M.; GAMA, F. M.; PESSOA JÚNIOR, A. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1181–1190, 2014. DOI: 10.1007/s00253-014-6232-3

JUNG, J. Y.; PARK, J. K.; CHANG, H. N. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 3, p. 347–354, 2005. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.02.019

KABILAN, S.; AYYASAMY, M.; JAYAVEL, S.; PARAMASAMY, G. *Pseudomonas* sp. as a source of medium chain length polyhydroxyalkanoates for controlled drug delivery: perspective. **International Journal of Microbiology**, 317828, 2012. DOI: 10.1155/2012/317828

KANGAS, H. Guide to cellulose nanomaterials - Opas selluloosa nanomateriaaleihin. **VTT Technology**. p. 1 - 97, 2014.

KIZILTAS, E. E.; KIZILTAS, A.; GARDNER, D. J. Synthesis of bacterial cellulose using hot water extracted wood sugars. **Carbohydrate Polymers**, v. 124, p. 131–138, 2015. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.01.036

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.; BOHN, A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International**, v. 44, p. 3358–3393, 2005. DOI: 10.1002/anie.200460587

KLEMM, D.; KRAMER, F.; MORITZ, S.; LINDSTROM, T.; ANKERFORS, M.; GRAY, D.; DORRIS, A. Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. **Angewandte Chemie International**, v. 50, p. 5438–5466, 2011. DOI: 10.1002/anie.201001273

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; KRAMER, F.; HEßLER, N.; HORNING, M.; SCHMAUDER, H-P.; MARSCH, S. Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. **Advances in Polymer Science**, v. 205, p. 49 - 96, 2006. DOI 10.1007/12\_097

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, p. 1561-1603, 2001. DOI: 10.1016/S0079-6700(01)00021-1

KLOSS, J. R. **Síntese e caracterização de poliuretanos biodegradáveis à base de poli(ε-caprolactona)**, 2007, 203f. Dissertação (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

KONGRUANG, S. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 148, p. 245 - 256, 2008. DOI 10.1007/s12010-007-8119-6

LAUZIER, C.A.; MONASTERIOS, C.J.; SARACOVAN, I.; MARCHESSAULT, R.H.; RAMSAY, B.A. Film formation and paper coating with poly(b-hydroxyalkanoate), a biodegradable latex. **Tappi Journal**, v. 76, p. 71–7, 1993. DOI:

LAVOINE, N.; DESLOGES, I.; DUFRESNE, A.; BRAS, J. Microfibrillated cellulose—its barrier properties and applications in cellulosic materials: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 735–764, 2012. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.05.026

LEE, S. 2016. Disponível em: <https://www.northumbria.ac.uk/static/5007/despdf/events/suzanneleebio.pdf>

LI, Z.; WANG, L.; HUA, J.; JIA, S.; ZHANG, J.; LIU, H. Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 120, p. 115–119, 2015. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.11.061

LIMA, I.O.; Oliveira, R. A. G.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L.. Atividade antifúngica e óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.16, n.2, p.197-201, 2006. DOI: 10.1590/S0102-695X2006000200011

LIMA, L. R.; SANTOS, D. B.; SANTOS, Mo. V.; BARUD, H. S.; HENRIQUE, M. A.; PASQUINI, D.; PECORARO, E.; RIBEIRO, S. J. L. Nanocristais de celulose a partir de celulose bacteriana.

nanocristais de celulose a partir de celulose bacteriana. **Química Nova**. v. 9, p. 1140 - 1147, 2015. DOI 10.5935/0100-4042.20150131

MAIA, T. F.; DONATO, A.; FRAGA, M. E.. Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais de Plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, V. 17, nº 1, p.105-116, 2015.

Matan, N.; Rimkeeree, H.; Mawson, A. P.; Chompreeda P.; Haruthaithanasan, V.; Parker, M. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, n. 2, p. 180-185, 2006. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.007

MARTINEZ-SANZ, M.; LOPEZ-RUBIO, A.; VILLANO, M.; OLIVEIRA, C.S.S.; MAJONE, M.; REIS, M.; LAGARON, J.M. Production of bacterial nanobiocomposites of polyhydroxyalkanoates derived from waste and bacterial nanocellulose by the electrospinning enabling melt compounding method. **Journal of Applied and Polymer Science**, v. 133, p. 42486–42499, 2015. DOI: 10.1002/app.42486

MARTINEZ-SANZ, M.; VILLANO, M., OLIVEIRA, C.; ALBUQUERQUE, M.G.E.; MAJONE, M.; REIS, M.; LOPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J.M. Characterization of polyhydroxyalkanoates synthesized from microbial mixed cultures and of their nanobiocomposites with bacterial cellulose nanowhiskers. **New Biotechnology**, v. 31, p. 364–376, 2014. DOI: 10.1016/j.nbt.2013.06.003

MatWeb, Biomer P226 PHB biodegradable polymer datasheets, <http://www.matweb.com/search/>. 2016.

MENSITIERI, G.; DI MAIO, E.; BUONOCORE, G.G.; NEDI, I.; OLIVIERO, M.; SANSONE, L.; IANNACE, S. Processing and shelf life issues of selected food packaging materials and structures from renewable resources. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, p. 72–80, 2011. DOI: 10.1016/j.tifs.2010.10.001

MIN, L. U.; XIAO-HUI, G.; DE-ZHOU, W. E. I. Removing Cd<sup>2+</sup> by Composite Adsorbent Nano-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Bacterial Cellulose. **Chemistry Research Chinese Universities**, v. 27, p. 1031–1034, 2011.

MOHAMMADKAZEMI, F.; AZIN, M.; ASHORI, A. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. **Carbohydrate Polymers**. v. 117, p. 518 - 523, 2015. DOI 10.1016/j.carbpol.2014.10.008

MOHITE, B. V.; PATIL, S. V. A novel biomaterial: Bacterial cellulose and its new era applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 61, p. 101–110, 2014.

MOON, R.J.; MARTINI, A.; NAIRN, J.; SIMONSEN, J.; YOUNGBLOOD, J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, v. 40, p. 3941–3994, 2011. DOI: 10.1039/c0cs00108b

MOOSAVI-NASAB, M.; YOUSEFI, M. Biotechnological production of cellulose by *Gluconacetobacter Xylinus* from agricultural waste. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 94–101, 2011

MOREIRA, M.R.; PONCE, A.G.; DEL VALLE, C.E.; ROURA, S.I.. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT-Food Science and Technology**, v.38, p.565-570, 2005. DOI: 10.1016/j.lwt.2004.07.012

MUKHERJEE, S.M.; WOODS, H.J. X-ray and electron microscope studies of the degradation of cellulose by sulphuric acid. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 10, p. 499–511, 1953. DOI: 10.1016/0006-3002(53)90295-9

NANAMI, R.; LEONARDI, D. P.; DELIBERADOR, T. M.; ULBRICH, L. M.; ZIELAK, J. C.; GIOVANINI, A. F. Aplicação de membrana experimental de PTFE em defeito cirúrgico periodontal de ratos. **Journal of the Health Sciences Institute**. v. 29, p. 239 - 42, 2011.

NASCIMENTO, J. F. **Estudo da processabilidade e da caracterização do poli(ácido 3-hidroxitubutírico)- PHB obtido a partir da cana-de-açúcar**. 2001. 58p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

NEXFILL. Ciência Avançada em curativos e tratamento de pele por biocelulose. 2016. Disponível em: <<http://nexfill.com.br/>>. Acesso em: 10 dez. 2016.

NOGI, M.; Ifuku, S.; ABE, K.; Keishin, H.; Nakagaito, A. N.; YANO, H. Fiber-content dependency of the optical transparency and thermal expansion of bacterial nanofiber reinforced composites. **Applied Physics Letters**, v. 88, 133124, 2006. DOI: 10.1063/1.2191667

NUGROHO, D. A.; AJI, P. Characterization of Nata de Coco Produced by Fermentation of Immobilized *Acetobacter xylinum*. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. v. 3, p. 278 - 282, 2015. DOI: 10.1016/j.aaspro.2015.01.053

OLIVEIRA, R. A.; REIS, T. .; SACRAMENTO, C. K.; DUARTE, L. P.; OLIVEIRA, F. F. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, V. 19, nº 3, Julho/setembro, 2009, p 771-775.

ORTS, W.J.; NOBES, G. A.; KAWADA, J.; NGUYEN S.; YU, G.; RAVENELLE, F. Polyhydroxyalkanoates: biorefinery polymers with a whole range of applications. The work of Robert H. Marchessault. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 86, p. 628–40, 2008. DOI: 10.1139/v08-050

PANAITESCO, D.M.; FRONE, A.N.; CHIULAN, I. Nanostructured biocomposites from aliphatic polyesters and bacterialcellulose. **Industrial Crops and Products**, v. 93, p. 251-266, 2016. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.02.038

PARK, J. K.; PARK, Y. H.; JUNG, J. Y. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK isolated from rotten apple. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, p. 83–88, 2003. DOI: 10.1007/BF02940261

PARK, S. Uk.; LEE, B. K.; KIM, M. S.; PARK, K. K.; SUNG, W. J.; KIM, H. Y.; HAN, D. G.; SHIM, J. S.; LEE, Y. J.; KIM, S. H.; KIM, I. H.; PARK, D. H. The possibility of microbial cellulose for dressing and scaffold materials. **International Wound Journal**. v. 11, p. 35 - 43, 2012. DOI: 10.1111/j.1742-481X.2012.01035.x

PATENTS, E. Extract from the Register of European Patents About this file : EP0025467. p. 1–2, 2015.

PECORARO, E.; MANZANI, D.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Bacterial cellulose from *Gluconacetobacter xylinus*: preparation, properties and applications. In: BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. **Monomers, polymers and composites from renewable resources**. Amsterdam: Elsevier, v. 1, cap. 17, p. 369-383. 2008. DOI: 10.1016/B978-0-08-045316-3.00017-X

PHILIP, S.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 233–47, 2007. DOI: 10.1002/jctb.1667

PIATKOWSKI, A.; DRUMMER, N.; ANDRIESEN, A.; ULRICH, D.; PALLUA, N. Randomized controlled single center study comparing a polyhexanide containing bio-cellulose dressing with silver sulfadiazine cream in partial-thickness dermal burns. **Burns**, v. 37, n. 5, p. 800 - 804, 2011. DOI: 10.1016/j.burns.2011.01.027

PIGOSSI, S. S. C.; DE OLIVEIRA, G. J. P. L.; FINOTI, L. S.; NEPOMUCENO, R.; SPOLIDORIO, L. C.; ROSSA, C. JR.; RIBEIRO, S. J. L.; SASKA, S.; SCAREL-CAMINAGA, R. M. Bacterial cellulose-hydroxyapatite composites with osteogenic growth peptide (OGP) or pentapeptide OGP on bone regeneration in critical-size calvarial defect model. **Journal of Biomedical Materials Research – Part A**. v. 10, n. 10, p. 3397 - 406, 2015. DOI: 10.1002/jbm.a.35472

PLACKETT, D. Introductory overview. In **Biopolymers: New Materials for Sustainable Films and Coatings**. Wiley: Chichester, UK; pp. 1–14, 2011.

PLASTICS EUROPE. Packaging. Available online: <http://www.plasticseurope.org/use-of-plastics/packaging.aspx> (accessed on 2 December 2015b).

PLASTICS EUROPE. Plastic Packaging: Born to Protect; Plastics Europe Association of plastics manufacturers: Brussels, Belgium, 2012.

PLASTICS EUROPE. Plastics—The facts 2014/2015; Plastics Europe—Association of plastics manufacturers: Brussels, Belgium, 2015a.

POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F.. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Cad. saúde pública**, Rio de Janeiro, v.28, n.8, p.1653-1666, 2009.

PRADELLA, J. G. C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. São Paulo: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2006, 119 p. Relatório Técnico nº 84 396-205.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012. 122f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu. Botucatu-SP. Disponível em: <[http://www.ibb.unesp.br/posgrad/teses/bga\\_me\\_2012\\_isabella\\_probst.pdf](http://www.ibb.unesp.br/posgrad/teses/bga_me_2012_isabella_probst.pdf)>. Acesso em: 14 jan. 2018.

RANGASWAMY, B. E.; VANITHA, K. P.; HUNGUND, B. S. Microbial Cellulose Production from Bacteria Isolated from Rotten Fruit. *International Journal of Polymer Science*. v. 2015, p. 1 - 9, 2015. DOI: 10.1155/2015/280784

RECOUVREUX, D. O. S. **Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos**. 145f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

REDDY, C. S. K.; GHAY, R.; KALIA, V.C. RASHIMI, Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 137-146, 2003. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2

REZAEI, A.; DERAYAT, J.; MORTAZAVI, S. B.; YAMINI, Y. Removal of Mercury from chlor-alkali Industry wastewater using *Acetobacter xylinum* cellulose. **American Journal of Environmental Sciences**, v. 1, p. 102–105, 2005. DOI: 10.3844/ajessp.2005.102.105

RHIM, J. W.; PARK, H. M.; HA, C. S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1629–1652, 2013. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2013.05.008

RIBEIRO, A; REGINA, M; CAROLINA, M; BARBOSA, N; MARIA, N, CASSIA, R; Oliveira, V; **Extração do Óleo de cravo**. Trabalho interdisciplinar, dirigido iii, Instituto politécnico – UMA, Engenharia Química, p. 5. Disponível em:<<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAa14AL/oleos-essenciais>>. Acesso em: 17 de jan. 2018

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose Biosynthesis and Function In Bacteria. **Microbiological Reviews**. v. 55, n. 1, p. 35 - 58, 1991.

RUKA, D.R.; SIMON, G.P.; DEAN, K. Harvesting fibrils from bacterial cellulose pellicles and subsequent formation of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate nanocomposites. **Cellulose**, v. 21, p. 4299–4308, 2014. DOI: 10.1007/s10570-014-0415-z

RUKA, D.R.; SIMON, G.P.; DEAN, K.M. In situ modifications to bacterial cellulose with the water insoluble polymer poly-3-hydroxybutyrate. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1717–1723, 2013. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.11.007

SAKURADA, I.; NUKUSHINA, Y.; ITO, T. Experimental determination of the elastic modulus of crystalline regions in oriented polymers. **Journal of Polymer Science**, v. 57, p. 651–660, 1962. DOI: 10.1002/pol.1962.1205716551

SANI, A.; DAHMAN, Y. Improvements in the production of bacterial synthesized biocellulose nanofibres using different culture methods. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p. 151–164, 2010. DOI: 10.1002/jctb.2300

SANTOS, S. M.; CARBAJO, J. M.; QUINTANA, E.; IBARRA, D.; GOMEZ, N.; LADERO, M.; EUGENIO, M. E.; VILLARA, J. C. Characterization of purified bacterial cellulose focused on its use on paper restoration. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 173 - 181, 2015. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.03.064

SATKOWSKI, M. M.; KNAPMEYER, J. T.; KREUZER, D. P. Nucleating agents for polyhydroxyalkanoates. EP1789488, 2010.

SHAH, N.; UL-ISLAM, M.; KHATTAK, W. A.; PARJ, J. K. Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1585–1598, 2013. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.08.018

SHAMALA, T.R.; DIVYASHREE, M.S.; DAVIS, R.; KUMARI, L.; VIJAYENDRA, S.V.N.; RAJ, B. Production and characterization of bacterial polyhydroxyalkanoate copolymers and evaluation of their blends by Fourier transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 251–8, 2009. DOI: 10.1007/s12088-009-0031-z

SHEYKHNAZARI, S.; TABARSAA, T.; ASHORIB, A.; SHAKERIC, A.; GOLALIPOURD, M. Bacterial synthesized cellulose nanofibers; effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1187– 1191, 2011. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.06.011

SHIRAI, A.; TAKAHASHI, M.; KANEKO, H.; NISHIMURA, S-I.; OGAWA, M.; NISHI, N.; TOKURA, S. Biosynthesis of a novel polysaccharide by *Acetobacter xylinum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 16, n. 6, p. 297–300, 1994. DOI: 10.1016/0141-8130(94)90059-0

SILVA, M. T. N. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 257-262, 2009. DOI: 10.1590/S1516-05722009000300005

SILVESTRE, J. D. F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.. Perfil da composição química e atividades antibacterianas e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata Thunb.*). **Revista Ceres**, v.57, n.5, p.589-594, 2010. DOI: 10.1590/S0034-737X2010000500004

SIRACUSA, V.; ROCCULI, P.; ROMANI, S.; ROSA, M. D. Biodegradable polymers for food packaging: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 19, p. 634–643, 2008. DOI: 10.1016/j.tifs.2008.07.003

SON; H-J.; HEO, M-S.; KIM, T-G.; LEE, S-J. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 33, p. 1–5, 2001. DOI: 10.1042/BA20000065

SONIA, A.; PRIYA DASAN, K. Celluloses microfibers (CMF)/poly (ethylene-co-vinyl acetate) (EVA) composites for food packaging applications: A study based on barrier and biodegradation behavior. **Journal of Food Engineering**, v. 118, n. 1, p. 78–89, 2013. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.03.020

SOUZA, M.P.; CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B.W.S.; TEIXEIRA, J. A.; PORTO, A.L.F.; VICENTE, A.A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. Polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. tree gum (Policaju) as a coating for Tommy Atkins mangoes. **Chemical Papers**, v. 64, p. 475–481, 2010. DOI: 10.2478/s11696-010-0017-7

SOUZA, S.M.C. et al. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciência Agrotécnica**, v.28, n.3, p.685-90, 2004. DOI: 10.1590/S1413-70542004000300027

SOUZA, Thaúsi Frota Sá Nogueira Neves de. Efeito antinociceptivo e antiedematogênico do Eugenol. 2007. 84p. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Fortaleza, 2007.

