

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISABELA DE ANDRADE ARRUDA FERNANDES

DESENVOLVIMENTO DE BIOFILME DE CELULOSE BACTERIANA  
ENRIQUECIDO COM COMPOSTOS BIOATIVOS DE ORIGEM VEGETAL E  
COLÁGENO HIDROLISADO

CURITIBA

2019

ISABELA DE ANDRADE ARRUDA FERNANDES

DESENVOLVIMENTO DE BIOFILME DE CELULOSE BACTERIANA  
ENRIQUECIDO COM COMPOSTOS BIOATIVOS DE ORIGEM VEGETAL E  
COLÁGENO HIDROLISADO

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre em Engenharia  
de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação  
em Engenharia de Alimentos, Setor de  
Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro  
Haminiuk.

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR  
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

---

F363d Fernandes, Isabela de Andrade Arruda  
Desenvolvimento de biofilme de celulose bacteriana enriquecido com compostos bioativos de origem vegetal e colágeno hidrolisado [Recurso eletrônico] / Isabela de Andrade Arruda Fernandes – Curitiba, 2019.

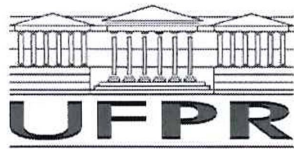
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos.  
Orientador: Charles Windson Isidoro Haminiuk

1. Celulose bacteriana. 2. Fenólicos. 3. Flavonoides. 4. Colágeno I.  
Universidade Federal do Paraná. II. Haminiuk, Charles Windson Isidoro. III.  
Título.

CDD: 661.802

---

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS - 40001016019P6

## TERMO DE APROVAÇÃO


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ISABELA DE ANDRADE ARRUDA FERNANDES** intitulada: **Desenvolvimento de biofilme de celulose bacteriana enriquecido com compostos bioativos de origem vegetal e colágeno hidrolisado**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVADA no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 18 de Fevereiro de 2019.



CHARLES WINDSON ISIDORO HAMINIUK  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE  
Avaliador Externo (UFPR)



TATIANE BRUGNARI  
Avaliador Externo (UTFPR)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pelo seu amor, sua presença, bênçãos e oportunidades dadas à mim.

À minha família, pelo amor e pelo apoio em minhas escolhas, mesmo que estas me levaram a ficar distante deles fisicamente.

Ao meu namorado Kenny, pelo amor, pelo orgulho e pelo apoio, os quais foram fundamentais para me manter firme diante das dificuldades que apareceram no decorrer do caminho.

Ao meu orientador Professor Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk por todos os conhecimentos transmitidos durante todo o trabalho, me ensinando principalmente a importância da interdisciplinaridade. Gostaria de agradecer também a Professora Dra. Giselle Maria Maciel pelos conhecimentos transmitidos e por me ensinar a ter um novo olhar para com a microbiologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao Professor Dr. José Domingos Fontana por ter cedido gentilmente o microrganismo *Gluconacetobacter xylinus*.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica, ao Laboratório de Difração e Espalhamento de raio X, ao Laboratório Central Analítica da Engenharia Química e ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos, UFPR, Campus Curitiba. Ao Laboratório de Biotecnologia e Microbiologia e o Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais (CMCM), da UTFPR, Campus Curitiba. Todos pelo uso de seus equipamentos

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia e Microbiologia da UTFPR pelas parcerias e a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

“Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês, planos de fazê-los prosperar e não de causar dano, planos de dar a vocês esperança e um futuro”.

Jeremias 29:11

## RESUMO

A celulose bacteriana (CB) é um polissacarídeo extracelular, produzido por células bacterianas, que se forma como película na interface ar/meio de cultura. Apresenta características como alta capacidade de absorção de água, alta cristalinidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. A CB é comumente empregada em curativos para feridas, tratamentos de queimadura e regeneração de tecidos, no entanto, a CB pura não possui propriedades bioativas. Desse modo, este estudo teve como objetivo caracterizar as propriedades bioativas, estruturais e mecânicas da celulose bacteriana (CB) produzida por *Gluconacetobacter xylinus* em meio de cultura enriquecido com compostos bioativos do chá verde (CV) e uma mistura ternária (MT) de chá branco, chá de *Hibiscus*, e bagaço de uva (delineamento simplex-centroide). No meio de cultura MT, foi adicionado colágeno hidrolisado. O perfil cromatográfico exibiu a presença de compostos bioativos nos meios de cultura enriquecidos. Além de demonstrar que após o processo de fermentação houve uma metabolização dos bioativos pela *G. xylinus* e uma bioabsorção desses bioativos pela CB. As membranas CB apresentaram altas concentrações de compostos fenólicos (879,7 e 1312,8 mg equivalentes de ácido gálico por litro), flavonoides (26,4 e 29,2 mg equivalentes de catequina por litro) e atividade antioxidante (973,3 e 575,9 mmol equivalentes de Trolox por grama) de CV e MT, respectivamente. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que as membranas CB possuíam uma rede nanodimensional de microfibrilas e, com a adição de colágeno hidrolisado na MT, essas estruturas tornaram-se mais espessas e com melhores propriedades mecânicas. Além disso, as membranas CB dos meios CV e MT exibiram inibição significativa contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Assim, este trabalho confirma que o enriquecimento do meio de cultura com compostos bioativos resulta na formação de CB em menor tempo e com características antioxidantes e antimicrobianas.

**Palavras-chave:** Celulose bacteriana, Fenólicos, Flavonoides, Colágeno hidrolisado, Atividade antioxidante, Atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

Bacterial cellulose (CB) is an extracellular polysaccharide, produced by bacterial cells, which forms as a film at the air interface/culture medium. It features characteristics such as high water absorption capacity, high crystallinity, biocompatibility and biodegradability. CB is commonly used in dressings for wounds, burn treatments and tissue regeneration, however, pure CB does not have bioactive properties. Thus, this study was intended to characterize the bioactive, structural and mechanical properties of bacterial cellulose (CB) produced by *Gluconacetobacter xylinus* in culture media enriched with bioactive compounds from green tea (CV) and a ternary mixture (MT) of white tea, Hibiscus and grape pomace (simplex centroid design). In the MT culture medium hydrolyzed collagen was added. The chromatographic profile exhibited the presence of bioactive compounds in the enriched culture media. Besides demonstrating that after the fermentation process there was a metabolization of the bioactive by *G. xylinus* and a biosorption of these bioactive by CB. The CB membranes had high concentrations of phenolic compounds (879.7 and 1312.8 mg gallic acid equivalent per liter), flavonoids (26.4 and 29.2 mg catechin equivalent per liter) and antioxidant activity (973.3 and 575.9 mmol Trolox equivalent per gram) from CV and MT, respectively. The scanning electron microscopy showed that the CB membranes had a nanodimensional network of microfibrils, and with the addition of hydrolyzed collagen in the MT, these structures became thicker and had better mechanical properties. In addition, the CB membranes from the CV and MT media exhibited significant inhibition against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Thus, this work confirms that the enrichment of the culture medium with bioactive compounds results in the formation of CB in a shorter time with antioxidant and antimicrobial characteristics.

**Key-words:** Bacterial cellulose, Phenolic, flavonoids, Hydrolyzed collagen,

Antioxidant activity, Antimicrobial activity.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA MOLECULAR DA CELULOSE BACTERIANA.....	20
FIGURA 2 - MICROFIBRILAS DA CELULOSE BACTERIANA.....	21
FIGURA 3 - ESFERA DE COR $L^*$ $a^*$ $b^*$ DEFINIDA PELA COMISSÃO INTERNACIONAL DE ILUMINAÇÃO.....	44
FIGURA 4 - GRÁFICO DE PARETO PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE...	46
FIGURA 5 - SUPERFÍCIE DE CONTORNO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE OBTIDA PARA O MODELO CÚBICO ESPECIAL DAS MISTURAS.....	47
FIGURA 6 - ASPECTO VISUAL DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA.....	48
FIGURA 7 - GRÁFICO DE PARETO PARA O DELINEAMENTO PLACKETT-BURMAN.....	50
FIGURA 8 - BIOFILME DE CELULOSE BACTERIANA OBTIDA NA COMPOSIÇÃO OTIMIZADA PARA O CHÁ VERDE.....	51
FIGURA 9 - BIOFILME DE CELULOSE BACTERIANA OBTIDA NA COMPOSIÇÃO OTIMIZADA PARA A MISTURA TERNÁRIA.....	51
FIGURA 10 - IMAGENS MEV DAS SUPERFÍCIES DA MEMBRANA CB-Pura..	66
FIGURA 11 - IMAGENS MEV DAS SUPERFÍCIES DA MEMBRANA CB-CV....	67
FIGURA 12 - IMAGENS MEV DAS SUPERFÍCIES DA MEMBRANA CB-MT....	67
FIGURA 13 - MEMBRANAS OBTIDAS PARA O MEIO DE CULTIVO COM CHÁ VERDE.....	70
FIGURA 14 - MEMBRANAS OBTIDAS PARA O MEIO DE CULTIVO COM A MISTURA TERNÁRIA.....	70
FIGURA 15 - DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA AS MEMBRANAS DENTRO DO ESPAÇO DE COR.....	71

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1A - CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DE CLAE-DAD DO MEIO NÃO FERMENTADO COM CHÁ VERDE.....	52
GRÁFICO 1B - CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DE CLAE-DAD DO MEIO FERMENTADO COM CHÁ VERDE.....	52
GRÁFICO 1C - CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DE CLAE-DAD DO MEIO NÃO FERMENTADO COM A MISTURA TERNÁRIA.....	53
GRÁFICO 1D - CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DE CLAE-DAD DO MEIO FERMENTADO COM A MISTURA TERNÁRIA.....	53
GRÁFICO 2A - CURVAS DSC DAS MEMBRANAS CB-CV.....	57
GRÁFICO 2B - CURVAS DSC DAS MEMBRANAS CB-MT.....	58
GRÁFICO 3A – ANÁLISE ESPECTRAL MIR-ATR DA MEMBRANA CB-Pura.	61
GRÁFICO 3B – ANÁLISE ESPECTRAL MIR-ATR DA MEMBRANA CB-CV...	62
GRÁFICO 3C – ANÁLISE ESPECTRAL MIR-ATR DA MEMBRANA CB-MT...	62
GRÁFICO 4A - DIFRATOGRAMA DE RAIOS-X DA MEMBRANA CB-Pura....	62
GRÁFICO 4B - DIFRATOGRAMA DE RAIOS-X DA MEMBRANA CB-CV.....	64
GRÁFICO 4C - DIFRATOGRAMA DE RAIOS-X DA MEMBRANA CB-MT.....	64

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DA CELULOSE BACTERIANA .....	21
TABELA 2 – COMPOSTOS BIOATIVOS EM ALIMENTOS .....	25
TABELA 3 – COMPOSTOS QUÍMICOS E BIOATIVOS IDENTIFICADOS EM PLANTAS DO GÊNERO <i>Hibiscus</i> .....	29
TABELA 4 - COMPOSTOS BIOATIVOS IDENTIFICADOS EM BAGAÇO DE UVA.....	31
TABELA 5 - DELINEAMENTO SIMPLEX-CENTROIDE EXPANDIDO DE 10 ENSAIOS PARA AS MISTURA DE CHÁ BRANCO, <i>HIBISCUS</i> E BAGAÇO DE UVA.....	35
TABELA 6 - CONDIÇÕES DE CULTIVO E SEUS NÍVEIS NO DELINEAMENTO PLACKETT-BURMAN PARA PRODUÇÃO DE CB.....	36
TABELA 7 – TEMPO DE RETENÇÃO DOS PADRÕES UTILIZADOS NA CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	38
TABELA 8 - DADOS EXPERIMENTAIS PARA O PROJETO SIMPLEX-CENTROIDE E A RESPOSTA OBTIDA PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA).....	45
TABELA 9 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO MODELO CUBICO ESPECIAL PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	47
TABELA 10 - PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN PARA 7 VARIÁVEIS COM VALORES CODIFICADOS E RESULTADOS OBSERVADOS PARA PRODUÇÃO DE CB E PESO SECO DA MEMBRANA*.....	48
TABELA 11 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE REGRESSÃO PARA O DELINEAMENTO PLACKETT-BURMAN.....	49
TABELA 12 – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORBÂNCIA) DOS COMPOSTOS BIOATIVOS NOS MEIOS DE CULTIVO ENRIQUECIDOS.....	55
TABELA 13 - FENÓLICOS TOTAIS (TP), FLAVONOIDES TOTAIS (FT) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA) DO MEIO DE CULTURA.....	57
TABELA 14 - FENÓLICOS TOTAIS (TP), FLAVONOIDES TOTAIS (FT) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA) DA CELULOSE BACTERIANA.....	61
TABELA 15 - PROPRIEDADES MÊCANICAS DAS MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA.....	69
TABELA 16 - RESULTADOS OBTIDOS PARA AS MEDIDAS DE COR DAS MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA.....	70

TABELA 17 - DADOS OBTIDOS PARA O TEOR DE UMIDADE POR MÉTODO INFRAVERMELHO E ATIVIDADE DE ÁGUA DAS MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA.....	72
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	- Atividade antioxidante
$a_w$	- Atividade de água
CAA	- Capacidade de absorção de água
CB	- Celulose bacteriana
CB-CV	- Celulose bacteriana do chá verde
CB-MT	- Celulose bacteriana da mistura ternária
CH	- Colágeno hidrolisado
DSC	- Calorimetria exploratória diferencial
EC	- Epicatequina
ECG	- Epicatequina galato
EGC	- Epigallocatequina
EGCG	- Epigallocatequina galato
EPS	- Substâncias poliméricas extracelulares
CLAE-DAD	- Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
MIR- ATR	- Espectroscopia no infravermelho médio com reflexão total atenuada
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
MF-CV	- Meio de cultivo fermentado de chá verde
MF-MT	- Meio de cultivo fermentado da mistura ternária
MU-CV	- Meio de cultivo não fermentado de chá verde
MU-MT	- Meio de cultivo não fermentado da mistura ternária
FT	- Flavonoides totais
CFT	- Compostos fenólicos totais