SQUIO, R. C.; ARAGÃO, G.M.F. Estratégias de cultivo para produção de plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxi-butirato) e poli( hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por bactérias. **Química nova**, v. 27, p. 615-622, 2004.

SQUIO, R. C.; ARAGÃO, G.M.F. Estratégias de cultivo para produção de plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxi-butirato) e poli( hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por bactérias. **Química nova**, v. 27, p. 615-622, 2004.

SUDESH, K.; LOO, C.Y.; GOH, L.K.; IWATA T.; MAEDA, M. The oil-absorbing property of polyhydroxyalkanoate films and its practical application: a refreshing new outlook for an old degrading material. **Macromolecular Bioscience**, v. 7, p. 1199–205, 2007. DOI: 10.1002/mabi.200700086

SUWANNAPINUNT, N.; BURAKORN, J.; THAENTHANE, S. Effect of culture conditions on bacterial cellulose (BC) production from *Acetobacter xylinum* TISTR976 and physical properties of BC parchment paper. v. 14, n. 4, p. 357–365, 2007.

SVENSSON, A.; NICKLASSON, E.; HARRAH, T.; PANILAITIS, B.; KAPLAN, D. L.; BRITTEBERG, M.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomaterials**. v. 26, n. 4, p. 419 - 431, 2005. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.02.049

TADA, E. S. **Blendas com poli(3-hidroxibutirato) (PHB) e copolímeros aleatórios: comportamentos de fases e cinética de cristalização**, 2009, 247f., Dissertação (Doutorado em Ciências), Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

TANG, X. Z.; KUMAR, P.; ALAVI, S.; SANDEEP, K. P. Recent Advances in Biopolymers and Biopolymer-Based Nanocomposites for Food Packaging Materials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 5, p. 426–442, 2012. DOI: 10.1080/10408398.2010.500508

TANSKUL, S.; AMORNTHATREE, K.; JATURONLAK, N. A new cellulose-producing bacterium, *Rhodococcus* Sp. MI 2: screening and optimization of culture conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 421-428, 2013. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.09.017

TEPE, B.; DONNEY, E.; UNLU, M.; CANDAN, F.; DAFERERA, D.; UNLU, G. V.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A. A.. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *S. cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth) *S. multicaulis*(Vahl). **Food Chemistry**, v.84, p.519-525, 2004. DOI: 10.1016/s0308-8146(03)00267-x

THAKUR, V.K. **Nanocellulose Polymer Nanocomposites. Fundamentals and Applications**. Wiley-Scrivener Publishing, New York, 2015.

TOKIWA, Y.; CALABIA, B. P.; UGWU, C.U.; AIBA, S. Biodegradability of Plastics. **International Journal of Molecular Science**, v. 10, p. 3722–3742, 2009. DOI: 10.3390/ijms10093722

TRINETTA, V. Definition and function of food packaging. In **Reference Module in Food Science**; Elsevier: Philadelphia, PA, EUA, 2016. DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.03319-9

TSOUKO, E.; KOURMENTZA, C.; LADAKIS, D.; KOPSAHELIS, N.; IOANNA MANDALA, I.; PAPANIKOLAOU, S.; PALOUKIS, F.; ALVES, A. KOUTINAS, A. Bacterial Cellulose Production from Industrial Waste and by-Product Streams. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 14832–14849, 2015. DOI: 10.3390/ijms160714832

TUMWESIGYE, K.S.; OLIVEIRA, J.C.; SOUSA-GALLAGHER, M.J. New sustainable approach to reduce cassava borne environmental waste and develop biodegradable materials for food packaging applications. **Food Packaging Shelf Life**, v. 7, p. 8–19, 2016. DOI: 10.1016/j.fpsl.2015.12.001

TYAGI, N.; SURESH, S. Production of cellulose from sugarcane molasses using *Gluconacetobacter intermedius* SNT-1: optimization & characterization. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 71-80, 2016. DOI: 10.1016/j.jclepro.2015.07.054

UL-ISLAM, M.; KHAN, T.; PARK, J. K. Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. **Carbohydrate Polymers**. v. 88, n. 2, p. 596 - 603, 2012. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.01.006

UFSC -UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. **Extração do Eugenol**. Disponível em: <<http://www.qmc.ufsc.br/organica/exp10/eugenol.html>>. Acesso em: 17 de jan. 2018.

URBINA, L.; ALGAR, I.; GARCIA-ASTRAIN, C.; GABILONDO, N.; GONZALEZ, A.; CORCUERA, M.; ECEIZA, A.; RETEGI, A. Biodegradable composites with improved barrier properties and transparency from the impregnation of PLA to bacterial cellulose membranes. **Journal of Applied Polymer Science**, 2016. DOI: 10.1002/app.43669

VIEGAS, C. P. R. **Estudo da Produção de Polihidroxicanoatos (PHAs) por *Chromobacterium violaceum***, out. 2005, 85f., Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

VIJAYENDRA S. V.N.; SHAMALA, T. R. Film forming microbial biopolymers for commercial applications—A review. **Critical Reviews in Microbiology**, p. 1-20, 2013. DOI: 10.3109/07388551.2013.798254

WANG, J.; ZHU, Y.; DU, J. Bacterial cellulose: a natural nanomaterial for biomedical applications. **Journal of Mechanics in Medicine and Biology**, v. 11, p. 285-306, 2011. DOI: 10.1142/S0219519411004058

WEBER, C.J.; HAUGAARD, V.; FESTERSEN, R.; BERTELSEN, G. Production and applications of biobased packaging materials for the food industry. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p. 172–177, 2002. DOI: 10.1080/02652030110087483

WOLFFENBUTTEL, A. N. 2007. **Mas afinal, o que são óleos essenciais?** Disponível em: <[http://www.oleoessencial.com.br/artigo\\_Adriana.pdf](http://www.oleoessencial.com.br/artigo_Adriana.pdf)>. Acesso em: 14 jan. 2018.

WU, J.; ZHENG, Y.; SONG, W.; LUAN, J.; WEN, X.; WU, Z.; CHEN, X.; WANG, Q.; GUO, S. In Situ Synthesis of Silver-Nanoparticles/Bacterial Cellulose Composites for Slow-Released Antimicrobial Wound Dressing. **Carbohydrate polymer**. v. 102, p. 762 - 771, n. 15, 2014. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.10.093

WU, J.M.; LIU, R.H. Thin stillage supplementation greatly enhances bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 116-121, 2012. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.05.003

YANG, J.; SUN, D.; LI, J.; YANG, X.; YU, J.; HAO, Q.; LIU, W.; LIU, J.; ZOU, Z.; GU, J. In situ deposition of platinum nanoparticles on bacterial cellulose membranes and evaluation of PEM

fuel cell performance. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 26, p. 6300–6305, 2009. DOI: 10.1016/j.electacta.2009.05.073

ZAHARIA, C.; VASILE, E.; GALATEANU, B.; BUNEA, M.-C.; CASARICA, A.; STANESCU, P.O. Bacterial cellulose-polyhydroxyalkanoates composites. Synthesis, physico-chemical characterization and biological evaluation for tissue engineering. **Material Plastics**, v. 51, p. 1–5, 2014.

ZHIJIANG, C.; CHENGWEI, H.; GUANG, Y. Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)/bacterial cellulose composite porous scaffold preparation, characterization and biocompatibility evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1073–1080, 2012. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.08.037

ZHIJIANG, C.; GUANG, Y. KIM, J. Biocompatible nanocomposites prepared by impregnating bacterial cellulose nanofibrils into poly(3-hydroxybutyrate). **Current and Applied Physics**, v. 1, p. 247–249, 2011. DOI: 10.1016/j.cap.2010.07.016

ZHIJIANG, C.; GUANG, Y. Optical nanocomposites prepared by incorporating bacterial cellulose nanofibrils into poly(3-hydroxybutyrate). **Material Letters**, v. 65, p. 182–184, 2011. DOI: 10.1016/j.matlet.2010.09.055

ZHU, H.; JIA, S.; YANG, H.; JIA, Y.; YAN, L.; LI, J. Preparation and application of bacterial cellulose sphere: A novel biomaterial. **Biotechnology and Biotechnological Equipment Journal**, v. 25, n. 1, p. 2233–2236, 2011. DOI: 10.5504/BBEQ.2011.0010

ZYWICKA, A.; PEITLER, D.; RAKOCZY, F.; KONOPACKI, M.; KORDAS, M.; FIJAŁKOWSKI, K. The Effect of Different Agitation Modes on Bacterial Cellulose Synthesis by *Gluconacetobacter xylinus* strains. **ACTA Scientarium Polonorum Zootechnica**, v. 14, p. 137–150, 2015.

# CAPÍTULO II

**Produção de uma blenda de celulose bacteriana e polihidroxibutirato (PHB) para aplicação como embalagem ativa para alimentos**

Rodrigo M. B. Albuquerque<sup>a</sup>, Hugo M. Meira<sup>a,b</sup>, Ivo D. L. Silva<sup>c</sup>, Fabíola Carolina G. Almeida<sup>a,b</sup>, Andrea Fernanda S. Costa<sup>b,d</sup>, Raquel D. Rufino<sup>a</sup>, Glória M. Vinhas<sup>c</sup>, Leonie A. Sarubbo<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup> *Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Recife, Pernambuco, Brasil*

<sup>b</sup> *Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI), Recife – Pernambuco, Brasil.*

<sup>c</sup> *Centro de Tecnologia e Geociências, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil*

<sup>d</sup> *Centro de Design e Comunicação, Centro Acadêmico do Agreste, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Caruaru, Pernambuco, Brasil*

\*Leonie Asfora Sarubbo (Autor para correspondência)

Tel.: +55 81 21194084; fax: +55 81 21194000.

E-mail: leonie@unicap.br

## Resumo

A crescente necessidade de preservação ambiental aumenta e intensifica o uso de recursos renováveis na obtenção de filmes poliméricos como embalagens para manter e/ou melhorar a qualidade dos alimentos. Nesse contexto, blendas à base dos polímeros de celulose e polihidroxicanoatos (PHA) são candidatas em potencial para essa finalidade devido às propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade. A celulose é um dos polímeros naturais mais abundantes na terra e é produzida principalmente por plantas, embora muitas bactérias, especialmente as pertencentes ao gênero *Gluconacetobacter*, produzam uma forma muito peculiar de celulose com propriedades mecânicas e estruturais que podem ser exploradas em numerosas aplicações industriais. O polihidroxitirato (PHB), por sua vez, é um polímero biodegradável bacteriano com propriedades termoplásticas que o tornam um candidato em potencial para a substituição de polímeros não degradáveis. Nesse sentido, no presente trabalho, membranas de CB foram produzidas pela bactéria *Gluconacetobacter hansenii* UCP 1619 usando o meio padrão Hestrin-Schramm (HS) modificado, contendo 1,5% de glicose e 2,5% de milhocina. Após a purificação da membrana de CB, uma blenda à base de CB e PHB foi preparada a partir da combinação entre membranas de CB puras com 30% de PHB em ácido acético. Em seguida, o óleo essencial de cravo foi adicionado como agente antimicrobiano. As blendas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, difração de raios X, análise térmica e ensaios mecânicos. As análises por microscopia eletrônica de varredura revelaram um revestimento homogêneo da superfície CB por deposição do PHB. Outras análises como permeabilidade do óleo, flexibilidade e solubilidade em água também foram realizados e demonstraram a melhoria do material obtido pela mistura dos dois polímeros. A adição do óleo essencial reduziu substancialmente o crescimento microbiano e melhores propriedades mecânicas e térmicas na blenda foram observadas frente à membrana de CB pura. O novo material, composto por uma blenda de CB e PHB, aditivada com óleo de cravo pode encontrar aplicações importantes como embalagem ativa para alimentos, considerando as propriedades atrativas da blenda e sua natureza biodegradável, como embalagem biocompatível e eficiente para uso industrial na indústria alimentícia.

*Palavras-chave:* Celulose bacteriana; *Gluconacetobacter hansenii*; resíduos industriais; PHB; óleos essenciais; blendas; embalagens ativas para alimentos.

## 1. Introdução

As embalagens de alimentos são essenciais para a contenção de produtos, proteção, preservação, conveniência, para fornecer informações sobre o produto e comunicar a marca, entre outros (Ferreira et al., 2016). No entanto, o problema crucial da utilização de plásticos para a embalagem é o resíduo pós-consumo, uma vez que a embalagem é, de longe, o maior contribuinte (63%) de resíduos plásticos (Green Facts, 2011). Além disso, alguns materiais são difíceis de reutilizar e estima-se que menos de 14% dos materiais de embalagem plásticos sejam recicláveis (Tumwesigye et al., 2016).

Uma vez que a maior parte dos materiais utilizados não são biodegradáveis e permanecem no ambiente durante longos períodos de tempo, continuam a constituir ameaças para a saúde humana e para o ambiente (Plastics Europe, 2015a). Neste contexto, os compósitos formados por polímeros biodegradáveis utilizados como embalagem, que são obtidos a partir de recursos renováveis, representam uma alternativa aos plásticos derivados do petróleo, uma vez que sua degradação conduz a resíduos não tóxicos ou não prejudiciais para o ambiente. No entanto, esses biopolímeros com promissoras aplicações em embalagens de descartabilidade rápida, apresentam limitações em função de algumas de suas propriedades como baixa estabilidade térmica no processamento e pouca flexibilidade. Para superar essas limitações, uma alternativa promissora seria desenvolver uma blenda utilizando dois biopolímeros, um com estrutura na forma de filamentos nanométricos, celulose bacteriana, e outro que tenha propriedade similar ao polímero sintético, o poli(hidroxi-butilato) (PHB). Várias pesquisas estão focadas no desenvolvimento de blends totalmente biodegradáveis, preparadas de forma sustentável (Yang et al., 2007), sendo as blends à base de celulose e poli-hidroxialcanoatos (PHA) importantes neste campo devido às suas propriedades intrínsecas de biodegradabilidade e biocompatibilidade.

A celulose é o polímero mais abundante na Terra e de crescente interesse devido a sua natureza fibrilar e potencial como material de reforço em compósitos, sendo biodegradável, sustentável e renovável. A celulose tem sido produzida há muito tempo a partir de fontes vegetais; no entanto a celulose bacteriana (CB), produzida em grandes quantidades por bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, é particularmente atraente devido a sua pureza e nanoestrutura altamente cristalina. Vários trabalhos têm descrito a quantidade de celulose produzida por *Gluconacetobacter* cultivada em diferentes meios, obtidos pela substituição dos componentes de carbono e/ou nitrogênio. Uma ampla variedade de fontes de carbono e nitrogênio foi investigada dessa forma, assim como a inclusão de suplementos adicionais (Costa et al., 2017).

A produção de BC a partir de resíduos agrícolas e resíduos industriais, que incluem resíduos de alimentos, palha de trigo, resíduos de frutas, resíduos de glicerol e resíduos de têxteis à base de algodão tem sido demonstrado. A vantagem em usar resíduos agrícolas ou

industriais não só fornece uma maneira barata de produzir a CB, mas também funciona como uma proposta ambiental (Li et al., 2015). Além disso, a utilização de tais materiais residuais não só melhora a sustentabilidade da produção de celulose por micro-organismos, mas também diminui a poluição ambiental associada ao descarte de resíduos industriais.

Os poli(hidroxicanoatos) (PHA) são uma família de biopolímeros intracelulares sintetizados por bactérias como grânulos intracelulares de armazenamento de carbono e energia. Entre a família dos polímeros de PHA, o poli-3-hidroxi-butirato (PHB) é produzido pela *Ralstonia eutropha*. O PHB é um polímero biocompatível, biodegradável e termoplástico, com as propriedades do tipo plástico oferecendo a possibilidade de substituição potencial de polímeros não degradáveis atualmente usados como polietileno e polipropileno. PHB tem uma alta temperatura de fusão (~175 °C), embora a instabilidade térmica e fragilidade têm sido as principais desvantagens em aplicações potenciais. Por outro lado, a CB está entre os substratos que podem garantir força ao PHB (Vijayendra and Shamala, 2013).

Blendas de PHB/amido de milho foram aplicadas para embalagens (Reis et al., 2008; Vinhas, et al., 2007) e micropartículas de PHB/quitosana/cetoprofeno têm sido usadas na liberação controlada de fármacos (Bazzo et al., 2009). Blendas de PHB/ésteres de celulose foram estudadas por Scandola et al. (1992). Misturas amorfas totalmente miscíveis foram obtidas para um conteúdo de PHB até 50%. Observou-se que o PHB cristalizou para quantidades superiores a 50%. Filmes de dupla camada utilizando PHB e papel de celulose foram preparados por Jiang et al. (2008). Diminuições na absorção de umidade e água e também na rugosidade da superfície foram observadas em comparação com o papel de celulose. A possibilidade de obter um material biodegradável com melhores propriedades mecânicas e de barreira foi claramente demonstrada. (Vinhas, et al., 2007)

Nesse contexto, a crescente demanda por alimentos minimamente processados e produtos frescos apresenta problemas reais em relação à qualidade e segurança desses produtos. Por esta razão, novos métodos para inibir o crescimento microbiano em alimentos e que mantenham a frescura, a qualidade e a segurança do produto têm sido desenvolvidos. Um dos métodos mais utilizados é a produção de filme antimicrobiano (Souza et al., 2010). A embalagem antimicrobiana reduz a taxa de crescimento de micróbios, aumentando o tempo de prateleira do alimento. A embalagem ativa está atraindo mais atenção da indústria de alimentos e embalagens devido à crescente demanda por produtos sem conservantes. Baixos níveis de aditivos totais no sistema de embalagem, em comparação com a quantidade de conservantes adicionados diretamente nos alimentos, também são desejáveis (Han and Floros, 2007).

Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um novo material polimérico composto por uma blenda de CB/PHB aditivada com óleo essencial de cravo, com a

finalidade de funcionalizar o filme como ativo antimicrobiano, especificamente antibacteriano e sobretudo biodegradável que possa ser utilizado para a indústria de alimentos perecíveis.

## **2. Materiais e métodos**

### *2.1. Materiais*

O Poli-3-hidroxi-butirato (PHB), na forma de pó, de nome comercial Biocycle, massa molar de 563.110,00 g/mol, densidade: 1,23 g/mL e temperatura de fusão: 178,4°C foi obtido da PHB Industrial S.A. Hidróxido de sódio (NaOH), clorofórmio e ácido acético foram obtidos da MERTEC (Brasil).

### *2.2. Micro-organismo*

A bactéria *Gluconacetobacter hansenii* UCP UCP1619, deposita no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco foi utilizada como produtora da celulose bacteriana.

### *2.3. Meio de crescimento e manutenção padrão do micro-organismo*

A metodologia utilizada para manter a viabilidade do micro-organismo e para cultivá-lo em um meio padrão pré-estabelecido se baseia em estudos realizados por Hestrin e Schramm (HS) (1954), adaptada por Hungund e Gupta (2010) e Gomes et al. (2013). O meio HS utilizado para o crescimento da bactéria é composto por 20,0 g/L de glicose, 5,0 g/L de peptona, 5,0 g/L de extrato de levedura, 2,7 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 1,15 g/L de ácido cítrico em pH 5,0. Para a manutenção da bactéria, há um acréscimo de 15 g/L de ágar ao meio HS anteriormente citado. Ambos os meios foram esterilizados a 121° por 15 minutos, sendo o meio de manutenção distribuído em placas de Petri e tubos de Falcon para repique do micro-organismo.

### *2.4. Meio de produção da celulose*

A celulose bacteriana será produzida em meio HS modificado, com a seguinte composição: 1,5% de glicose, 2,5% de milhocina, 0,27% de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,15% de ácido cítrico, pH 5. O meio HS modificado foi esterilizado a 121° por 15 minutos (Costa et al., 2017).

### *2.5. Preparo do pré-inoculo*

O micro-organismo foi mantido sob refrigeração em tubo de Falcon. O pré-inoculo foi preparado a partir do crescimento do micro-organismo a 30 °C durante 48 h, em condições estáticas, em 100 mL de meio líquido HS, pH 5,0, contidos em frascos Erlenmeyer de 500 mL.

### *2.6. Preparo do inóculo e condições de cultivo*

A suspensão celular preparada foi inoculada a 3% em meio HS modificado em frascos Scohttt de 500 ml contendo 100 ml do meio de produção e, em seguida, incubada estaticamente a 30 °C durante 6 dias. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### *2.7. Lavagem e purificação da película de CB*

Após o cultivo, o líquido metabólico e as películas de CB foram recolhidos e limpos por imersão em solução de NaOH a 4% durante 2h para eliminar as células retidas. Posteriormente a CB foi pesada e o rendimento calculado. As amostras foram mantidas em um dessecador antes da pesagem (Li et al., 2015).

### *2.8. Preparação da blenda de CB e PHB por dissolução*

A blenda foi preparada pesando-se 10 g do polímero PHB e colocando-o em um frasco reagente. Adicionou-se ao frasco, ácido acético, o qual foi submetido a aquecimento até que não houvesse mais material em suspensão. O recipiente contendo a solução obtida foi posto em banho-maria. Membranas purificadas e secas de CB, previamente pesadas, foram imersas na solução. A blenda de CB/PHB foi preparado com 30% de PHB. Após repouso, a blenda foi lavada com água deionizada e seco em estufa a 50° C até que não houvesse mais variação da sua massa. O produto final apresentou, visualmente, uma íntima ligação na mistura dos dois componentes. Todas as amostras secas foram mantidas em dessecador.

### *2.9. Incorporação do óleo essencial de Cravo da Índia à blenda de CB/PHB*

A fim de verificar a adição do óleo essencial como agente antibacteriano, adicionou-se 10% do óleo de cravo da Índia à blenda CB/PHB. Inicialmente, a blenda (1g) foi imersa em 150 mL etanol a 60°C durante 10 min. Ao final desse procedimento, pesou-se a blenda úmida para calcular a massa de etanol incorporada. Em seguida, uma solução contendo 3,0 g do óleo essencial em 20 mL de etanol foi preparada, sendo a blenda úmida imersa na solução, a qual foi aquecida durante 5 min até evaporação da solução etanólica. A blenda contendo o óleo essencial foi seca em estufa a 50 °C até secagem total, sendo a a diferença da massa entre a blenda com óleo e sem óleo calculada para obtenção do percentual de óleo incorporado.

### *2.10. Permeabilidade ao óleo*

3 g de óleo de soja foram colocados em um tubo de vidro (diâmetro interno: 25 mm e diâmetro externo: 27 mm) e, em seguida, um pedaço da blenda de PHB/CB de 50 x 50 mm de tamanho foi colocado e pressionado firmemente na extremidade aberta para selar o tubo. O tubo foi invertido sendo colocado um papel de filtro na lâmina de vidro, e então observado

se o óleo de soja permeou a blenda com o passar do tempo. Foram realizadas observações em pelo menos cinco amostras após 3 dias de armazenamento (Hu et al., 2009; Chen et al., 2013).

#### 2.11. Flexibilidade

O filme de PHB/CB foi dobrado por 100 vezes no mesmo traço para testar sua flexibilidade. O filme foi avaliado como bom se não houvesse fenda visualmente observada. Os tempos de dobramento foram registrados até aparecer rupturas no filme. A flexibilidade do filme foi correlacionada como pobre (vezes < 20), média ( $20 \leq$  vezes < 50), boa ( $50 \leq$  vezes < 100) e excelente (vezes  $\geq$  100) (Chen et al., 2013).

#### 2.12. Solubilidade em água

A solubilidade em água do filme de CB/PHB foi medida colocando-se as películas de teste em água deionizada a 25°C, e depois o tempo para dissolver completamente o filme foi gravado (Chen et al., 2014).

#### 2.13. Atividade antimicrobiana da blenda de CB/PHB contendo óleo essencial

Para determinação do potencial antimicrobiano, sobretudo antibacteriano da blenda de CB/PHB contendo óleo de cravo, o meio de cultivo Luria–Bertani (LB) foi inoculado com 1% (v/v) da suspensão de *Escherichia coli* UCP 1517. Sob condições estéreis, um pedaço da blenda esterilizada (2 cm × 2 cm) foi transferido para o tubo de ensaio inoculado. Como controle, a blenda de CB/PHB sem adição do agente antimicrobiano (óleo de cravo), bem como o meio LB inoculado com o micro-organismo também foram usados. Os ensaios foram realizados em triplicata. Todos os tubos foram incubados a 30°C. Amostras foram coletadas em intervalos de tempo determinados (6, 12, 24 e 30 horas) e suas D.O. medidas a 600 nm (Dobre et al., 2012).

#### 2.14. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras da blenda (CB/PHB), bem como amostras das membranas de CB puras e PHB puro previamente secas foram metalizadas (SANYU ELECTRON). A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das superfícies das amostras foi realizada utilizando um instrumento JEOL, JSM-5600 operando a 27 KV.

#### 2.15. Propriedades mecânicas

Para caracterização das propriedades mecânicas da blenda de BC/PHB, foram determinados a resistência à tração à carga máxima (MPa), o alongamento à ruptura ( $\epsilon$ ) (mm%) e o módulo de elasticidade de Young (E) de acordo com Rethwisch e William (2016).

Amostras da blenda seca foram cortadas em tiras retangulares (10 x 30 mm). A espessura média dos filmes foi de 0,10 mm. O ensaio de tração foi realizado à temperatura ambiente a uma velocidade de 5 m /min e uma carga estática de 0,5 N utilizando uma máquina de ensaio universal (EMIC DL - 500MF, Brasil) seguindo o Método ASTM D882. O programa de software Bluehill Lite™ foi utilizado para calcular a relação tensão-deformação e módulo de elasticidade.

#### 2.16. Difractometria de Raio-X (DRX)

Padrões de difratômetro de Raio-X das blendas foram medidos com um difractômetro Phillips X'pert MPD, utilizando radiação Cu K $\alpha$ . A percentagem de cristalinidade foi medida como  $x$  (%)  $\frac{1}{4} (I_{\max} - I_{\min}) / I_{\max} \times 100\%$ , onde  $I_{\max}$  é a altura do pico em  $2\theta = 22,5$  e  $I_{\min}$  o mínimo entre o pico em  $\theta = 22,5$  e o pico a  $2\theta = 16,3$  (Gomes et al., 2013).

#### 2.17. Análise termogravimétrica

Medições de análise termogravimétrica (TGA) foram realizadas utilizando um analisador de Mettler Toledo em amostras de cerca de 8 mg. Cada amostra foi varrida ao longo de um intervalo de temperatura desde a temperatura ambiente a 600°C a uma taxa de aquecimento de 10°C / min com uma taxa de fluxo de 20 mL / min para evitar a oxidação da amostra (Kiziltas et al., 2014).

#### 2.18. Reflectância total atenuada e espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (ATR/FTIR)

Antes da análise, as blendas foram condicionadas num dessecador contendo sílica gel durante duas semanas à temperatura ambiente para se obter filmes mais desidratados. Os filmes foram digitalizados com um Espectrômetro FTIR Bruker Modelo Equinox 55 (Bruker Co., Ettlingen, Alemanha). As amostras foram medidas em uma ATR horizontal através de uma placa de célula cristalina (45° ZnSe, 80 mm de comprimento, 10 mm de largura e 4 mm de espessura) (PIKE Technology Inc., Madison, WI, EUA). Análises foram realizadas para identificar grupos funcionais presentes nas amostras e analisar as interações entre as blendas de PHB/CB em espectrofotômetro entre 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Todos os espectros foram registrados após 32 varreduras com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  (Limpan et al., 2012).

#### 2.19. Análises estatísticas

Os dados de cada teste foram analisados estatisticamente. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar a significância na diferença entre fatores e níveis. A comparação das médias foi feito empregando um teste de Tukey para identificar quais grupos

foram significativamente diferente de outros grupos ( $p < 0,05$ ). Todos os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. Uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada para verificar as correlações entre os filmes de CB e PHB.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Rendimento das membranas de CB

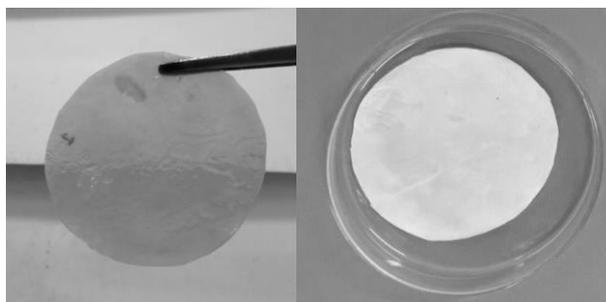
O rendimento em termos de membranas hidratadas foi de 370 g/L, enquanto que em termos de membranas secas obteve-se uma massa de 9,5 g/L. Após retiradas do meio de cultura a etapa de purificação com NaOH favoreceu a uniformização da cor, remoção dos metabolitos e possíveis resíduos do meio de cultura que estavam aderidos na superfície das membranas. (Costa et al., 2017).

#### 3.2. Características gerais das blendas de CB/PHB

Blendas de CB com diferentes polímeros vêm sendo estudadas para aplicação em várias áreas. São exemplos a quitosana (Fernandes et al., 2009), o poliuretano (Ummartyotin et al., 2012) e os polihidroxicanoatos (Barud et al., 2011; Zhijiang et al., 2011). Essas blendas apresentam transparência semelhantes, diferindo em relação ao método de obtenção das mesmas. (Ruka et al., 2013).

As blendas formadas, logo após a remoção da solução contendo o PHB, apresentam certa transparência, indicando a absorção da solução pela CB. Após a imersão em água, a CB torna-se opaca devido a súbita precipitação do PHB entre as fibras de celulose.

Após secagem das blendas de CB/PHB, a quantidade de PHB incorporada (30%) foi observada pela diferença de pesagem entre a massa da celulose seca com a massa da blenda após a incorporação do PHB. Membranas homogêneas de aproximadamente 150  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidas. A CB pura e a membrana da blenda CB/PHB apresentaram coloração visual leitosa e branca, respectivamente, conforme ilustrado na Fig. 1.



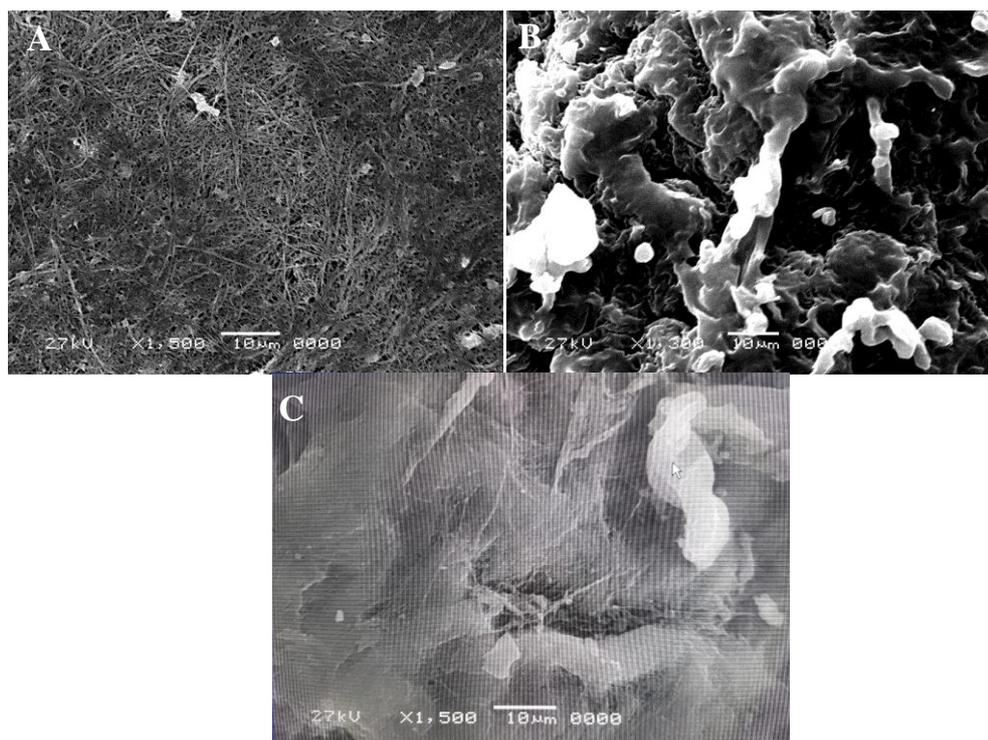
**Fig.1.** Coloração do filme de CB e da blenda de CB/PHB

### 3.3. Permeabilidade ao óleo, flexibilidade e solubilidade em água

Os filmes de CB/PHB foram testados quanto à permeabilidade a óleos, pois do contrário o óleo irá exsudar através dos filmes quando os mesmos forem usados para embalar produtos oleosos. Além do vazamento, isso também irá afetar a aparência, o sabor e as propriedades dos produtos. Os resultados mostraram que o óleo de soja não apresentou traço de permeação através dos filmes. Na verdade, os filmes de CB/PHB possuem muitos grupos hidroxila hidrofílicos e grupos carboxila, que impedem a adsorção de moléculas de óleo na superfície do filme. Resultados semelhantes foram observados por Hu et al., (2009) e por Chen et al., (2014) para filmes à base de amido de batata aditivado com glicerol como plastificante e à base de sulfato de celulose (NaCS) plastificados com glicerol, respectivamente. As blendas de CB/PHB também exibiram excelente flexibilidade, já que permaneceram intactos ao dobramento por muito mais do que 100 vezes. Quanto à solubilidade, os filmes obtidos pela blenda CB/PHB também demonstram ser insolúveis em água no tempo avaliado, conforme a metodologia utilizada. (Chen et al., 2013).

### 3.4. Caracterização das blendas de CB/PHB por MEV

A Fig. 2 mostra imagens do filme de PHB puro seco, do filme de celulose pura seca e da blenda de CB/PHB contendo 30% do polímero. A Fig. 2A apresenta imagem de superfície do filme de celulose pura, na qual se pode observar uma rede de nanofibras de celulose arranjadas de forma aleatória. A CB exibiu uma estrutura entrelaçada de nanofibrilas ultrafinas. Na estrutura de superfície do PHB puro (Fig. 2B) verifica-se uma estrutura rugosa e granular apresentando micropartículas. Por outro lado, a imagem da blenda de CB/PHB (Fig. 2C) demonstra microfibras de celulose preenchidas pelo PHB. Destaca-se também a presença das micropartículas de PHB associadas à rede de microfibras de celulose. Observa-se, assim, que o PHB pode ser visto não só na superfície das fibrilas de celulose, mas também interligado entre as mesmas, indicando que o PHB foi incorporado entre as fibrilas da CB, assim como foi notado por Ruka et al. (2013) e Barud et al. (2011) em relação à estrutura da superfície de blendas de celulose e PHB analisados em MEV.