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
1.2.1. Objetivo Geral.....	18
1.2.2. Objetivos Específicos .....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. CELULOSE BACTERIANA.....	19
2.1.1. Características.....	19
2.1.2. Desenvolvimento da celulose bacteriana .....	22
2.1.3. Aplicações da celulose bacteriana.....	23
2.2. COMPOSTOS BIOATIVOS .....	25
2.2.1. <i>Camellia sinensis</i> .....	27
2.2.1.1. Chá Verde.....	27
2.2.1.2. Chá Branco .....	28
2.2.2. <i>Hibiscus</i> .....	29
2.2.3. Bagaço de uva.....	30
2.3. COLÁGENO HIDROLISADO .....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	34
3.1. MATÉRIA-PRIMA .....	34
3.1.1. Microrganismos e Materiais.....	34
3.2. SELEÇÃO DA PROPORÇÃO DA MISTURA TERNÁRIA DE CHÁ BRANCO, <i>HIBISCUS</i> E BAGAÇO DE UVA PELO DELINEAMENTO SIMPLEX- CENTROIDE .....	34
3.3. SELEÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA .....	35
3.4. PRODUÇÃO E TRATAMENTO DA CELULOSE BACTERIANA .....	36
3.5. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS NOS MEIOS DE CULTURA ENRIQUECIDOS.....	37
3.6. CARACTERIZAÇÃO DA PELÍCULA DE BIOCELULOSE.....	38
3.6.1. Determinação da estabilidade térmica da membrana.....	38

3.6.2.	Dessorção dos compostos bioativos das membranas .....	38
3.6.3.	Caracterização da estrutura química das membranas .....	40
3.6.4.	Determinação da Cristalinidade das membranas .....	41
3.6.5.	Identificação das microestruturas das membranas .....	41
3.6.6.	Propriedades mecânicas .....	41
3.6.6.1.	Teste de tração, alongamento e compressão.....	41
3.6.7.	Análise de Atividade Antimicrobiana.....	42
3.6.8.	Capacidade de absorção de água.....	43
3.6.9.	Análise de cor.....	43
3.6.10.	Análise do teor de umidade por infravermelho e atividade de água ....	44
3.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	45
4.1.	SELEÇÃO DA PROPORÇÃO DA MISTURA TERNÁRIA PELO DELINEAMENTO SIMPLEX-CENTROIDE .....	45
4.2.	SELEÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA .....	47
4.3.	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS NOS MEIOS DE CULTURA ENRIQUECIDOS.....	52
4.4.	DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS MEIOS DE CULTURA	55
4.5.	CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA .....	57
4.5.1.	Determinação da estabilidade térmica das membranas .....	57
4.5.2.	Determinação de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante .....	59
4.5.3.	Caracterização das estruturas químicas das membranas.....	61
4.5.4.	Determinação da cristalinidade das membranas.....	63
4.5.5.	Identificação das microestruturas das membranas .....	65
4.5.6.	Propriedades mecânicas .....	67
4.5.7.	Atividade antimicrobiana.....	69
4.5.8.	Capacidade de absorção de água pela membrana .....	70
4.5.9.	Análise de cor.....	70

4.5.10. Teor de umidade por método infravermelho e atividade de água ....	72
5. CONCLUSÃO .....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74



## 1. INTRODUÇÃO

A celulose bacteriana (CB) é um polissacarídeo excretado pelas células bacterianas, como as dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Agrobacter*, *Sarcina*, entre outros, que se forma como película na interface ar/meio de cultura (KLEM et al., 2005). Possui estrutura química análoga à da celulose vegetal, difere-se no grau de polimerização e na alta pureza, isto é, a CB é isenta de hemicelulose, lignina e pectina (JONAS; FARAH, 1998; PECORARO et al., 2008; PARK; JUNG; KHAN, 2009). Além disso, apresenta alta capacidade de absorção de água, propriedades mecânicas peculiares, alta cristalinidade, boa permeabilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, entre outras (MELLO et al., 1997; PECORARO et al., 2008; PARK; JUNG; KHAN, 2009; ALMEIDA et al., 2014). Devido a esses aspectos, é comumente empregada em curativos para feridas, tratamentos de queimadura, regeneração de tecidos e dispositivos médicos (ISLAM et al., 2017). Mesmo com os amplos aspectos positivos, tem-se que a celulose bacteriana possui limitações em algumas aplicações devido a sua isenção de compostos bioativos, apresentando consequentemente ausência de propriedades antioxidantes (SHAH et al., 2013).

Os compostos bioativos são metabolitos secundários de plantas e animais (REN et al., 2013), conhecidos por sua atividade biológica benéfica, principalmente, na prevenção de doenças neurais, doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, inflamação, entre outras doenças (YOUSUF et al., 2015). Os compostos bioativos existentes em extratos de chá branco, chá verde e chá de *Hibiscus* têm despertado interesse da comunidade científica, uma vez que são ricos em compostos fenólicos e por promoverem benefícios à saúde (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014; JIANG et al., 2015). Do mesmo modo, o bagaço de uva também tem gerado interesse não só por ser um resíduo de alto valor agregado que pode ser reaproveitado de maneira ecológica e acessível, mas por possuir compostos bioativos como os polifenóis (JARA-PALACIOS et al., 2015; TOURNOUR et al., 2015).

Em contrapartida, o colágeno hidrolisado é conhecido como peptídeo bioativo e sua produção ocorre pela hidrólise enzimática da gelatina extraída a partir de ossos e de couros de animais (SHIBUYA et al., 2014). O colágeno hidrolisado apresenta inúmeras propriedades, especialmente a de formação de

filme e de biodisponibilidade (DENIS et al., 2008; SHIBUYA et al., 2014). Além de promover a reparação das unhas, ação sobre as propriedades e crescimento do cabelo (MOSKOWITZ, 2000), potencial fotoprotetor, antienvhecimento, entre outros (ZAGUE et al., 2011).

Neste contexto, o enriquecimento do meio de cultivo com compostos bioativos presentes no chá branco, chá verde, chá de *Hibiscus* e bagaço de uva evidencia uma oportunidade inovadora de estudo das propriedades antioxidantes, antimicrobianas e mecânicas da celulose bacteriana com característica bioativa. Assim como, possibilita a ampliação do uso dessa CB em cosméticos, dispositivos médicos ou alimentos. Portanto, o objetivo desse estudo foi desenvolver e caracterizar dois tipos de membranas de celulose bacteriana com alto valor agregado, em meio de cultura enriquecido com compostos bioativos a partir do chá verde e da mistura ternária de chá branco, *Hibiscus* e bagaço de uva, com a incorporação de colágeno hidrolisado.

## 1.1. JUSTIFICATIVA

A celulose bacteriana pura não dispõe de compostos bioativos em sua composição. Logo, a deficiência dos compostos bioativos limita a CB em algumas aplicações que necessitam da presença desses compostos que proporcionam propriedades antioxidantes e antimicrobianas.

Dessa forma, visto que o chá verde, o chá branco, o *Hibiscus* e o bagaço de uva são ricos em compostos bioativos. Tem-se que a fermentação promovida pela *Gluconacetobacter xylinus*, possui um excelente potencial de conversão de matérias-primas baratas, subprodutos e resíduos agroindustriais com compostos bioativos de origem vegetal em produtos com alto valor agregado, assim como a atenuação do descarte do bagaço de uva no meio ambiente.