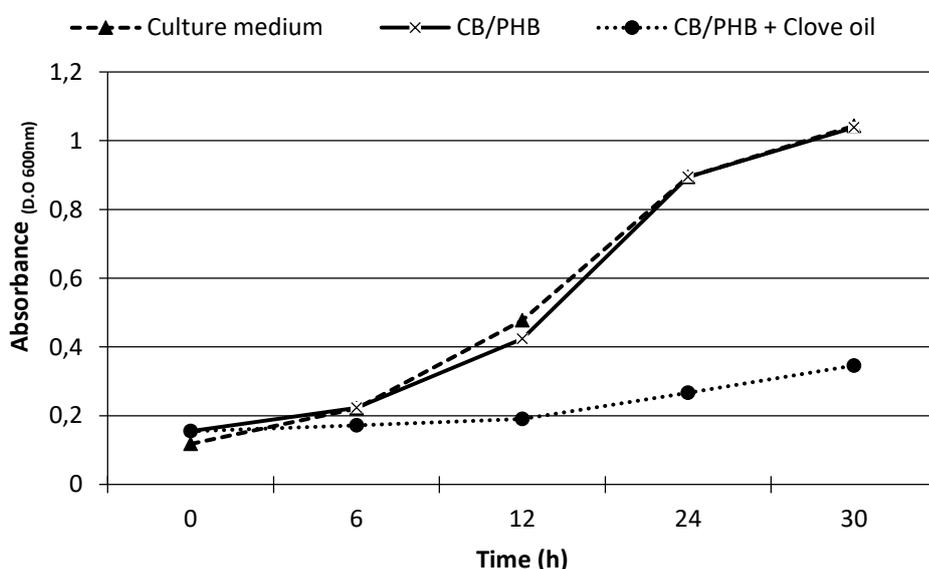
**Fig. 2.** Micrografia eletrônica de varredura do filme seco de CB (a); filme seco de PHB (b) e da blenda de CB/PHB (c). Magnitude: 1500x

### 3.5. Atividade antimicrobiana da blenda de CB/PHB contendo óleo essencial

Os resultados dos testes antimicrobiano utilizando *E. coli* são apresentados na Fig. 3. As amostras da blenda de CB/PHB contendo o óleo essencial de cravo demonstraram uma redução visível na taxa de crescimento da bactéria, especialmente nas primeiras horas de incubação, quando comparadas com as amostras do meio de cultivo e da blenda sem o óleo. Os resultados obtidos indicam que o filme de CB/PHB contendo o óleo de cravo pode ser promissor como aditivo antibacteriano para embalagem de alimentos. Resultados semelhantes foram obtidos por Dobre et al. (2012) para a blenda de poli (álcool vinílico) (PVA)/CB contendo ácido sórbico como agente antimicrobiano. Em geral, o componente majoritário do cravo da Índia é o eugenol, substância que apresenta efeito inibitório para o crescimento de muitos micro-organismos patogênicos (Mulla et al., 2017).

Outro aspecto importante para a obtenção de uma embalagem ativa é favorecer a migração do aditivo ativo para que esse possa interagir com o alimento, minimizando ou impedindo a proliferação microbiana. Assim, fica comprovado, que a blenda CB/PHB aditivada com o óleo de cravo, se mostrou adequada para essa finalidade, uma vez que a migração do

óleo se iniciou nas primeiras 6 horas de contato com as células bacterianas, favorecendo uma redução de aproximadamente 65% do crescimento microbiano no final de 30h.



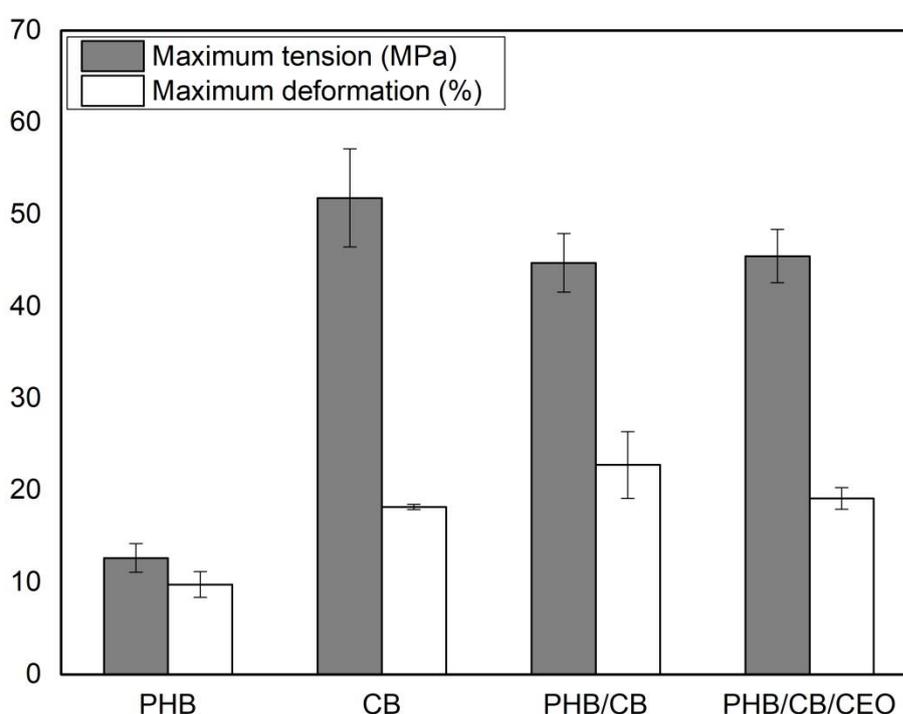
**Fig. 3.** Crescimento de *E. coli* em amostras da blenda de CB/PHB contendo óleo de cravo em função do tempo. Amostras da blenda sem o óleo essencial e o do meio de cultivo foram usadas como controle.

### 3.6. Ensaios Mecânicos

Os resultados do ensaio de resistência à tração e alongamento na ruptura da membrana de CB, da blenda de BC/PHB e da blenda de BC/PHB impregnado com óleo de cravo são mostrados na Fig. 4.

A tensão na ruptura da película de CB foi 83% maior que a do filme de PHB. As blendas de CB/PHB e CB/PHB impregnado com o óleo de cravo, por sua vez, apresentaram uma resistência à ruptura mais próximas dos valores da membrana de CB pura, 45 MPa. Esses valores devem ser comparados com o valor observado para o PHB puro, que apresenta resistência à tração de 12,62MPa. A eficiência da rede tridimensional das microfibras como um bom reforço para polímeros e resinas tem sido descrita (Fernandes et al., 2009). Em outras palavras, os filmes de CB e de CB/PHB exibiram valores similares para tensão e deformação na ruptura, mas valores superiores comparados ao PHB sozinho. Também pode ser visto um pequeno aumento na deformação específica quando 30% de PHB é misturado á 70% de CB, compatibilizando mais uma vez a tendência de maior alongamento desse novo material.

A incorporação do PHB também foi evidenciada pelas imagens do MEV, como mostrado anteriormente. Esse comportamento pode ser devido à boa dispersão do PHB na rede de CB. A combinação dos grânulos de PHB com as redes de celulose resulta em uma estrutura de fibra mais densa, com resistência mecânica melhorada, devido à boa adesão interfacial e à formação de fortes interações entre as cadeias de CB e PHB, como relatado por Fernandes et al. (2009). Segundo Barud et al. (2011), a resistência à tração diminui a partir da adição de 50% de PHB à membrana de CB, considerando que o PHB apresenta fracas propriedades mecânicas, sendo um polímero rígido e quebradiço e a adição de CB ao PHB, mostrou-se compatível, resultando num melhoramento das propriedade mecânica desse poliéster.



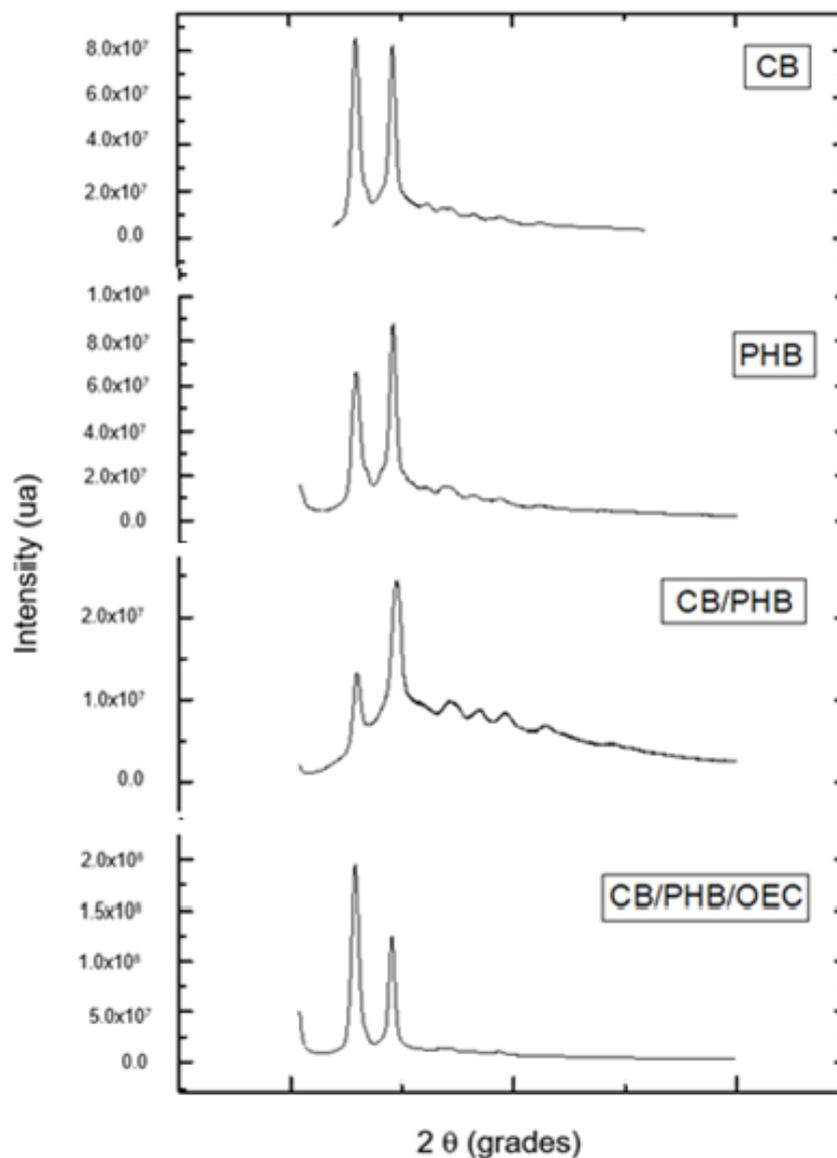
**Fig. 4.** Tensão Máxima (MPa) e Alongamento (%) das amostras de PHB, de CB, da blenda de CB/PHB e da blenda impregnada com óleo de cravo (CB/PHB/OEC)

### 3.7. Difractometria de Raio-X (DRX)

A Figura 5 apresenta os difratogramas de raios X (DRX) da CB, do PHB, da CB/PHB e da CB/PHB/OEC. Para os filmes de PHB puro e CB pura, como era de se esperar, observaram-se características de polímeros semi-cristalinos, e essa estruturação se mantém para a blenda de CB/PHB e CB/PHB/OEC.

Através do índice de cristalinidade (IC), que foi calculado com base na intensidade do pico usando o método Segal (1959), pode-se observar que a CB apresentou um percentual

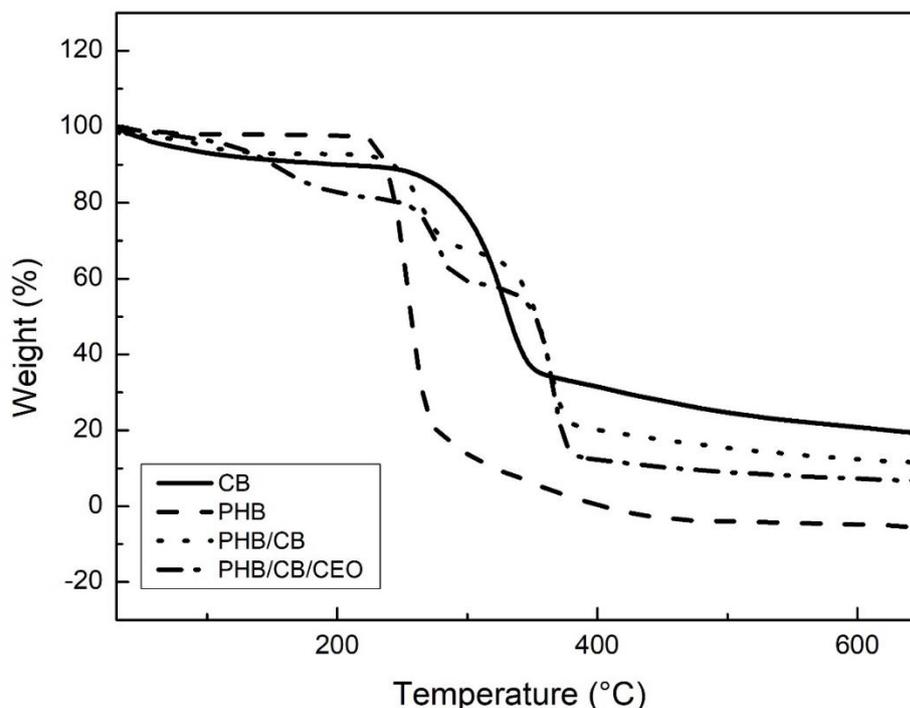
de cristalinidade maior com relação ao PHB puro e a blenda, que foi de 86% . O filme de PHB puro apresentou uma cristalinidade de 71%, enquanto a blenda CB/PHB apresentou um IC de 82%. Já a blenda contendo o óleo essencial apresentou uma cristalinidade de 80%. Estes resultados mostram que a incorporação do PHB diminui a cristalinidade da membrana de CB. Mais uma vez, a adição do PHB na matriz da celulose interfere positivamente na propriedade da celulose e, nesse caso específico, diminuindo a cristalinidade, uma vez que incorporação do mesmo diminui a interação intermolecular na CB pura. Essa alteração da cristalinidade interferiu diretamente nas propriedades mecânicas da membrana, diminuindo a tensão e gerando um material mais elástico quando comparado com a CB pura. (Ruka et al., 2013)



**Fig. 5.** DRX das amostras de PHB, de CB, da blenda de CB/PHB e da blenda impregnada com óleo de cravo (CB/PHB/OEC)

### 3.7. Análise Termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica dos filmes de CB e PHB, da blenda de CB/PHB e da blenda impregnada com óleo de cravo (CB/PHB/OEC) foram investigadas através da análise termogravimétrica (TGA) e os resultados estão apresentados na Fig. 6 e Tabela 1.



**Fig. 6.** TGA das amostras de PHB, de CB, da blenda de CB/PHB e da blenda impregnada com óleo de cravo (CB/PHB/OEC)

Observando-se ambos o gráfico e a tabela 1, percebe-se que para o filme de CB houve duas etapas de perda de massa: a primeira etapa refere-se à evaporação da água remanescente no filme e a segunda etapa ocorre pela pirolise do polímero. Para o filme de PHB observa-se apenas um estágio de perda de massa, referente à sua decomposição térmica.

Para as blends poliméricas, a degradação do material polimérico apresentou duas etapas distintas, sendo uma etapa relativa à celulose bacteriana e outra referente ao PHB. Os resultados obtidos corroboram com os estudos de Barud et al. (2011) que também observou um aumento da temperatura de degradação da blenda polimérica, indicando um possível aumento da estabilidade do material devido ao PHB cristalizar-se entre as microfibras da celulose bacteriana. Para os filmes aditivados com o óleo essencial de cravo da Índia,

observa-se mais um estágio de degradação, conforme a Tabela 1, entre 121 e 188 °C, que segundo Choi et al. (2009) é referente a reação oxidativa do eugenol, componente majoritário do óleo.

**Tabela 1.** Dados de decomposição térmica das amostras de PHB, de CB, da blenda de CB/PHB e da blenda impregnada com óleo de cravo (CB/PHB/OEC) obtidos a partir das curvas de TGA

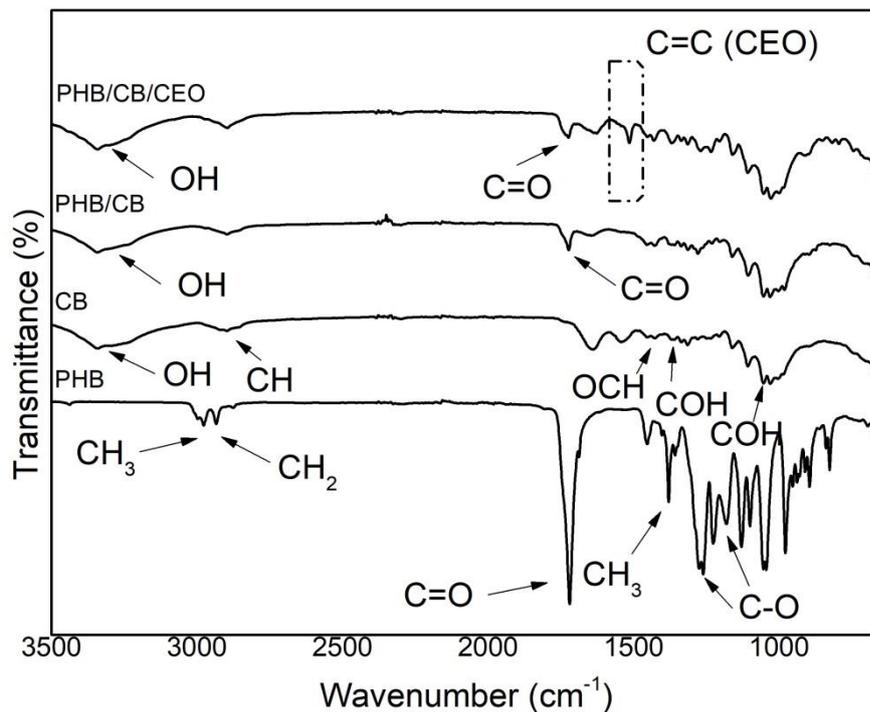
Amostras	Estágio 1 (°C)			Estágio 2 (°C)			Estágio 3 (°C)			Estágio 4 (°C)		
	T <sub>onset</sub>	T <sub>offset</sub>	T <sub>max</sub>	T <sub>onset</sub>	T <sub>offset</sub>	T <sub>max</sub>	T <sub>onset</sub>	T <sub>offset</sub>	T <sub>max</sub>	T <sub>onset</sub>	T <sub>offset</sub>	T <sub>max</sub>
CB	80	101	90	-	-	-	-	-	-	272	351	328
PHB	-	-	-	-	-	-	228	283	253	-	-	-
CB/PHB	84	106	91	-	-	-	243	286	262	332	378	358
CB/PHB/OEC	-	-	-	121	188	153	262	288	275	346	379	364

### 3.9. Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR)

A Fig. 7 mostra regiões relevantes dos espectros de FTIR. As bandas principais observadas para celulose bacteriana pura podem ser atribuídas a estiramento do grupo OH ( $3286\text{ cm}^{-1}$ ), estiramento CH de alcanos e estiramento assimétrico  $\text{CH}_2$  ( $2921\text{ cm}^{-1}$ ), deformação C-OH e CH ( $1399\text{ cm}^{-1}$ ).

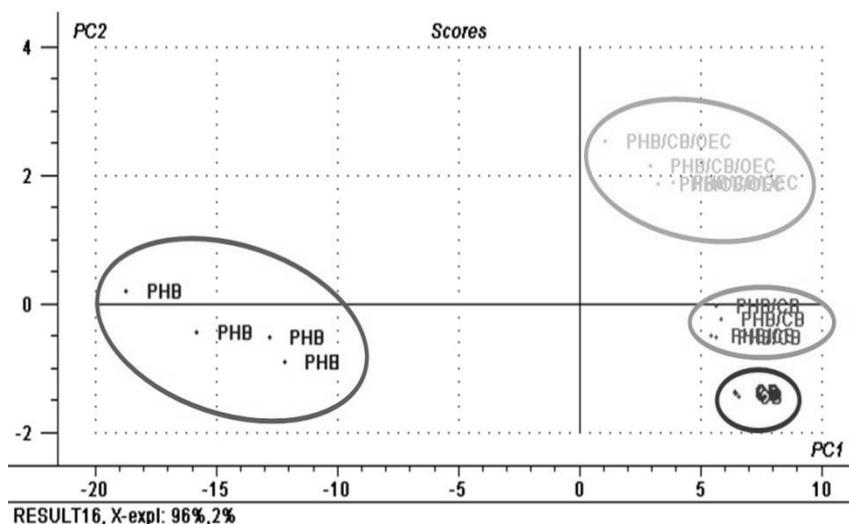
As principais bandas observadas no espectro de PHB são atribuídas a alongamentos C-O ( $1282\text{ cm}^{-1}$ ) e C=O ( $1850\text{ cm}^{-1}$ ), e picos a  $2853\text{ cm}^{-1}$ , referente ao alongamento de  $\text{CH}_2$  e de  $2926\text{ cm}^{-1}$  e  $1400\text{ cm}^{-1}$ , referentes ao alongamento de  $\text{CH}_3$ , corroborando aos resultados obtido por Barud et al., (2011). Os espectros obtidos para as blends apresentam basicamente as bandas observadas para os dois polímeros individuais ponderados pelo conteúdo relativo. A região entre  $2000$  e  $3500\text{ cm}^{-1}$  parece pouco afetada pelo conteúdo relativo dos dois componentes, enquanto as alterações  $1500$  e  $2000\text{ cm}^{-1}$  parecem estar relacionadas à mudança na cristalinidade da celulose observada nas medidas de DRX.

Para a blenda de CB/PHB contendo o óleo essencial de Cravo, observa-se uma banda na região de  $1510\text{ cm}^{-1}$ . Esse pico é atribuído às ligações C=C do grupo aromático do eugenol, componente majoritário presente no óleo essencial de cravo (OEC) (Narayran et al., 2013).



**Fig. 7.** Espectros de PHB, de CB, da blenda de CB/PHB e da blenda impregnada com óleo de cravo (CB/PHB/OEC)

A análise de componentes principais foi utilizada como uma ferramenta para complementar os resultados dos espectros de infravermelho, cujo objetivo foi evidenciar a diferença entre os filmes poliméricos, a blenda e a adição do óleo essencial de cravo. Através do gráfico das *scores* (Fig. 8) observa-se que a primeira componente principal explicou 96% das informações espectrais, a segunda explicou mais 2%. Pode-se observar a formação de agrupamentos em função da formulação dos filmes. Pode-se constatar a partir dessa análise que houve a diferenciação química da matriz dos filmes puros de CB e de PHB, da blenda de CB/PHB e da blenda de CB/PHB impregnada com óleo essencial de cravo da Índia. Portanto, é possível afirmar que o óleo essencial ficou incorporado em toda a matriz polimérica, assim apresentando um bom indicativo que o agente funcional estará presente em toda a extensão da embalagem.



**Fig. 8.** Representação gráfica da Análise de Componentes Principais do PHB, da CB, da blenda de CB/PHB e da blenda de CB/PHB impregnada com óleo de cravo (CB/PHB/OEC)

#### 4. Conclusões

Uma blenda de celulose bacteriana (CB) e poli (3-hidroxibutirato) (PHB) foi preparado a partir de membranas de CB obtidas a partir de culturas de *Gluconacetobacter hansenii* e de soluções de PHB em ácido acético. A CB produzida em meio alternativo constitui um insumo de alto valor agregado, não só do ponto de vista científico, como também do ponto de vista ambiental, econômico e social. As análises por microscopia eletrônica de varredura revelaram um revestimento da superfície CB por deposição do PHB, mostrando microfibrilas de CB envolvendo grãos de PHB que precipitam dentro da rede da CB. Os polímeros CB e PHB apresentam interação compatível para a formação de uma blenda estável nas condições avaliadas nesse trabalho. A blenda formada pela combinação de CB e PHB apresenta características mecânicas favoráveis para uso em embalagens de alimentos. A combinação de polímeros naturais e biodegradáveis, como a CB e o PHB pode fornecer, no futuro próximo, novos produtos biotecnológicos que atendam às necessidades do mercado mundial que busca opções seguras e compatíveis com o meio ambiente, permitindo uma redução dos impactos ambientais resultante do uso de embalagens não degradáveis.

## Agradecimentos

Este estudo recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco (FACEPE), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código 001), do Programa de Pesquisa & Desenvolvimento da Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL), e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Os autores agradecem aos laboratórios da Universidade Católica de Pernambuco, da Universidade Federal de Pernambuco e do Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação, Brasil.

## 5. Referências

- Almeida, L.R., Martins, A. R., Fernandes, E.M., Oliveira, M.B., Correlo, V.M., Pashkuleva, I., 2013. New biotextiles for tissue engineering: development, characterization and in vitro cellular viability. *Acta Biomaterialia* 9 (9), 8167–8181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.05.019>
- Barud, H.S., Souza, J.L., Santos, D.B., Crespi, M.S., Ribeiro, C.A., Messaddeq, Y., Ribeiro, S.J.L., 2011. Bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) composite membranes. *Carbohydrate Polymers* 83 (3), 1279–1284. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.049>
- Bazzo, G.C., Lemos-Senna, E., Pires, A.T.N., 2009. Poly (3 Hydroxybutyrate) / Chitosan / Ketoprofen or Piroxicam Composite Microparticles: Preparation and Controlled Drug Release Evaluation. *Carbohydrate Polymers* 77 (4), 39–844. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.03.006>
- Chen, G., Liu, B., Zhang, B., 2014. Characterization of composite hydrocolloid film based on sodium cellulose sulfate and cassava starch. *Journal of Food Engineering* 125, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.026>
- Choi, M., Soottitantawat, A., Nuchuchua, O., Min, S., & Ruktanonchai, U., 2009. Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion – diffusion method. *Food Research International*, 42 (1), 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.09.011>
- Chen, G., Zhang, B., Zhao, J., Chen, H., 2013. Development and characterization of food packaging film from cellulose sulfate. *Food Hydrocolloids* 35, 476–483. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.003>
- Costa, A.F.S., Rocha, M.A.V., Sarubbo, L.A., 2017. Bacterial cellulose: an ecofriendly biotextile. *International Journal of Textile and Fashion Technology* 7, 11-26.

- Dobre, L.M., Stoica-Guzun, A., Stroescu, M., Jipa, I.M., Dobre, T., Ferde, M., Ciumpiliac, S., 2012. Modelling of sorbic acid diffusion through bacterial cellulose-based antimicrobial films. *Chemical Papers* 66 (2), 144–151. <http://dx.doi.org/10.2478/s11696-011-0086-2>
- Fernandes, S.C.M., Oliveira, L., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., Pascoal Neto, C., Gandini, A., Desbrières, J. 2009. Novel transparent nanocomposite films based on chitosan and bacterial cellulose. *Green Chemistry* 1, 2023–2029. <http://dx.doi.org/10.1039/b919112g>
- Ferreira, A.R.V., Alves, V.D., Coelho, I.M., 2016. Polysaccharide-Based Membranes in Food Packaging Applications. *Membranes* 6 (2), 1-17. <http://dx.doi.org/10.3390/membranes6020022>
- Gomes, F.P., Silva, N.H.C.S., Trovatti, E., Serafim, L.S., Duarte, M. F., Silvestre, A.J.D., Pascoal Neto, C., Freire, C.S.R. 2013. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue. *Biomass and Bioenergy* 55, 205 – 211. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.02.004>
- GREEN FACTS. Report highlights—Trends of plastic waste in the EU. <http://www.greenfacts.org/highlights/2011/02/trends-of-plastic-waste-in-the-eu-environment-options-for-regulatory-initiatives/> (accessed on 3 July 2017).
- Han, J.H., Floros, J.D. Active packaging: A nonthermal process. In Tewari, G.; Juneja, V.K. (Eds.), *Advances in thermal and non-thermal food preservation* 9, 167–183. Ames, IA, USA: Blackwell Publishing, 2007. <https://doi.org/10.1002/9780470277898.ch9>
- Hestrin, S., Schramm, M., 1954. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemistry Journal*, 58 (2), 345–352. <https://doi.org/10.1042/bj0580345>
- Hu, G., Chen, J., Gao, J., 2009. Preparation and characteristics of oxidized potato starch films. *Carbohydrate Polymers* 76 (2), 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.10.032>
- Hungund, B.S., Gupta, S.G., 2010. Improved production of bacterial cellulose from *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2. *Journal of Microbial and Biochemical Technology* 2, 127–133. <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000037>
- Jiang, L., Morelius, E., Zhang, J., Wolcott, M., 2008. Study of the Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/Cellulose Nanowhisker Composites Prepared by Solution Casting and Melt Processing. *Journal of Composite Materials* 42 (24), 2629–2645. <http://dx.doi.org/10.1177/0021998308096327>
- Li, Z., Wang, L., Hua, J., Jia, S., Zhang, J., Liu, H., 2015. Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*. *Carbohydrate Polymers* 120, 115–119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.061>.
- Mulla, M., Ahmed, J., Al-Attar, H., Aguirre, E.C., Arfat, Y.A., Auras, R., 2017. Antimicrobial efficacy of clove essential oil infused into chemically modified LLDPE film for chicken

- meat packaging. *Food Control* 73, 663-671.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.018>
- Narayanan, A., Neera, M., Ramana, K.V., 2013. Synergized Antimicrobial Activity of Eugenol Incorporated Polyhydroxybutyrate Films Against Food Spoilage Microorganisms in Conjunction with Pediocin. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 170, 1379-1388.  
<https://doi.org/10.1007/s12010-013-0267-2>
- PLASTICS EUROPE. *Plastics—The facts 2014/2015; Plastics Europe—Association of plastics manufacturers: Brussels, Belgium, 2015.*  
[https://www.plasticseurope.org/application/files/5515/1689/9220/2014plastics\\_the\\_facts\\_PubFeb2015.pdf](https://www.plasticseurope.org/application/files/5515/1689/9220/2014plastics_the_facts_PubFeb2015.pdf), (accessed in 10/09/2018).
- Reis, K.C., Pereira, J.; Smith, A.C., Carvalho, C.W.P., Wellner, N., Yakimets, I., 2008. Characterization of polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate (PHB-HV)/maize starch blend films. *Journal Food Engineering* 89 (4), 361–369.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.04.022>
- Rethwisch, D.G.Jr., William, D.C., 2016. *Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução*, LTC (Eds), Ed. 9, Rio de Janeiro.
- Ruka, D.R., Simon, G.P., Dean, K.M., 2013. In situ modifications to bacterial cellulose with the water insoluble polymer poly-3-hydroxybutyrate. *Carbohydrate Polymers*, 92 (2), 1717–1723. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.007>
- Scandola, M., Ceccorulli, G., Pizzoli, M., 1992. Miscibility of bacterial poly(3-hydroxybutyrate with cellulose esters. *Macromolecules* 25 (24), 6441–6446.  
<https://doi.org/10.1021/ma00050a009>
- Segal, L., Creely, J. J., Martin, A. E., & Conrad, C. M., 1959. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal* 29 (10) 786–794. <https://doi.org/10.1177/004051755902901003>
- Tumwesigye, K.S., Oliveira, J.C., Sousa-Gallagher, M.J., 2016. New sustainable approach to reduce cassava borne environmental waste and develop biodegradable materials for food packaging applications. *Food Packaging Shelf Life* 7, 8–19.  
<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2015.12.001>
- Ummartyotin, S., Juntaro, J., Sain, M., Manuspiya, H., 2012. Development of transparent bacterial cellulose nanocomposite film as substrate for flexible organic light emitting diode (OLED) display. *Industrial Crops and Products* 35, 92–97.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.025>
- Vijayendra S.V.N., Shamala, T.R., 2013. Film forming microbial biopolymers for commercial applications—A review. *Critical Reviews in Microbiology* 34 (4), 338-357.  
<http://dx.doi.org/10.3109/07388551.2013.798254>

- Vinhas, G.M., Almeida, Y.M.B., Lima, M.A.G. A., 2007. Estudo das propriedades e biodegradabilidade de blendas de poliéster/amido submetidas ao ataque microbiano. *Química Nova* 30 (7), 1584-1588. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000700016>
- Yang, K.K., Wang, X.L., Wang, W.Y., 2007. Progress in Nanocomposite of Biodegradable Polymer. *Journal of Industrial Engineering Chemistry* 13 (4), 485–500. <https://doi.org/10.1.1.565.9881&rep>
- Zhijiang, C., Guang, Y. Kim, J., 2011. Biocompatible nanocomposites prepared by impregnating bacterial cellulose nanofibrils into poly(3-hydroxybutyrate). *Current and Applied Physics* 1, 247–249.

# **CAPÍTULO III**

## CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos nessa pesquisa permitem as seguintes conclusões:

- A produção de CB pode ser uma alternativa na geração de compósitos industriais.
- A CB se apresenta como uma matéria-prima sustentável, pois, durante o processo de produção, uso e descarte, o impacto ambiental é quase nulo.
- A CB produzida em meio alternativo constitui um insumo de alto valor agregado, não só do ponto de vista científico, como também do ponto de vista ambiental, econômico e social.
- Os polímeros CB e PHB apresentam interação compatível para a formação de um compósito estável nas condições avaliadas nesse trabalho.
- A blenda formada pela combinação de CB e PHB apresenta características mecânicas e térmicas favoráveis para uso em embalagens de alimentos.
- As análises por microscopia eletrônica de varredura revelaram um revestimento da superfície CB por deposição do PHB, mostrando microfibrilas de CB envolvendo pellets de PHB que precipitam dentro da rede da CB.
- A combinação de polímeros naturais e biodegradáveis, como a CB e o PHB pode fornecer, no futuro próximo, novos produtos biotecnológicos que atendam às necessidades do mercado mundial que busca opções seguras e compatíveis com o meio ambiente.
- A blenda formada pela combinação de CB e PHB apresentou propriedades atrativas para uso em embalagens de alimentos.
- O óleo essencial de cravo-da-índia foi favorável como agente antibacteriano para uma futura aplicação da blenda como embalagem ativa para alimentos, além de não ter comprometido as propriedades dos polímeros.
- A obtenção de blendas à base de CB e o PHB pode permitir uma redução dos impactos ambientais resultante do uso de embalagens não degradáveis.