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1. Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar dois tipos de membranas de celulose bacteriana com alto valor agregado, em meio de cultura enriquecido com compostos bioativos a partir do chá verde e da mistura ternária de chá branco,

*Hibiscus* e bagaço de uva, com a incorporação de colágeno hidrolisado no meio com a mistura ternária.

### 1.2.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver o biofilme de celulose bacteriana em meio de cultura com chá verde, através do delineamento Plackett-Burman.
- Desenvolver o biofilme de celulose bacteriana em meio de cultura de chá branco, *Hibiscus* e bagaço de uva com adição de colágeno hidrolisado, através do delineamento simplex-centroide.
- Caracterizar os meios de cultura por meio das análises da Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD/UV-Vis) e determinação de fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante.
- Caracterizar o biofilme de celulose bacteriana nos diferentes meios de cultura por meio das análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Determinação dos fenólicos totais e flavonoides totais; Análise de Capacidade Antioxidante, Espectroscopia no infravermelho médio com reflexão total atenuada (MIR-ATR), Difração de Raio X, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Propriedades Mecânicas (Teste de tração, alongamento e compressão), Análise de Atividade Antimicrobiana, Capacidade de absorção de água, análise de cor, análise do teor de umidade e atividade de água.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. CELULOSE BACTERIANA

#### 2.1.1. Características

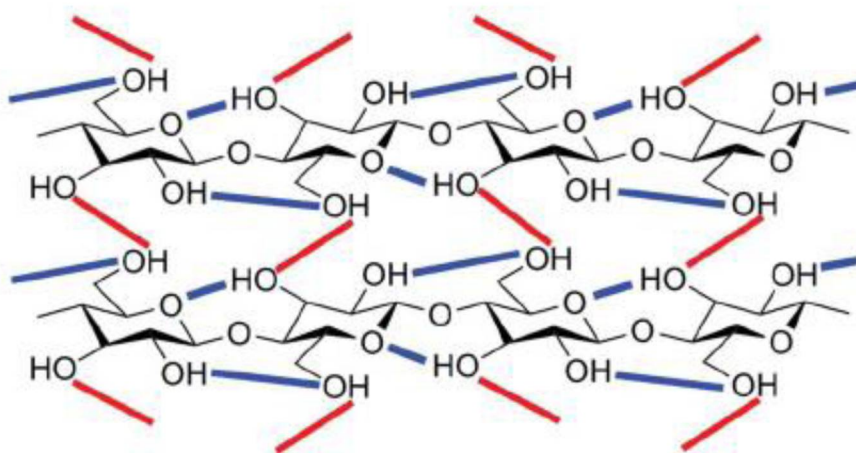
A celulose é o biopolímero que existe em grande quantidade na natureza e em sua maioria é produzida por plantas (RÖMLING; GALPERIN, 2015). Todavia, a formação de celulose por meio de bactérias foi descoberta por Brown em 1886, quando este estudava as ações químicas da bactéria *Acetobacter xylinum*, antes denominada *Bacterium aceti*, a qual produziu um fermento acético

singular, usualmente intitulado como "planta de vinagre" ou "mãe" (BROWN, 1886). E essa cultura estática de *A. xylinus* formou na interface ar/líquido a película de celulose (SCHRAMM; HESTRIN, 1954).

A celulose bacteriana, também denominada biocelulose, pode ser definida como um polissacarídeo extracelular formado pelas bactérias dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Sarcina*, *Azobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Alcaligenes* e entre outros, a partir da fermentação acética. Porém, a bactéria do gênero *Gluconacetobacter* é o produtor de CB, mais eficiente (KLEMM et al., 2005; CHAWLA et al., 2009).

A CB possui cadeias poliméricas (FIGURA 1) compostas unicamente de D-glicose, no qual os monômeros de açúcar, dispostos na configuração de anel piranosil, estão unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. Os grupos hidroxilas acessíveis sobre as cadeias de  $\beta$ -1,4-glucano colaboram na ligação de hidrogênio inter e intra-cadeia formando assim, estruturas de fibrilas estendidas (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

**FIGURA 1 - ESTRUTURA MOLECULAR DA CELULOSE BACTERIANA**

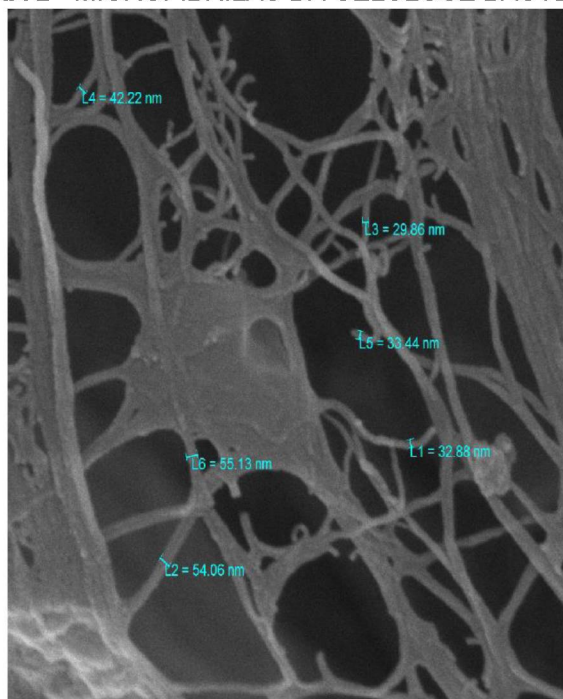


FONTE: Thiruvengadam e Vitta (2013).

A estrutura química de CB possui grau de polimerização em torno de 2.000 a 6.000 para CB (JONAS; FARAH, 1998). E nanofibrilas de 2 a 4 nm de largura que se agrupam para formar microfibrilas (FIGURA 2) com uma largura de 50-80 nm e uma espessura de 3-8 nm. Além de dispor de 10 a 250 cadeias poliméricas de comprimento de 1 a 9  $\mu$ m, correspondente a 2000-20000

unidades de glicose estruturadas em nanofitas de 40 a 60 nm de largura (TABUCHI, 2007; CACICEDO et al., 2016).

**FIGURA 2 - MICROFIBRILAS DA CELULOSE BACTERIANA**



FONTE: A autora (2019).

A celulose bacteriana dispõe de características físicas e químicas (TABELA 1) peculiares.

**TABELA 1- CARACTERÍSTICAS DA CELULOSE BACTERIANA**

<b>Características</b>	<b>Descrição</b>
Pureza	Celulose quimicamente pura (não possui hemicelulose, lignina e pectina).
Biodegradabilidade	Biodegradável, reciclável e renovável.
Força mecânica	Alta resistência à tração, força dimensional consistente, leve e durável.
Capacidade de absorção de água	Elevada capacidade de retenção de água (98,5%), porosidade seletiva, alta resistência mecânica em estado úmido, alta capacidade de transporte.
Orientação	Capacidades dinâmicas de formação de fibras (70-80 nm de largura) e podem ser produzidas membranas uniaxialmente reforçadas.
Formação direta da película	Películas transparentes e extremamente finas, submicrônicas durante a biossíntese (evitando a necessidade do intermediário de papel ou formação de têxteis a partir da polpa).
Moldabilidade e elasticidade	Possui moldabilidade elevada, onde pode ser produzida na forma de uma película gelatinosa em qualquer forma e tamanho durante a biossíntese, bem como alta elasticidade.
Modificação direta	As propriedades físicas, tais como o peso molecular e a cristalinidade (65-79%), podem ser controladas durante a biossíntese.
Síntese direta de produto de celulose	Podem ser sintetizados inúmeros derivados de celulose como o acetato de celulose, carboximetilcelulose, metilcelulose e outros. Pode-se controlar diretamente os cristais amorfos de celulose (celulose I ou celulose II).

FONTE: Adaptada de Pecoraro et al. (2008); Park, Jung, Khan (2009).

### 2.1.2. Desenvolvimento da celulose bacteriana

As bactérias ácido acéticas, importantes na fermentação de certos alimentos e bebidas, possuem a capacidade de reação química de oxidação de álcoois (inclusive de açúcar) e carboidratos em ácido acético e ácidos orgânicos (ácido cítrico glucônico, fumárico, oxiácidos e cetonas) tal como também os aminoácidos (DOURADO et al., 2016).

A família *Acetobacteraceae* compreende um vasto conjunto de aeróbios obrigatórios, gram-negativos e não fotossintéticos, comumente encontrados em frutas, vegetais e bebidas alcoólicas. O gênero mais importante é o *Gluconacetobacter*, que é capaz de converter glicose, glicerol e outros substratos orgânicos em celulose em alguns dias e demonstram ampla tolerância a condições ácidas e alcoólicas, em que para o crescimento de outros microrganismos é considerada indesejável (YAMADA; HOSHINO; ISHIKAWA, 1997; PECORARO et al., 2008). Em vista disso, a utilização de bactérias para a produção de celulose, possui o benefício de proporcionar o crescimento acelerado em condições controladas, bem como a segregação de mutantes para análise bioquímica e genética (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

A produção de celulose bacteriana pode ser conseguida em cultura na fase sólida ou submersa, associada ao método de cultivo estático ou agitado. No cultivo estático, a CB é formada como uma película viscosa na interface ar/líquido, em contrapartida, na cultura agitada a CB é concentrada em suspensão dispersa como grânulos ou fios fibrosos. (EL-SAIED; BASTA; GOBRAN, 2004).

A espécie *Gluconacetobacter xylinus*, antes denominada *Acetobacter xylinus*, é uma bactéria gram-negativa e aeróbica obrigatória comumente encontrada em frutas e vegetais sob processo de degradação. Ela desempenha a oxidação de vários açúcares e álcoois. A via de biossíntese de CB pela *G. xylinus* ocorre pela excreção do polissacarídeo com base na glicose extraída externamente ou a partir de fontes internas, a qual é fosforilada pela enzima glicoquinase em glicose-6-fosfato, a qual é convertida em glicose-1-fosfato pela enzima fosfoglicomutase. A fosforilase UDP obtida a partir da glicose-1-fosfato, catalisa a produção de UDP-glicose (nucleotídeo de açúcar que proporciona

substrato para conversão de celulose) na presença de trifosfato de uridina (UTP) (CHÁVEZ-PACHECO et al., 2004).

A *G. xylinus* é muito observada e empregada como bactéria padrão no estudo de celulose, principalmente por produzi-la em grandes quantidades tanto em meios líquidos quanto em meios sólidos. Para o seu desenvolvimento, considera-se os parâmetros de pH e de temperatura, os quais são ideais no intervalo 4 a 6 e de 25 a 30 °C, respectivamente (RUKA; SIMON; DEAN, 2014).

As condições do meio também devem ser ideais para a eficiência da produção de celulose por *G. xylinus*, como por exemplo, a incorporação de vitamina C (KESHK, 2014), aloe vera (SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010), diferentes fontes de carbono como chá verde e resíduos de frutas (VIEIRA et al., 2013), arabitol (OIKAWA; MORINO; AMEYAMA, 1995), manitol (OIKAWA; OHTORI; AMEYAMA, 1995; HUTCHENS et al., 2007), peptona, farelo de soja, caseína hidrolisada e ácido glutâmico (RAMANA; TOMAR; SINGH, 2000), glicose (MASAOKA; OHE; SAKOTA, 1993), glicose (KESHK; SAMESHIMA, 2005; MIKKELSEN et al.; 2009; POURRAMEZAN; ROAYAEI; QEZELBASH, 2009), sacarose (KESHK; SAMESHIMA, 2005; POURRAMEZAN; ROAYAEI; QEZELBASH, 2009), frutose (KESHK; SAMESHIMA, 2005; MIKKELSEN et al.; 2009), inositol (KESHK; SAMESHIMA, 2005), açúcar de cana (KESHK; SAMESHIMA, 2006), etanol (HUTCHENS et al., 2007; ISLAM et al., 2017), glicerol (RAMANA; TOMAR; SINGH, 2000; (MIKKELSEN et al.; 2009) e galactose (MIKKELSEN et al.; 2009), xilose e lactose (POURRAMEZAN; ROAYAEI; QEZELBASH, 2009), carboximetilcelulose, ácidos orgânicos, ágar, xantana e alginato de sódio (ISLAM et al., 2017). Uma vez que, para a viabilidade da biocelulose em suas aplicações ela depende da definição de um meio ideal e uma composição de condições adequadas ao crescimento que propicie uma produção elevada de celulose (RUKA; SIMON; DEAN, 2012).

### 2.1.3. Aplicações da celulose bacteriana

A CB é um material funcional para uma série de aplicações, como em alimentos, papéis, biomedicina e entre outros (PARK; JUNG; KHAN, 2009).

Na indústria de alimentos, a CB tem sido muito empregada como hidrocolóide com o objetivo de proporcionar a estabilização de espumas

espessamento e gelificação de soluções aquosas, emulsões e dispersões, assim como impedir a formação de cristais de gelo e açúcar e entre outros (DOURADO et al., 2016). Tanto quanto, a função de elemento de nanoreforço à embalagem de alimentos, com o intuito de ampliar a termorresistência, a transparência e diminuir a permeabilidade dos gases e da água dos filmes constituídos de amido e poliácido láctico (PLA) (RHIM; PARK; HA, 2013), além de possuir o benefício de ser biodegradável (SHI et al., 2014).

Na indústria de papel, a CB é empregada para aumentar a força e durabilidade da polpa quando incluída no papel, como suporte de retenção para fabricação do papel e como um elemento de grande valor para papel sintético, posto que a CB forma ligações de hidrogênio (PARK et al., 2009).

Na área biomédica estão as funções fundamentais de CB, em que são empregadas como materiais para feridas, pele artificial, enxertos vasculares, vasos sanguíneos artificiais, almofadas médicas e implantes dentários (SHAH et al., 2013). As propriedades físicas peculiares, o grande potencial de biocompatibilidade (MELLO et al., 1997) e não alergenicidade (SHI et al., 2014) da CB, a tornam significativa na cicatrização de feridas, barreira física à infecção bacteriana, redução da dor e produção extracelular, o que é considerado essencial para curativos biológicos ideais (OLYVEIRA et al., 2016). Elas apresentam também rápida epitelização e altas taxas de regeneração tecidual em diversos tratamentos de cicatrização de feridas, como as de pé diabético, crônicas e queimaduras (ULLAH et al., 2016)

Em sua maioria, a celulose bacteriana proporciona uma matriz de alto valor agregado para o aperfeiçoamento da alta tecnologia de identificação e tratamento de uma ampla diversidade de doenças. Do mesmo modo que beneficia as suas aplicações na indústria farmacêutica e cosmética, desempenhando funções como emulsão e estabilizadores de hidrogéis, imobilização de enzimas e biomoléculas, sistemas de transmissão de medicamentos, suporte de imunoglobulinas e tradução como dispositivos da nanoengenharia e como tratamentos artificiais inteligentes de regeneração de pele ou ferida (PICHETH et al., 2017).