# APÊNDICE

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de  
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2018 015333 1

Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: INSTITUTO AVANÇADO DE TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 23696238000107

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Sociedade com intuito não econômico

Endereço: Rua Joaquim de Brito, 216 - Boa Vista

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50070-280

País: Brasil

Telefone: 8130198525

Fax: 8130198525

Email: bruno.santos@iati.org.br

Dados do Pedido

---

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): "PROCESSO DE INCORPORAÇÃO DO POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) EM UMA PELÍCULA DE CELULOSE BACTERIANA UTILIZANDO ÁCIDO ACÉTICO"

Resumo: A presente Invenção, que pertence às áreas de microbiologia aplicada e biotecnologia, refere-se ao processo para produção de um compósito à base de celulose bacteriana, cultivada em resíduo proveniente do beneficiamento do milho, como fonte alternativa de carbono e nitrogênio. O biofilme de celulose estéril e seco foi submerso em uma solução de PHB que foi solubilizado em 130 mL de solvente polar prótico (ácido acético glacial) a quente durante 24 horas; em seguida foi mergulhado em água deionizada possibilitando o desenvolvimento de um novo produto biotecnológico. O excesso de PHB superficial foi removido por sucessivas lavagens utilizando-se água destilada. O biocompósito foi seco a 50 °C até que, não houvesse mais variação da sua massa. As caracterizações realizadas no biofilme comprovaram uma concentração de PHB entre as micro e nanofibrilas da película de celulose bacteriana, comprovando a incorporação do PHB em CB e consequentemente formando um biocompósito com valor agregado.

Figura a publicar: Sim

## Submission Confirmation

Caixa de entrada x



**Journal of Food Engineering <eesserver@eesmail.elsevier.com>**

qua, 12 de  
dez 17:55  
(Há 2 dias)

para eu, leonie

Traduzir mensagem

Desativar para: inglês

\*\*\* Automated email sent by the system \*\*\*

Dear Sarubbo,

Your submission entitled "Production of a bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) blend for food packaging" has been received by Journal of Food Engineering

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/jfoodeng/>.

Your username is: [leonie.sarubbo@unicap.br](mailto:leonie.sarubbo@unicap.br)

If you need to retrieve password details, please go to:

[http://ees.elsevier.com/jfoodeng/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/jfoodeng/automail_query.asp)

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System  
Journal of Food Engineering

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

# **Production of a bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) blend for food packaging**

Rodrigo M. B. Albuquerque<sup>a</sup>, Hugo M. Meira<sup>a,b</sup>, Ivo D. L. Silva<sup>c</sup>, Fabíola Carolina G. Almeida<sup>a,b</sup>,  
Andréa Fernanda S. Costa<sup>b,d</sup>, Raquel D. Rufino<sup>a</sup>, Glória M. Vinhas<sup>c</sup>, Leonie A. Sarubbo<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> *Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Recife, Pernambuco, Brazil*

<sup>b</sup> *Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI), Recife – Pernambuco, Brazil*

<sup>c</sup> *Centro de Tecnologia e Geociências, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil*

<sup>d</sup> *Centro de Design e Comunicação, Centro Acadêmico do Agreste, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Caruaru, Pernambuco, Brazil*

\*Leonie Asfora Sarubbo (Author for correspondence)

Tel.: +55 81 21194084; fax: +55 81 21194000.

E-mail: leonie.sarubbo@unicap.br

Running title: **Production of a BC/PHB blend for food packaging**

## **Abstract**

The aim of the present study was to produce a blend of BC and PHB from the combination of pure BC membranes and 30% PHB in acetic acid. Clove essential oil was then added as an antimicrobial agent. bacterial cellulose (BC) membranes were produced from *Gluconacetobacter hansenii* in a modified Hestrin-Schramm medium containing corn steep liquor. The SEM analyses revealed a homogeneous lining on the BC surface due to the deposition of PHB. Other analyses (oil permeability, flexibility and water solubility) demonstrated the improvement of the material due to the blend of the polymers. The addition of the essential oil led to a substantial reduction in microbial growth and better mechanical and thermal properties were found in comparison to the pure BC membrane. The new material, composed of BC and PHB with the addition of clove essential oil, has attractive properties for use as a biocompatible, biodegradable, active food packaging wrap.

*Keywords:* Bacterial cellulose; *Gluconacetobacter hansenii*; industrial waste; PHB; essential oils; blends; active packaging for food.

## **1. Introduction**

The packaging of food is essential to the containment, protection and preservation of products and provides a medium for communicating information about the product, brand, etc. (Ferreira et al., 2016). However, the crucial problem with regard to the use of plastics for packaging is its post-consumption fate, as packaging is by far the major contributor (63%) of plastic waste products (Green Facts, 2011). Moreover, some materials are difficult to reuse. Indeed, it is estimated that less than 14% of plastic packaging materials are recyclable (Tumwesigye et al., 2016).

Since most plastics are non-biodegradable, these materials remain in the environment for long periods of time and continue to be a threat to human health and the environment (Plastics Europe, 2015a). Therefore, composites formed by biodegradable polymers obtained using renewable resources are an attractive alternative to petroleum-based plastics, since the degradation of these products leads to

non-toxic waste that does not harm the environment. However, these biopolymers have limitations with regard to use as disposable packaging, such as low thermal stability during processing and little flexibility. To overcome these limitations, a blend of two polymers [one with a structure in the form nanometric filament (bacterial cellulose) and one with a property similar to a synthetic polymer (polyhydroxybutyrate)] offers a promising alternative. Several studies have focused on the development of completely biodegradable blends manufactured in a sustainable manner (Yang et al., 2007) and those that combine cellulose and polyhydroxyalkanoates are particularly important due to their intrinsic properties of biodegradability and biocompatibility.

Cellulose is the most abundant polymer on earth and the growing interest in this substance is due to its fibrillar nature and potential as a reinforcing material in composites. Moreover, cellulose is biodegradable, sustainable and renewable. It has long been produced from plant sources. However, bacterial cellulose (BC), which is produced in large quantities by bacteria of the genus *Gluconacetobacter*, is particularly attractive due to its purity and highly crystalline nanostructure. Several studies have described quantities of cellulose produced by species of *Gluconacetobacter* cultivated in different media obtained with the substitution of the carbon and/or nitrogen components and a wide variety of carbon and nitrogen sources, along with the inclusion of additional supplements, has been investigated for this purpose (Costa et al., 2017).

BC has been produced from agricultural and industrial waste products, including food waste, wheat straw, fruit scraps, glycerol residue and cotton-based textile waste products. Such waste products provide cheap raw materials for the production of BC while offering benefits to the environment (Li et al., 2015). The use of such waste materials enhances the sustainability of cellulose production by microorganisms and diminishes environmental pollution associated with the discarding of industrial waste.

Poly(hydroxyalkanoates) (PHA) constitute a family of intracellular biopolymers synthesised by bacteria as intracellular granules for storing carbon and energy. One member of this family – poly-3-hydroxybutyrate (PHB) – is produced by *Ralstonia eutropha*. PHB is a biocompatible, biodegradable, thermoplastic polymer with plastic properties that offers the possibility of replacing currently used non-

degradable polymers, such as polyethylene and polypropylene. PHB has a high fusing point ( $\sim 175^{\circ}\text{C}$ ), but its thermal instability and fragility are the main disadvantages for use in potential applications. However, BC is one of the substrates that can confer strength to PHB (Vijayendra and Shamala, 2013).

PHB/corn starch blends have been used in packaging (Reis et al., 2008; Vinhas et al., 2007) and PHB/chitosan/ketoprofen microparticles have been used for the controlled release of drugs (Bazzo et al., 2009). PHB/cellulose ester blends have been studied (Scandola et al., 1992), with completely miscible amorphous blends obtained using a PHB content of up to 50%. (PHB was found to crystallise at higher concentrations.) Jiang et al. (2008) developed two-layer films using PHB and cellulose paper, reporting reductions in moisture absorption and the roughness of the surface compared to cellulose paper. Therefore, the possibility of obtaining a biodegradable material with better mechanical and barrier properties has clearly been demonstrated.

The growing demand for minimally processed foods and fresh products raises issues regarding the quality and safety of these products. Therefore, new methods have been developed to inhibit microbial growth in foods while maintaining the freshness, quality and safety of the product. One of the most widely used methods is antimicrobial film (Souza et al., 2010). Antimicrobial packaging reduces the growth rate of microbes and increases the shelf life of foods. Active packaging is attracting the interest of the food and packaging industries, as low levels of total additives in the packaging system rather than conservatives added directly to food products can help meet the growing demand for products without conservatives (Han and Floros, 2007).

Therefore, the aim of the present study was to develop a novel polymeric material composed of a BC/PHB blend activated with clove essential oil so that the film can serve as a biodegradable antimicrobial active packaging material for use in the industry of perishable foods.

## **2. Materials and Methods**

## 2.1. Materials

Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) in powder form (brand name: Biocycle; molar mass: 563,110.00 g/mol; density: 1.23 g/ml; fusing point: 178.4°C) was acquired from PHB Industrial S.A. Sodium hydroxide (NaOH), chloroform and acetic acid were acquired from MERTEC (Brazil).

## 2.2. Microorganism

The bacterium *Gluconacetobacter hansenii* UCP UCP1619 deposited in the Culture Bank of the Centre for Environmental Sciences of *Universidade Católica de Pernambuco* was used as the bacterial cellulose producer.

## 2.3. Growth medium and standard maintenance of microorganism

The method used to maintain the viability of the microorganism and produce it in a pre-established standard medium was based on studies conducted by Hestrin and Schramm (1954) and adapted by Hungund & Gupta (2010) and Gomes et al. (2013). The Hestrin-Schramm (HS) medium used for the growth of the bacterium was composed of 20.0 g/l of glucose, 5.0 g/l of peptone, 5.0 g/l of yeast extract, 2.7 g/l of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 1.15 g/l of citric acid at pH 5.0. Moreover, 15 g/l of agar was added to the HS medium for the maintenance of the bacterium. Both media were sterilised at 121°C for 15 minutes and the maintenance medium was distributed among Petri dishes and Falcon tubes for the transference of the microorganism.

## 2.4. Cellulose production medium

Bacterial cellulose was produced in a modified HS medium containing 1.5% glucose, 2.5% corn steep liquor, 0.27% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.15% citric acid at pH 5.0. The modified HS medium was sterilised at 121°C for 15 minutes (Costa et al., 2017).

### *2.5. Preparation of pre-inoculum*

The microorganism was kept refrigerated in a Falcon tube. The pre-inoculum was prepared by growing the bacterium at 30°C under static conditions for 48 h in 100 ml of liquid HS medium, pH 6.0, in 500-ml Erlenmeyer flasks.

### *2.6. Preparation of inoculum and culture conditions*

The inoculum was prepared through the transference of 3% pre-inoculum in modified HS medium, followed by static cultivation at 30°C for 48 h. The cell suspension was inoculated at 3% in modified HS medium in 500-ml Schott flasks containing 100 ml of the production medium, followed by static incubation at 30°C for six days. The experiments were performed in triplicate.

### *2.7. Washing and purification of BC film*

After cultivation, the fermentation broth and BC pellicles were collected and cleaned by immersion in a 4% NaOH solution for 2 h to eliminate the retained cells. The BC was then weighed and the yield was calculated. The samples were placed in a desiccator prior to weighing (Li et al., 2015).

### *2.8. Preparation of BC/PHB blend by dissolution*

The blend was prepared by placing 10 g of the PHB polymer in a reagent flask, to which acetic acid was added, followed by heating until complete dissolution. The recipient with the solution was placed in a water bath. Previously weighed, purified, dried BC membranes were immersed in the solution. The BC/PHB blend was prepared with 30% PHB. After resting, the blend was washed with deionised water and dried in an oven at 50°C until reaching a constant mass. Visually, the end product exhibited a close bond in the blend of the two components. All dried samples were kept in a desiccator.

### *2.9. Incorporation of clove essential oil to BC/PHB blend*

Ten percent clove essential oil was added to the BC/PHB blend as an antimicrobial agent. First, the blend (1 g) was immersed in 150 ml of ethanol at 60°C for 10 min. The wet blend was then weighed to calculate the mass of ethanol incorporated. Next, a solution containing 3.0 g of the essential oil in 20 ml of ethanol was prepared. The wet blend was immersed in the solution, which was heated for 5 min until the evaporation of the ethanol solution. The blend containing the essential oil was placed in an oven at 50°C until complete drying and the difference in mass between the blend with and without oil was calculated to determine the percentage of oil incorporated.

### *2.10. Oil permeability*

Three grams of soybean oil were placed in a glass tube (inner diameter: 25 mm; outer diameter: 27 mm) and a piece of the BC/PHB blend (50 x 50 mm) was pressed firmly to the open end to seal the tube. The tube was inverted and placed on filter paper over a glass slide to determine whether the oil permeated the blend over time. Observations were made of at least five samples after three days of storage (Hu et al., 2009; Chen et al., 2013).

### *2.11. Flexibility*

The BC/PHB film was folded 100 times along the same line to test its flexibility. Flexibility of the film was considered good if no groove was visually detectable. The number of folds until failure was recorded and scored as follows: < 20 times = poor, 20 to 49 times = fair; 50 to 99 times = good and  $\geq$  100 times = excellent (Chen et al., 2013).

### *2.12. Water solubility*

The water solubility of the BC/PHB film was measured by placing the test pellicle in deionised water at 25°C. The time for the complete dissolution of the film was recorded (Chen et al., 2014).

### *2.13. Antimicrobial activity of BC/PHB blend containing essential oil*

For the determination of the antimicrobial potential of the clove essential oil in the BC/PHB blend, Luria-Bertani (LB) medium was inoculated with a 1% (v/v) *Escherichia coli* UCP 1517 solution. Under sterile conditions, a piece of the sterilised blend (2 × 2 cm) was transferred to a test tube inoculated with 5 ml of the fresh *E. coli* suspension. The BC/PHB blend without the addition of the antimicrobial agent (clove essential oil) and the LB medium inoculated with the microorganism were used as the controls. The assays were performed in triplicate. All tubes were incubated at 30°C. Samples were collected at predetermined time intervals (6, 12, 24 and 30 hours) and the optical densities were read at 600 nm (Dobre et al., 2012).

### *2.14. Scanning electron microscopy*

Samples of the BC/PHB blend, pure BC membranes and pure PHB were dried and coated with metal (SANYU ELECTRON). Scanning electron microscopy (SEM) of the surfaces of the samples was performed using a JEOL scanning electron microscope (model JSM-5600) operating at 27 KV.

### *2.15. Mechanical properties*

For the characterisation of the mechanical properties of the BC/PHB blend, resistance to traction at maximum load (MPa), deformation until breakage ( $\epsilon$ ) (mm%) and Young's elastic modulus (E) were determined based on Rethwisch & William (2016). Samples of the dried blend were cut into rectangular strips (10 x 30 mm). Mean film thickness was 0.10 mm. The traction test was performed at room temperature at a velocity of 5 m/min and a static load of 0.5 N using a universal testing machine (EMIC

DL - 500MF, Brazil), following the ASTM D882 method. The Bluehill Lite™ program was used to calculate the tension-deformation ratio and elastic modulus.

#### 2.16. X-ray diffractometry (XRD)

The XRD patterns of the blends were measured using a Phillips X'pert MPD diffractometer with Cu K radiation. The percentage of crystallinity was measured as  $x (\%) = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max}} \times 100\%$ , in which  $I_{\max}$  is the height of the peak at  $2\theta = 22.5$  and  $I_{\min}$  is the valley between the peaks at  $2\theta = 22.5$  and  $2\theta = 16.3$  (Gomes et al., 2013).

#### 2.17. Thermogravimetric analysis

Thermogravimetric analysis (TGA) was performed using a Mettler Toledo analyser on samples weighing approximately 8 mg. Each sample was scanned along a temperature range from room temperature to 600°C with a heating rate of 10°C/min and a flow rate of 20 ml/min to avoid the oxidation of the sample (Kiziltas et al., 2014).

#### 2.18. Attenuated total reflectance and Fourier-transform infrared (ATR/FTIR) spectroscopy

Prior to the analysis, the blends were placed in a desiccator containing silica gel for two weeks at room temperature to obtain more dehydrated films. The films were digitised with a Bruker FTIR spectrometer (Equinox 55 Model, Bruker Co., Ettlingen, Germany). The samples were measured in a horizontal ATR device through a crystalline cell plate (45° ZnSe, 80 mm in length, 10 mm in width and 4 mm in thickness) (PIKE Technology Inc., Madison, WI, USA). Analyses were conducted to identify functional groups in the samples and analyse the interactions among the BC/PHB blends in a spectrophotometer between 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . All spectra were recorded after 32 scans with a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$  (Limpan et al., 2012).

### 2.19. Statistical analysis

The data from each test were analysed statistically. Analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the significance in the differences between factors and levels. The comparison of means was performed using Tukey's test to identify which group differed significantly from other groups ( $p < 0.05$ ). All data were expressed as mean and standard deviation (SD). Principal components analysis was performed to determine correlations between the BC and PHB films.

## 3. Results and Discussion

The growing need for environmental preservation has intensified the use of renewable resources in the manufacturing of polymeric films, such as packaging wrap, for maintaining the quality of packaged foods. Cellulose-polyhydroxyalkanoate blends are potential candidates for this purpose due to their properties of biodegradability and biocompatibility. Cellulose is one of the most abundant natural polymers on earth and is produced mainly by plants. However, many bacteria, especially those of the genus *Gluconacetobacter*, produce a very peculiar form of cellulose with mechanical and structural properties that can be exploited in numerous industrial applications. Polyhydroxybutyrate (PHB) is a biodegradable bacterial polymer with thermoplastic properties that make it a potential candidate for the replacement of non-degradable polymers.

### 3.1. BC membrane yield

The yield in terms of hydrated membranes was 370 g/l and in terms of dried membranes was 9.5 g/l. After removal from the culture medium, the purification step with NaOH favoured a colour transformation as well as the removal of metabolites and possible residue from the culture medium adhered to the surface of the membranes.

### *3.2. General characteristics of BC/PHB blends*

BC blends with different polymers have been studied for applications in different fields. Examples of such blends include chitosan (Fernandes et al., 2009), polyurethane (Ummartyotin et al., 2012) and polyhydroxyalkanoates (Barud et al., 2011; Zhijiang et al., 2011).

Immediately after the removal of the solution containing PHB, the formed blends were somewhat transparent, indicating the absorption of the solution by the BC. After immersion in water, the BC became opaque due to the sudden precipitation of the PHB among the cellulose fibres.

After drying the BC/PHB blend, the amount of PHB incorporated (30%) was determined by the difference in weight between the dry cellulose and the blend after the incorporation of the PHB. Homogenous membranes of approximately 150  $\mu\text{m}$  in thickness were obtained. The pure BC and membrane of the BC/PHB blend had a milky and white colouration, respectively, as shown in Fig. 1.

***Please insert Figure 1***

### *3.3. Oil permeability, flexibility and water solubility*

The BC/PHB films were tested with regard to oil permeability to ensure that oil would not leak through the films when used for wrapping oily products. Besides leaking, permeability would also affect the appearance, flavour and properties of products. The results revealed that the soybean oil exhibited no trace of permeation through the films. BC/PHB films have hydrophilic hydroxyl and carboxyl groups that impede the adsorption of oil molecules to the surface. Hu et al. (2009) and Chen et al. (2014) report similar results for potato starch films with the addition of glycerol as a plasticiser and cellulose sulphate (NaCS) films plasticised with glycerol, respectively. The BC/PHB blends also exhibited excellent flexibility, as remaining intact after being folded more than 100 times. Regarding solubility, the films obtained by the BC/PHB blend were insoluble in water for the time evaluated using the method employed in this study.

### 3.4. SEM characterisation of BC/PHB blends

Fig. 2 shows the images of the pure dried PHB film, pure dried cellulose film and BC/PHB blend with a 30% polymer content. Fig. 2A shows the surface of the pure cellulose film, revealing a network of randomly arranged cellulose nanofibers. The BC exhibited an interlaced structure of ultrathin nanofibrils. Fig. 2B shows the surface of the pure PHB, revealing a rugged granular structure with microparticles. Fig. 2C shows the BC/PHB blend, revealing cellulose microfibrils filled with PHB as well as PHB microparticles associated with the cellulose microfiber network. PHB can be seen not only on the surface of the cellulose fibrils, but also interlinked between the fibrils, indicating that the PHB was incorporated between the fibrils of the BC. Ruka et al. (2013) and Barud et al. (2011) report similar results regarding the surface structure of cellulose and PHB blends analysed using SEM.

*Please insert Figure 2*

### 3.5. Antimicrobial activity of BC/PHB blend containing clove essential oil

The results of the antimicrobial tests with *E. coli* are displayed in Fig. 3. The samples of the BC/PHB blend containing clove essential oil achieved a visible reduction in the growth rate of the bacterium, especially in the first hours of incubation, compared to the samples of the culture medium and blend without the essential oil. The results indicate that the BC/PHB film with clove essential oil is a promising antimicrobial additive for food packaging. Dobre et al. (2012) report similar results for a poly(vinyl alcohol)/BC blend containing sorbic acid as the antimicrobial agent. The major component of clove essential oil is eugenol, which has an inhibitory effect on the growth of many pathogenic microorganisms (Mulla et al., 2017).

Another important aspect for an active packaging material is to favour the migration of the active ingredient so that it can interact with the food product, minimising or impeding microbial proliferation. Therefore, the BC/PHB blend with clove essential oil is adequate for this purpose, as the migration of the oil began in the first six hours of contact with the bacterial cells, favouring an approximately 65% reduction in microbial growth at the end of 30 h.

*Please insert Figure 3*

### 3.6. Mechanical tests

The results of the traction resistance and deformation tests of the BC membrane, BC/PHB blend and BC/PHB blend impregnated with clove essential oil are displayed in Fig. 4. The tension upon breakage of the BC film was 83% higher than that of the PHB film. The BC/PHB and BC/PHB + clove essential oil blends had traction resistance values closer to that found for the pure BC membrane. In contrast, the traction resistance value of the pure PHB was 12.62 MPa. The efficiency of the three-dimensional network of microfibrils and the good reinforcement for polymers and resins have been described in the literature (Fernandes et al., 2009). The findings show that the BC and BC/PHB films had similar values for tension and deformation upon breakage, but higher than those of PHB alone. Moreover, a slight increase in specific deformation was found when the blend was 30% PHB and 70% BC, further demonstrating the greater stretching of this novel material.

The incorporation of PHB was also evidenced in the SEM images, as shown above. This behaviour may be due to the good dispersion of PHB throughout the BC network. The combination of PHB granules and cellulose networks results in a denser fibre structure with enhanced mechanical strength due to the good interfacial adhesion and the formation of strong interactions between the BC chains and PHB, as reported by Fernandes et al. (2009). According to Barud et al. (2011), traction resistance diminishes beginning with a PHB content of 50% blended with the BC membrane, since PHB is a rigid, brittle polymer with weak mechanical properties. The addition of BC to PHB proved to be advantageous, resulting in an improvement in the mechanical properties of this polyester.

*Please insert Figure 4*

### 3.7. X-ray diffractometry (XRD)

Figure 5 displays the x-ray diffractograms (XRD) of the BC, PHB, BC/PHB and BC/PHB/clove essential oil (CEO). As expected, the pure PHB and pure BC films exhibited characteristics of semi-crystalline polymers and this structure was maintained in the BC/PHB blend and BC/PHB/CEO films.

The crystallinity index was calculated based on the intensity of the peak using the method proposed by Segal (1959). The BC had a higher percentage of crystallinity compared to the pure PHB and the blend. The crystallinity index was 71% for the pure PHB, 82% for the BC/PHB blend and 80% for the blend containing the essential oil. These results show that the incorporation of PHB to the cellulose matrix exerted a positive effect on the property of the cellulose, diminishing its crystallinity. This change in crystallinity directly affected the mechanical properties of the membrane, reducing the tension and generating a more elastic material in comparison to pure BC.

***Please insert Figure 5***

### *3.10. Thermogravimetric analysis (TGA)*

The thermal stability of the BC and PHB films, BC/PHB blend and blend impregnated with clove essential oil (BC/PHB/CEO) was investigated through thermogravimetric analysis (TGA). The results are displayed in Fig. 6 and Table 1.

***Please insert Figure 6***

The BC film lost mass in two stages: 1) during the evaporation of the water remaining in the film and 2) due to pyrolysis of the polymer. The PHB film lost mass in only one stage (during its thermal decomposition).

***Please insert Table 1***

For the blends, the degradation of the polymeric material occurred in two distinct stages: one related to the BC and the other related to the PHB. These findings are in agreement with data described by Barud et al. (2011), who also found an increase in the degradation temperature of the polymeric blend, indicating a possible increase in the stability of the material due to the crystallisation of the PHB

among the microfibrils of the bacterial cellulose. An additional degradation stage occurred for the film with the addition of clove essential oil (between 121 and 188°C), which is due to the oxidative reaction of the major component of the oil (eugenol) (Choi et al., 2009).

### 3.11. Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy

Fig. 7 shows relevant regions of the FTIR spectra. The main bands observed for the pure BC are attributed to the stretching of the OH group ( $3286\text{ cm}^{-1}$ ), CH stretching of alkanes, asymmetrical  $\text{CH}_2$  stretching ( $2921\text{ cm}^{-1}$ ) and the deformation of C-OH and CH ( $1399\text{ cm}^{-1}$ ).

The main bands observed in the PHB spectra are attributed to C-O ( $1282\text{ cm}^{-1}$ ) and C=O ( $1850\text{ cm}^{-1}$ ) elongations and peaks at  $2853\text{ cm}^{-1}$ , referring to the elongation of  $\text{CH}_2$ , and  $2926\text{ cm}^{-1}$  and  $1400\text{ cm}^{-1}$ , referring to the elongation of  $\text{CH}_3$ . These results are in agreement with data described by Barud et al. (2011). The spectra obtained for the blends basically exhibited the bands observed for the two individual polymers weighted by the relative content. The region between 2000 and  $3500\text{ cm}^{-1}$  seems to be affected little by the relative content of the two components, whereas the changes from 1500 to  $2000\text{ cm}^{-1}$  seem to be related to the change in the crystallinity of the cellulose determined by the XRD analysis.

A band in the region of  $1510\text{ cm}^{-1}$  is seen for the BC/PHB blend containing clove essential oil. This peak is attributed to C=C bonds of the aromatic group of eugenol, which is the major component in clove essential oil (Narayran et al., 2013).

#### *Please insert Figure 7*

Principal component analysis was used to complement the results of the FTIR analysis and demonstrate differences among the polymeric films, blend and blend with the addition of clove essential oil. The graphs of the scores (Fig. 8) show that the first principal component explained 96% of the spectral information and the second principal component explained more than two 2%. Clusters were formed as a function of the formulation of the films, demonstrating chemical differentiation of the matrix of the pure BC and PHB films, BC/PHB blend and BC/PHB blend impregnated with clove essential oil.

Therefore, the essential oil was incorporated throughout the entire polymeric matrix, which is a good indication that the antimicrobial agent would be present throughout the entire packaging.

*Please insert Figure 8*

#### **4. Conclusions**

A blend of bacterial cellulose (BC) and poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) was prepared beginning with BC membranes obtained from cultures of *Gluconacetobacter hansenii* and solutions of PHB in acetic acid. BC produced in an alternative medium constitutes an input with high aggregated value not only from the scientific standpoint, but also from the environmental, economic and social standpoint. The scanning electron microscopic analyses revealed a lining on the surface of the BC due to the deposition of PHB, demonstrating BC microfibrils enveloping grains of PHB, which precipitate within the BC network. The BC and PHB polymers exhibited an interaction compatible to the formation of a stable blend under the conditions evaluated in the present study. The blend formed by the combination of BC and PHB has mechanical characteristics that are favourable to its use in food packaging. In the near future, the combination of natural biodegradable polymers, such as BC and PHB, can furnish new biotechnological products that meet the needs of the world market, which seeks safe, environmentally friendly options. This technology can help reduce the environmental impact resulting from the use of non-degradable packaging.

**Acknowledgments** This study received funding from the Brazilian fostering agencies *Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco* (FACEPE [State of Pernambuco Science Assistance Foundation]), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES [Coordination for the Advancement of Higher Education Personnel] – Code 001), *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq [National Council for Scientific and Technological Development]) and the Research and Development Program of the *Agência Nacional de Energia Elétrica* (ANEEL [National Electrical Energy Agency]). The authors are grateful to the laboratories of

*Universidade Católica de Pernambuco* [Catholic University of Pernambuco], *Universidade Federal de Pernambuco* [Federal University of Pernambuco] and *Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação* [Advanced Institute of Technology and Innovation], Brazil.

## References

- Almeida, L.R., Martins, A. R., Fernandes, E.M., Oliveira, M.B., Correlo, V.M., Pashkuleva, I., 2013. New biotextiles for tissue engineering: development, characterization and in vitro cellular viability. *Acta Biomaterialia* 9 (9), 8167–8181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.05.019>
- Barud, H.S., Souza, J.L., Santos, D.B., Crespi, M.S., Ribeiro, C.A., Messaddeq, Y., Ribeiro, S.J.L., 2011. Bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) composite membranes. *Carbohydrate Polymers* 83 (3), 1279–1284. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.049>
- Bazzo, G.C., Lemos-Senna, E., Pires, A.T.N., 2009. Poly (3 Hydroxybutyrate) / Chitosan / Ketoprofen or Piroxicam Composite Microparticles: Preparation and Controlled Drug Release Evaluation. *Carbohydrate Polymers* 77 (4), 39–844. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.03.006>
- Chen, G., Liu, B., Zhang, B., 2014. Characterization of composite hydrocolloid film based on sodium cellulose sulfate and cassava starch. *Journal of Food Engineering* 125, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.026>
- Choi, M., Soottitantawat, A., Nuchuchua, O., Min, S., & Ruktanonchai, U., 2009. Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion – diffusion method. *Food Research International*, 42 (1), 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.09.011>
- Chen, G., Zhang, B., Zhao, J., Chen, H., 2013. Development and characterization of food packaging film from cellulose sulfate. *Food Hydrocolloids* 35, 476–483. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.003>

- Costa, A.F.S., Rocha, M.A.V., Sarubbo, L.A., 2017. Bacterial cellulose: an ecofriendly biotextile. *International Journal of Textile and Fashion Technology* 7, 11-26.
- Costa, A.F.S., Almeida, F.C.G., Vinhas, M.G., Sarubbo, L.A., 2017. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using corn steep liquor as nutrient sources, *Frontiers in Microbiology* 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02027>.
- Dobre, L.M., Stoica-Guzun, A., Stroescu, M., Jipa, I.M., Dobre, T., Ferde, M., Ciumpiliac, S., 2012. Modelling of sorbic acid diffusion through bacterial cellulose-based antimicrobial films. *Chemical Papers* 66 (2), 144–151. <http://dx.doi.org/10.2478/s11696-011-0086-2>
- Fernandes, S.C.M., Oliveira, L., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., Pascoal Neto, C., Gandini, A., Desbrières, J. 2009. Novel transparent nanocomposite films based on chitosan and bacterial cellulose. *Green Chemistry* 1, 2023–2029. <http://dx.doi.org/10.1039/b919112g>
- Ferreira, A.R.V., Alves, V.D., Coelho, I.M., 2016. Polysaccharide-Based Membranes in Food Packaging Applications. *Membranes* 6 (2), 1-17. <http://dx.doi.org/10.3390/membranes6020022>
- Gomes, F.P., Silva, N.H.C.S., Trovatti, E., Serafim, L.S., Duarte, M. F., Silvestre, A.J.D., Pascoal Neto, C., Freire, C.S.R. 2013. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue. *Biomass and Bioenergy* 55, 205 – 211. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.02.004>
- GREEN FACTS. Report highlights—Trends of plastic waste in the EU. <http://www.greenfacts.org/highlights/2011/02/trends-of-plastic-waste-in-the-eu-environment-options-for-regulatory-initiatives/> (accessed on 3 July 2017).
- Han, J.H., Floros, J.D. Active packaging: A nonthermal process. In Tewari, G.; Juneja, V.K. (Eds.), *Advances in thermal and non-thermal food preservation* 9, 167–183. Ames, IA, USA: Blackwell Publishing, 2007. <https://doi.org/10.1002/9780470277898.ch9>

- Hestrin, S., Schramm, M., 1954. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemistry Journal*, 58 (2), 345–352. <https://doi.org/10.1042/bj0580345>
- Hu, G., Chen, J., Gao, J., 2009. Preparation and characteristics of oxidized potato starch films. *Carbohydrate Polymers* 76 (2), 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.10.032>
- Hungund, B.S., Gupta, S.G., 2010. Improved production of bacterial cellulose from *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2. *Journal of Microbial and Biochemical Technology* 2, 127–133. <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000037>
- Jiang, L., Morelius, E., Zhang, J., Wolcott, M., 2008. Study of the Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/Cellulose Nanowhisker Composites Prepared by Solution Casting and Melt Processing. *Journal of Composite Materials* 42 (24), 2629–2645. <http://dx.doi.org/10.1177/0021998308096327>
- Kiziltas, E.E., Kiziltas, A., Gardner, D.J., 2015. Synthesis of bacterial cellulose using hot water extracted wood sugars, *Carbohydrate Polymers* 124, 131–138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.036>
- Li, Z., Wang, L., Hua, J., Jia, S., Zhang, J., Liu, H., 2015. Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*. *Carbohydrate Polymers* 120, 115–119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.061>.
- Limpan, N., Prodpan, T., Benjakul, S., Prasarnpran, S., 2012. Influences of degree of hydrolysis and molecular weight of poly(vinyl alcohol) (PVA) on properties of fish myofibrillar protein/PVA blend films, *Food Hydrocolloids* 29, 226-233. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.03.007>
- Mulla, M., Ahmed, J., Al-Attar, H., Aguirre, E.C., Arfat, Y.A., Auras, R., 2017. Antimicrobial efficacy of clove essential oil infused into chemically modified LLDPE film for chicken meat packaging. *Food Control* 73, 663-671. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.018>