Em cosméticos, as clássicas máscaras de biocelulose são desenvolvidas a partir da fermentação da celulose bacteriana em água de coco. São consideradas produtos de luxo, que proporcionam a pele luminosidade intensiva,



suporte ao colágeno natural da pele e matriz de elastina que reduz a flacidez da pele ao redor dos olhos. Assim como, promovem a hidratação da pele e aparência de que a mesma está tonificada e translúcida. Com o intuito de aperfeiçoar as propriedades hidratantes das máscaras de biocelulose os desenvolvedores procuram incorporar substâncias hidratantes como hialuronato de sódio, aloe vera e/ou glicerina. Da mesma maneira que adicionam antioxidantes como vitamina A, vitamina B e/ou vitamina C para diminuir o desenvolvimento de manchas marrons, aparecimento de linhas finas responsáveis pelo aspecto de envelhecimento ou somente para favorecer a formação das fibras de colágeno (DOURADO et al., 2016).

## 2.2. COMPOSTOS BIOATIVOS

Os compostos bioativos naturais são metabolitos secundários de plantas e animais produzidos por meio de diversas vias biológicas. Possuem como característica: pontos de ebulição acima de 200°C e massa molecular entre 200 e 1000 g/mol, bem como, inúmeras atividades fisiológicas consequentes de suas estruturas complexas, estas são constituídas de um esqueleto de anéis aromáticos ou anéis múltiplos com grupos funcionais, tais como: flavonoides, alcaloides, esteróis, terpenos, quinonas, fenilpropanoides e entre outros (REN et al., 2013).

Segundo Croteau, Kutchan e Lewis (2000) os compostos bioativos podem ser divididos em terpenos e terpenóides, alcaloides e compostos fenólicos e podem ser comumente encontrados (TABELA 2) em frutas, vegetais, cereais, oleaginosas, óleos, chás e vinhos (KRIS-ETHERTON et al., 2002).

**TABELA 2 – COMPOSTOS BIOATIVOS EM ALIMENTOS**

<b>Alimentos</b>	<b>Compostos Bioativos</b>
Frutas e Vegetais	
Maça	Quercetina, epicatequina, ácido clorogênico, ácido p-cumárico e floridzina.
Frutas cítricas	Naringenina, hesperetina, hesperidina, eriocitrina, neoeriocitrina, ácido p-cumárico, ácido cafeico e ácido ferúlico.
Uva	Ácido gálico, catequina, ácido cafeico, ácido siringico, epicatequina, rutina, resveratrol, quercetina e outros.
Tomate	Quercetina, licopeno, rutina e prunina.
Cebola	Quercetina e miricetina.
Cenoura	Lignina e carotenoides.
Alho	S-Alilcisteína e S-Alilmercaptocisteína.

**TABELA 2 – COMPOSTOS BIOATIVOS EM ALIMENTOS**

(Conclusão)

Oleaginosas	
Cacau	Catequina, epicatequina e ácido clorogênico.
Soja	Genisteína, daidzeína, glicerina, ácidos fenólicos, tocoferóis, aminoácidos e peptídeos.
Gergelim	Sesamina, sesamol, sesamol e tocoferol.
Amendoim	Taxifolina.
Mostarda	Sinigrina, ácidos fenólicos e ácido sinápinico.
Cereais	
Aveia	Ésteres de ácidos cafeico e ferúlico.
Bebidas	
Chás	Catequinas, flavonóis, teaflavina, tearubiginas entre outros compostos fenólicos.
Vinhos	Ácido tânico, resveratrol e outros fenólicos.

Fonte: Adaptada de Kris-Etherton et al. (2002).

Usualmente, esses compostos são conseguidos a partir de diferentes partes das plantas como folhas, caule, flor e frutas (AZMIR et al., 2013), por técnica de extração de solvente, como solventes ou co-solventes com distintas polaridades, tais como etanol e água e/ou solventes orgânicos (AZMIR et al., 2013; BITENCOURT et al., 2014; PAULA et al. 2014; LAGOS et al., 2015). Existem outras técnicas não convencionais para extração dos compostos bioativos, os quais são considerados mais ecológicos por diminuírem a utilização de produtos químicos sintéticos e orgânicos. Entre essas técnicas estão a de ultrassom, fluidos supercríticos, aquecimento por micro-ondas, extrusão, campo elétrico pulsado, aquecimento ôhmico, digestão enzimática e solventes acelerados (AZMIR et al., 2013; FERNÁNDEZ-AGULLÓ; FREIRE; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, 2015; LAGOS et al., 2015).

A extração dos compostos bioativos tem provocado interesse devido a atividade biológica como antimicrobianos, antivirais, hipocolesterolêmicos, cicatrizantes e antioxidantes (SHAH et al., 2013; LAGOS et al., 2015). Bem como, têm sido abrangentemente empregados como agentes preventivos no tratamento do câncer (MGBEAHURUIKE et al., 2017), doenças neurais, doenças cardiovasculares, diabetes, inflamação e muitas outras doenças (YOUSUF et al., 2015). Evidenciando sua grande importância na elaboração de novos medicamentos, cosméticos, pigmentos naturais, alimentos funcionais, aditivos

alimentares, embalagens de alimentos e entre outros (BITENCOURT et al., 2014; REN et al., 2013; ATEF; OJAGH, 2017).

Os extratos de chá têm causado maior interesse em relação aos compostos bioativos, principalmente por serem ricos em compostos polifenólicos, como epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG), epigalocatequina galato (EGCG) e teaflavina (FRIEDMAN et al., 2005; JIANG et al., 2015).

### 2.2.1. *Camellia sinensis*

A planta *Camellia sinensis*, proveniente da China, tem sido consumida como infusão de folhas secas e brotos há milhares de anos como uma bebida de sabor agradável e que promove benefícios para a saúde devido aos seus componentes bioativos e nutracêuticos (KOMES et al., 2010; HAZRA et al., 2018). A partir de diferentes processos de fabricação e graus de fermentação, a *Camellia sinensis* pode ser classificada em vários tipos de chá, tais como: verde, branco, amarelo, oolong, preto e chá escuro (LIU et al., 2018). No entanto, o chá verde e o chá branco, os quais não passam pelo processo de fermentação, têm despertado grande interesse em estudos recentes (MAO, 2013).

#### 2.2.1.1. Chá Verde

O chá verde possui processo de fabricação cujas folhas são colhidas, murchas, enroladas e cozidas/aquecidas para evitar a degradação enzimática dos polifenóis (SANTANA-RIOS et al., 2001). Entre esses polifenóis como flavanóis, flavandióis e ácidos fenólicos tem-se a presença de epigalocatequina galato (EGCG), cafeína (1,3,5-trimetilxantina), teobromina, teofilina, entre outros (KOMES et al., 2010). Além disso, possui em sua composição fitoquímica metilxantinas, aminoácidos livres, vitaminas e outros componentes menores que contribuem para as funções biológicas (LIU et al., 2018).

Nos últimos anos, muitas funções biológicas benéficas associadas ao chá verde foram descritas, incluindo atividades anticancerígenas (MUKHTAR; KATIYAR; AGARWAL, 1994; KURODA; HARA, 1999; CARVALHO et al., 2010),

antimutagênicos (SANTANA-RIOS et al., 2001; KURODA; HARA, 1999), anti-inflamatórias (RODRIGUES et al., 2016; FECHTNER et al., 2017), antibacterianas (MARCHESE et al., 2014), hipocolesterolêmico (KIM et al., 2012; MOUMITA et al., 2018), antiobesidade (ZHANG et al., 2018; BAE et al., 2019) e antioxidantes (LIU et al., 2018).

#### 2.2.1.2. Chá Branco

O chá branco é muito raro e de grande valor, visto que suas folhas são colhidas somente no amanhecer ao longo de alguns dias da primavera em que os botões ainda estão fechados, conseqüentemente ele é produzido em pequenas quantidades (DAMIANI et al., 2014).

A denominação chá branco, provém da grande quantidade de brotos prateados, constituídos de botões delicados e/ou folhas imaturas, colhidos para sua produção. Esse tipo de chá é visto como o mais ancestral, uma vez que é o menos processado dentre os existentes, isto é, não passa por fermentação, rolamento e/ou assamento. Suas plantações predominantes encontram-se no sul da China e é comumente comercializado em duas variedades principais como a Agulha de Prata (*Bai Hao Yin Zhen*) e Peônia Branca (*Bai Mu Dan*), contudo existem outras variedades que são nomeadas de acordo com a região de origem ou adição de ingredientes especiais, como frutas ou flores (MAO, 2013).

Os principais fenólicos que as folhas de chá dispõem são as catequinas, que ao sofrer esterificação com ácido gálico acarreta na formação de compostos mais complexos, como a epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG), epigalocatequina galato (EGCG) e teaflavina (FRIEDMAN et al., 2005; JIANG et al., 2015). EGCG foi observado como preeminente em chás brancos e verdes, contudo, EGC e ECG, em conjunto com ácido gálico, cafeína e teobromina, estão presentes em maiores concentrações no chá branco (SANTANA-RIOS et al., 2001), assim como flavonoides, alcaloides e teaninas (TAN et al., 2017).

Alguns estudos têm apresentado os benefícios que o chá branco proporciona à saúde humana, tais como, o seu potencial de atividade antimutagênica (SANTANA-RIOS et al., 2001), capacidade de promover rigidez e elasticidade a pele, bem como alívio à inflamação e artrite reumatoide

(THRING; HILI; NAUGHTON, 2009), atividade lipolítica em pré adipócitos subcutâneos humanos e de inibição de adipogênese (SÖHLE et al., 2009), antiobesidade (GONDOIN et al., 2010), neuroproteção (LÓPEZ; CALVO, 2011), alto potencial hipoglicemiante e hipolipemiante (TENORE et al., 2013), atividade antioxidante, antimicrobiana e anticancerígena (DAMIANI et al., 2014), potencial de eliminação dos radicais livres (AZMAN et al., 2014) e entre outros.

### 2.2.2. *Hibiscus*

A planta do gênero *Hibiscus* spp., é um dos gêneros mais importantes pertencentes a família *Malvaceae* (TSENG et al., 1997). São encontradas em regiões tropicais e subtropicais, como a Índia, Arábia Saudita, China, Malásia, Indonésia, Filipinas, Vietnã, Sudão, Egito, Nigéria e México (DA-COSTA-ROCHA, 2014).

Caracterizada pelo seu desenvolvimento em diferentes climas, o *Hibiscus* é importante por produzir diversos compostos bioativos notáveis (TABELA 3) (HOLSER; BOST; VAN BOVEN, 2004), como ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido málico, ácido tartárico (DAFALLAH; AL-MUSTAFA, 1996; DA-COSTA-ROCHA, 2014) flavonoides (DAFALLAH; AL-MUSTAFA, 1996) e antocianinas (DA-COSTA-ROCHA, 2014).

**TABELA 3 – COMPOSTOS QUÍMICOS E BIOATIVOS IDENTIFICADOS EM PLANTAS DO GÊNERO *Hibiscus*.**

<b>Compostos</b>
Hidrocarbonetos não saturados, álcoois e aldeídos (C8-C13) 2,2-dimetil-3-propiloxirano; 2-metil-5-metoxipental-2-ol; ácido octanóico; ácido nonanóico; 5-metiltetra-hidro-2-furanomentol; 2-octan-1-ol; 2,4-dimetil-heptan-1-ol; 1,4-nonadieno; 2-nona-1-ol; nonanal; linalol; decanol; 2,4-decadienal; 2,4-dimetil octanol; 2-etil-1-decanol; 2- (1-metilheptil) -ciclo-hexanona; 7-hexadeceno; 1-heptadeceno.
Fosfolipídios Lisofosfatidilcolina; esfingomielina; fosfatidilserina; fosfatidil inositol; fosfatidilcolina; fosfatidiletanolamina; ácido fosfatídico; fosfatidilglicerol; Cardiolipina; N-acil fosfatidiletanolamina.
Esteróis Colesterol; campesteróis; estigmasterol; $\beta$ -sitosterol; $\gamma$ -tocoferol; $\alpha$ -espinasterol; ergosterol.
Ácidos Graxos Ácido erúico; ácido clupanodínico; ácido lignocérico; ácido oleico; ácido linoleico; ácido palmítico; ácido esteárico; ácido tetradecanóico; ácido dihidrosterculico; ácido vernólico; ácido palmitoleico; ácido araquidônico; ácido nervônico; ácido $\alpha$ -linolênico; ácido heptadecanóico; ácido heneicosanóico; ácido eicosadienóico; ácido eicosatrienóico; ácido eicosapentaenóico.

**TABELA 3 – COMPOSTOS QUÍMICOS E BIOATIVOS IDENTIFICADOS EM PLANTAS DO GÊNERO *Hibiscus*.**

(Conclusão)

---

Aminoácidos

Leucina; metionina; triptofano; valina; isoleucina; fenilalanina; treonina; cistina; tirosina; lisina; ácido aspártico; ácido glutâmico; arginina; prolina; serina; histidina; alanina; glicina.

Ácidos fenólicos

Ácido gálico; ácido protocatecuico; ácido p-hidroxibenzóico; Ácido vanílico; ácido cafeico; ácido siringico; ácido p-cumárico; ácido ferúlico.

Minerais

Potássio; Sódio; Cálcio; Fósforo; Magnésio.

Outros

Carboidratos, proteínas, cinzas, lipídios, açúcares (glicose, galactose e frutose), pectina, esqualeno, flavonoides, lecitina, antocianinas, matéria nitrogenada e fibra.

---

FONTE: Adaptada de Dhar et al. (2015).