- Narayanan, A., Neera, M., Ramana, K.V., 2013. Synergized Antimicrobial Activity of Eugenol Incorporated Polyhydroxybutyrate Films Against Food Spoilage Microorganisms in Conjunction with Pediocin. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 170, 1379-1388. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0267-2>
- PLASTICS EUROPE. *Plastics—The facts 2014/2015; Plastics Europe—Association of plastics manufacturers: Brussels, Belgium, 2015.* [https://www.plasticseurope.org/application/files/5515/1689/9220/2014plastics\\_the\\_facts\\_PubFeb2015.pdf](https://www.plasticseurope.org/application/files/5515/1689/9220/2014plastics_the_facts_PubFeb2015.pdf), (accessed in 10/09/2018).
- Reis, K.C., Pereira, J.; Smith, A.C., Carvalho, C.W.P., Wellner, N., Yakimets, I., 2008. Characterization of polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate (PHB-HV)/maize starch blend films. *Journal Food Engineering* 89 (4), 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.04.022>
- Rethwisch, D.G.Jr., William, D.C., 2016. *Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução*, LTC (Eds), Ed. 9, Rio de Janeiro.
- Ruka, D.R., Simon, G.P., Dean, K.M., 2013. In situ modifications to bacterial cellulose with the water insoluble polymer poly-3-hydroxybutyrate. *Carbohydrate Polymers*, 92 (2), 1717–1723. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.007>
- Scandola, M., Ceccorulli, G., Pizzoli, M., 1992. Miscibility of bacterial poly(3-hydroxybutyrate with cellulose esters. *Macromolecules* 25 (24), 6441–6446. <https://doi.org/10.1021/ma00050a009>
- Segal, L., Creely, J. J., Martin, A. E., & Conrad, C. M., 1959. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal* 29 (10) 786–794. <https://doi.org/10.1177/004051755902901003>
- Tumwesigye, K.S., Oliveira, J.C., Sousa-Gallagher, M.J., 2016. New sustainable approach to reduce cassava borne environmental waste and develop biodegradable materials for food packaging applications. *Food Packaging Shelf Life* 7, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2015.12.001>

- Ummartyotin, S., Juntaro, J., Sain, M., Manuspiya, H., 2012. Development of transparent bacterial cellulose nanocomposite film as substrate for flexible organic light emitting diode (OLED) display. *Industrial Crops and Products* 35, 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.025>
- Vijayendra S.V.N., Shamala, T.R., 2013. Film forming microbial biopolymers for commercial applications—A review. *Critical Reviews in Microbiology* 34 (4), 338-357. <http://dx.doi.org/10.3109/07388551.2013.798254>
- Vinhas, G.M., Almeida, Y.M.B., Lima, M.A.G. A., 2007. Estudo das propriedades e biodegradabilidade de blendas de poliéster/amido submetidas ao ataque microbiano. *Química Nova* 30 (7), 1584-1588. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000700016>
- Yang, K.K., Wang, X.L., Wang, W.Y., 2007. Progress in Nanocomposite of Biodegradable Polymer. *Journal of Industrial Engineering Chemistry* 13 (4), 485–500. <https://doi.org/10.1.1.565.9881&rep>
- Zhijiang, C., Guang, Y. Kim, J., 2011. Biocompatible nanocomposites prepared by impregnating bacterial cellulose nanofibrils into poly(3-hydroxybutyrate). *Current and Applied Physics* 1, 247–249.

**Table 1.** Thermal decomposition of samples of PHB, BC, BC/PHB blend and blend impregnated with oil essential oil (BC/PHB/CEO) (data obtained from TGA curves)

Samples	Stage 1 (°C)			Stage 2 (°C)			Stage 3 (°C)			Stage 4 (°C)		
	T <sub>onset</sub>	T <sub>offset</sub>	T <sub>max</sub>	T <sub>onset</sub>	T <sub>offset</sub>	T <sub>max</sub>	T <sub>onset</sub>	T <sub>offset</sub>	T <sub>max</sub>	T <sub>onset</sub>	T <sub>offset</sub>	T <sub>max</sub>
BC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	272	351	328
PHB	-	-	-	-	-	-	228	283	253	-	-	-
BC/PHB	84	106	91	-	-	-	243	286	262	332	378	358
BC/PHB/CEO	-	-	-	121	188	153	262	288	275	346	379	364

## FIGURE CAPTIONS

**Fig.1.** Colour of BC film and BC/PHB blend

**Fig. 2.** Scanning electron micrograph of dried BC film (a), dried PHB film (b) and BC/PHB blend (c) (magnification: 1500x)

**Fig. 3.** Growth of *E. coli* in samples of BC/PHB blend containing clove essential oil over time. Samples of blend without essential oil and culture medium used as controls

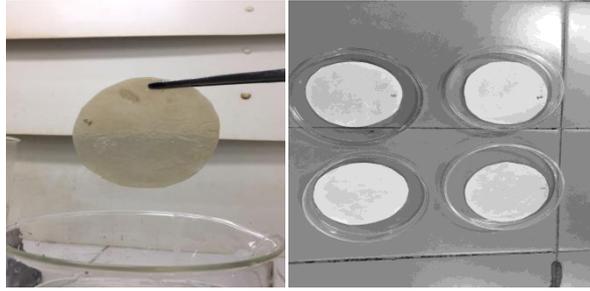
**Fig. 4.** Tension maximum (MPa) and deformation (%) of samples of PHB, BC, BC/PHB blend and blend impregnated with clove essential oil (BC/PHB/CEO)

**Fig. 5.** XRD of samples of PHB, BC, BC/PHB blend and blend impregnated with clove essential oil (BC/PHB/CEO)

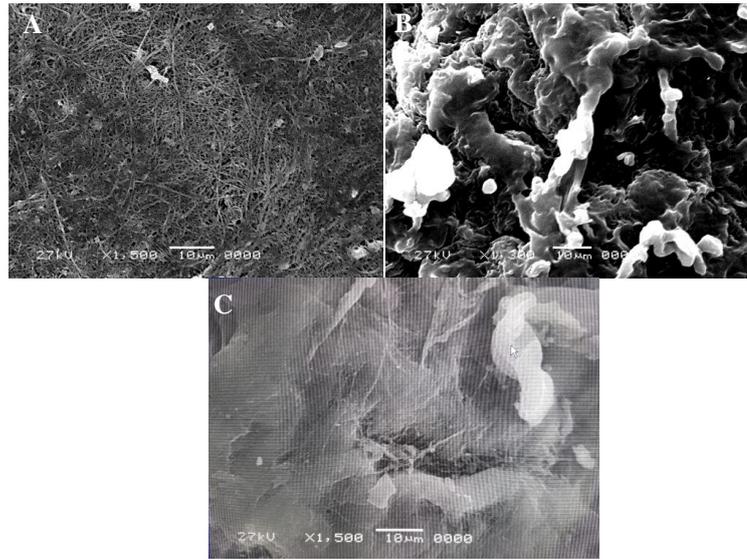
**Fig. 6.** TGA of samples of PHB, BC, BC/PHB blend and blend impregnated with clove essential oil (BC/PHB/CEO)

**Fig. 7.** Spectra of PHB, BC, BC/PHB blend and blend impregnated with clove essential oil (BC/PHB/CEO)

**Fig. 8.** Graphic representation of principal component analysis of PHB, BC, BC/PHB blend and BC/PHB blend impregnated with clove essential oil (BC/PHB/CEO)



**Fig.1.**



**Fig. 2.**

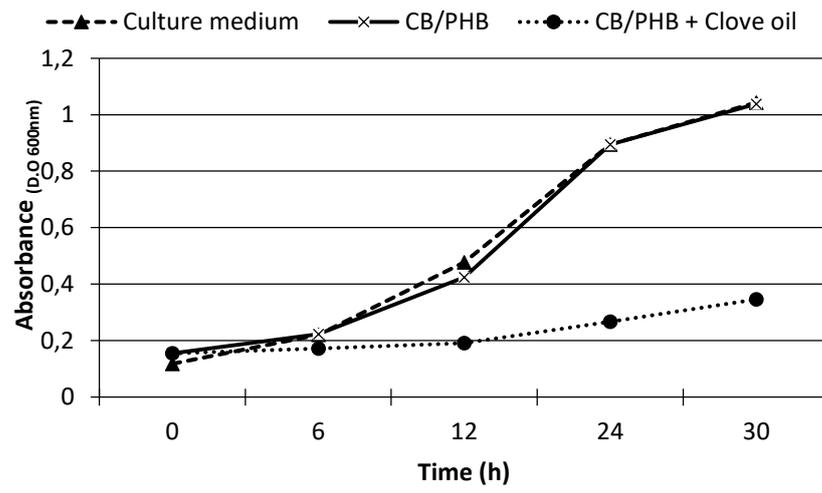
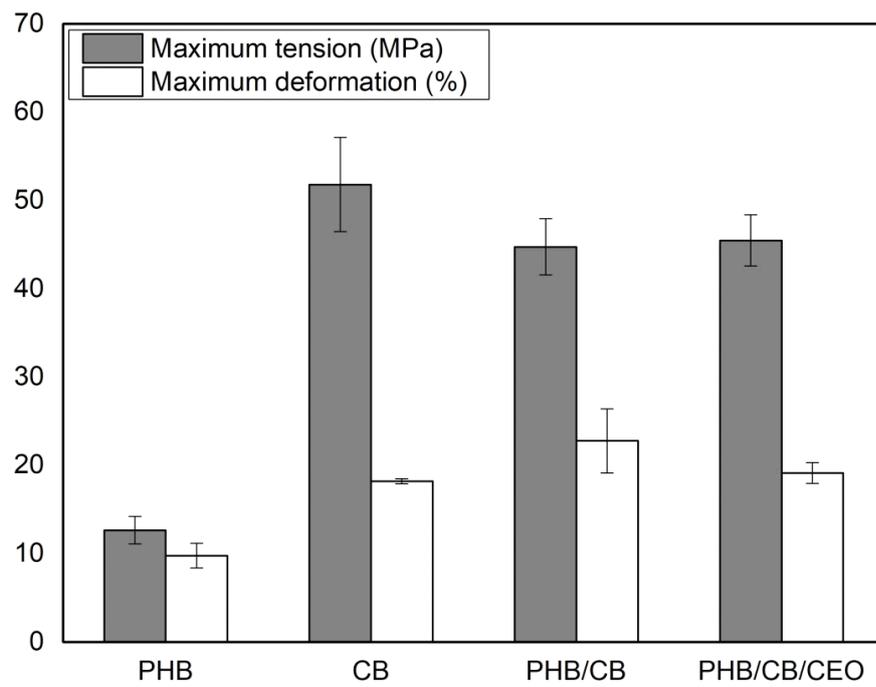


Fig. 3.



**Fig. 4.**

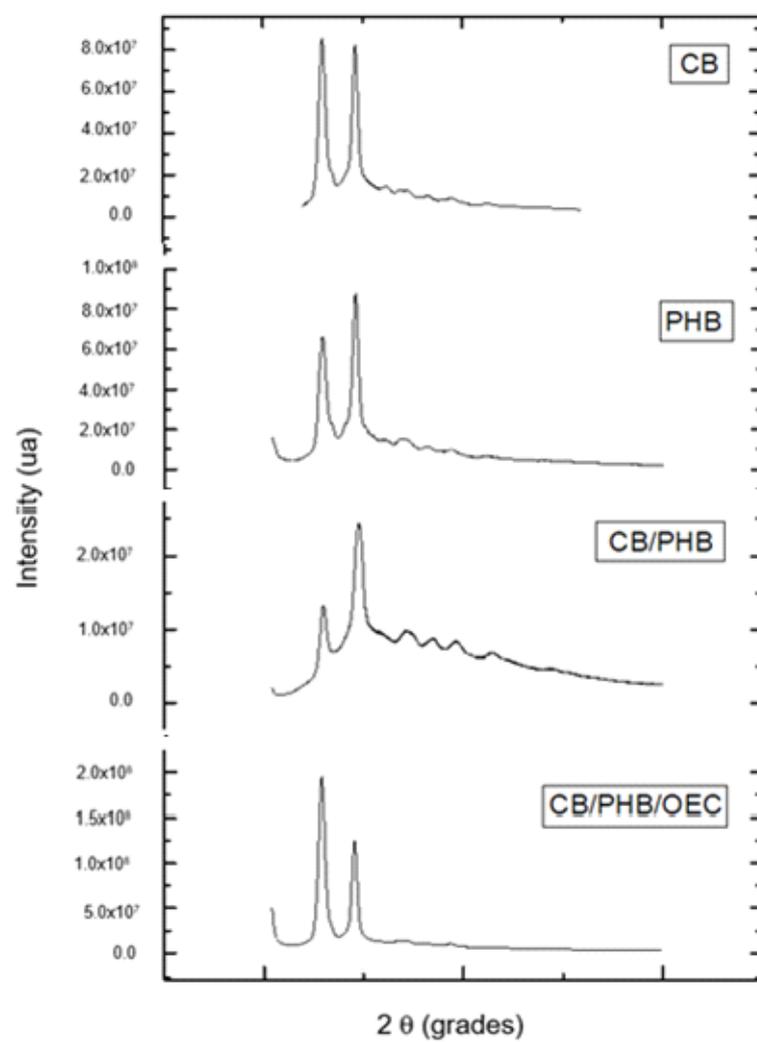
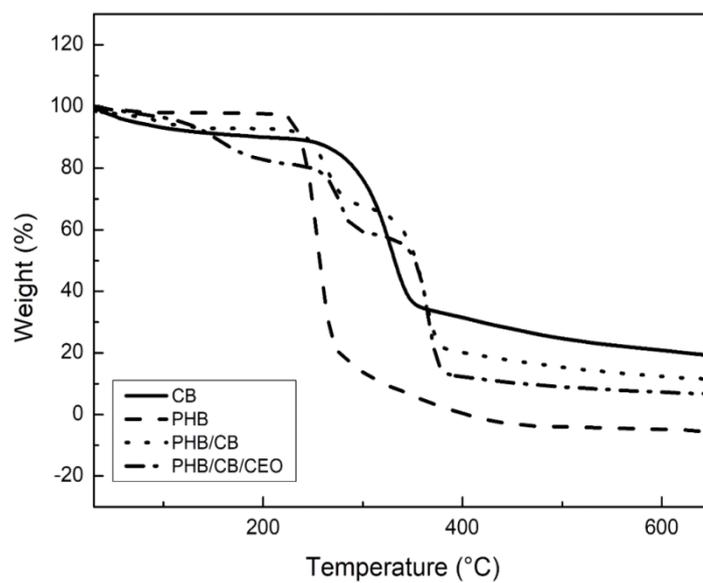


Fig. 5.



**Fig. 6.**

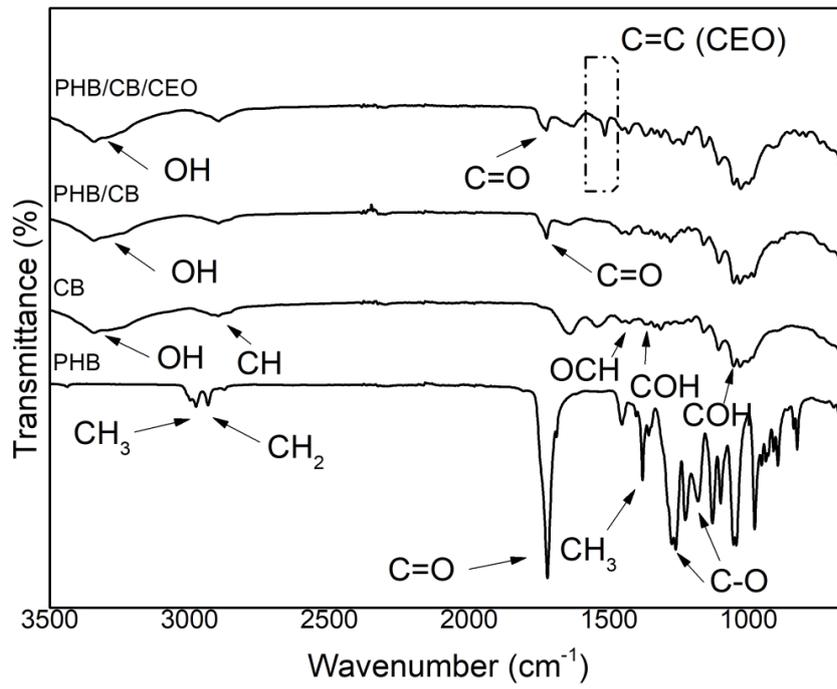


Fig. 7.

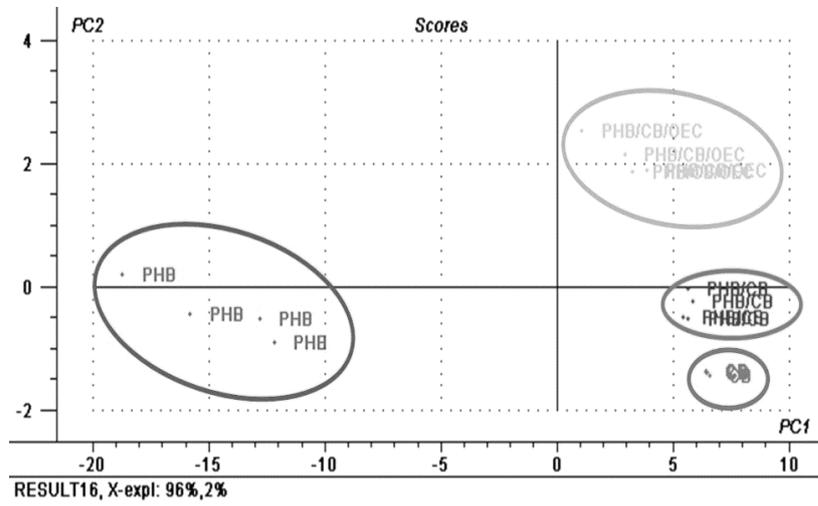


Fig. 8.