Os compostos bioativos encontrados na planta *Hibiscus* (haste, cálice e bainha de flores) apresentam inúmeras atividades biológicas e farmacológicas (DHAR et al., 2015). Nesse âmbito, o *Hibiscus* tem sido muito empregado em tratamentos de doenças como agentes antitumorais, hipotensivo, antiespasmódico, hipocolesterolêmico, diurético, atividade antimicrobiana, anticonvulsionante, hipoglicemiante, anticomplementar, antipirético, anti-urolítico e imunomodulatório, anti-hipertensivos, anti-inflamatórios, hepatoprotetores, antidiarreicos, antiespermatogênicos, anti-helmínticos, antioxidantes e antimutagênicos (SERRAME; LIM SYLIANCO, 1995; DAFALLAH; AL-MUSTAFA, 1996; KASTURE; CHOPDE; DESHMUKH, 2000; SACHDEWA; KHEMANI, 2003; MAGANHA et al., 2010; COMPAORÉ et al., 2013; DA-COSTA-ROCHA et al., 2014; PATEL, 2014) e entre outros.

Nesse contexto, o *Hibiscus* é muito empregado em chá, vinho, coquetel, molho, geleia, conservas, marmelada, doces, pickles, condimentos de *curry* (COMPAORÉ et al., 2013), aditivos funcionais em alimentos fermentados (AGBOBATINKPO et al., 2013). Assim como, na medicina e em cosméticos (DA-COSTA-ROCHA, 2014).

### 2.2.3. Bagaço de uva

As uvas e seus produtos derivados assumem um papel significativo como uma das grandes culturas de frutas do mundo (SILVA; QUEIROZ, 2016). As uvas apresentam alta concentração de diversos compostos fenólicos em suas folhas,

peles, polpas e sementes, os quais são responsáveis por boa parte de suas atividades biológicas (CASAZZA et al., 2010; FARHADI et al., 2016).

Ao longo do processo de maceração realizado na produção de vinho, os compostos fenólicos são transportados da uva para o vinho (SALAS et al., 2003). Contudo, uma grande parcela dos polifenóis são encontrados nas partes sólidas da uva, conseqüentemente, uma alta concentração de polifenóis é conservada no bagaço de uva o qual basicamente é constituído de casca e semente, e é um dos subprodutos mais abundantes em vinícolas. O bagaço de uva apresenta em sua composição compostos fenólicos (TABELA 4) como antocianinas, piranoantocianinas, flavonóis, derivados de ácido hidroxicinâmico, estilbenos e taninos condensados (BARCIA et al., 2014).

**TABELA 4 – COMPOSTOS BIOATIVOS IDENTIFICADOS EM BAGAÇO DE UVA**

<b>Partes do bagaço</b>	<b>Compostos</b>
Pele	Taninos Catequina Epicatequina Epicatequina galato
Pele	Epigalocatequina Antocianinas (delfinidina, cianidina, petunidina, malvidina-3-glicosídeo, peonidina, piruvato, entre outros) Quercetina Glucurônidos Ácido gálico e seus glicosídeos. Resveratrol Ácido caftárico Ácido cumárico
Sementes e caules	Taninos Procianidinas B1 e B2 Epigalocatequina Catequina Epicatequina galato Ácido gálico Quercetina-3-glucuronido Ácido caftárico Diidroquercetina 3- ramnosídeo

FONTE: Adaptada de Pinelo, Arnous, Meyer (2006).

Estudos apresentam inúmeras atividades biológicas dos compostos bioativos da uva, e assim sendo do seu bagaço, essenciais no tratamento de doenças, por sua ação neuroprotetiva, anti-inflamatória, antioxidante, proteção cardiovascular, antiplaquetária, anticancerígenas, antiobesidade, antitumoral, redução de glicose no sangue, principalmente pelo composto fenólico resveratrol

(BASTIANETTO; MÉNARD; QUIRION, 2015; KURŠVIETIENÉ et al., 2016; TSAI; HO; CHEN, 2017), antimicrobiana, antienvhecimento, antidiabética, anti-hipertensivos, proteção ocular (NATARAJAN et al., 2017).

Independentemente de o bagaço de uva apresentar adversidades biológicas e econômicas (BARCIA et al., 2014), deve-se considerar os grandes benefícios à saúde que compostos bioativos proporcionam quando recuperados, tal qual seus antioxidantes naturais. Assim, o reaproveitamento dos resíduos de indústrias agroindústrias, para obtenção de compostos bioativos, reflete um princípio interessante, ecológico e acessível, valorizando seu amplo uso em alimentos, medicina e farmacêutica, assim como em cosméticos, tanto como um potencializador quanto como conservante, posto que evitam a oxidação lipídica que normalmente ocorre em produtos cosméticos (JARA-PALACIOS et al., 2015; COSTA; SANTOS, 2017).

### 2.3. COLÁGENO HIDROLISADO

O colágeno, também denominado gelatina, é a proteína, próximo a um terço da proteína total, que constitui a derme, o ligamento, o tendão (MATSUMOTO et al., 2010) e pode ser extraída, com água quente, de ossos e couros de animais, ou escamas de peixe. O colágeno hidrolisado (CH) é geralmente intitulado de peptídeo de colágeno quando utilizado como bioativo (TANAKA; KOYAMA; NOMURA, 2009) e sua produção ocorre a partir da homogeneização, lavagem do material e desmineralização dos ossos com ácido mineral diluído, resultando em colágeno quase puro. Posteriormente ao tratamento alcalino ou ácido, as matérias-primas são removidas em diferentes etapas da fabricação com água morna (MOSKOWITZ, 2000). No entanto, o tratamento enzimático é privilegiado em comparação ao tratamento químico, em razão do seu benefício ao meio ambiente (SÁNCHEZ et al., 2008) e principalmente pela regiosseletividade da hidrólise e qualidade dos peptídeos obtidos com a preservação da bioatividade (MACHADO et al., 2004).

O colágeno é frequente na pele (corresponde 70% da derme), vesículas sanguíneas, vísceras, tecidos ósseos e similares. A proteína de colágeno é composta por três cadeias polipeptídicas de estrutura helicoidal ( $\alpha$ -cadeias), cada uma com uma estrutura repetida de glicina ligada a dois aminoácidos



diferentes (MATSUMOTO et al., 2010) e está comercialmente acessível com pesos moleculares de 500 até 20,000 Da (BILEK; BAYRAM, 2015). O colágeno hidrolisado possui grande quantidade de aminoácidos exercendo, portanto, influência na síntese da matriz da cartilagem, na capacidade de retenção de umidade, propriedades viscoelásticas e formadoras de gel, alta solubilidade em baixas temperaturas, transparência, sabor e odor aceitáveis (MOSKOWITZ, 2000; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011; PAUL et al., 2012).

O CH é geralmente utilizado em alimentos (como emulsionantes, agentes espumantes, hidrocolóides, agentes clarificadores, agente microencapsulantes e materiais de embalagem biodegradáveis), produtos fotográficos, cosméticos, farmacêuticos, indústria biomédica (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011; ZAGUE et al., 2011) e em formulações de detergentes para permitir ação protetora e de acabamento têxteis (PAUL et al., 2012).

O colágeno hidrolisado tem sido amplamente empregue como promotor da biossíntese de matriz extracelular nas articulações, unhas e cabelos (ZAGUE, 2008), no tratamento da osteoartrite e osteoporose (MOSKOWITZ, 2000), pele danificada pela radiação Ultravioleta B e redução de rugas da pele (TANAKA; KOYAMA; NOMURA, 2009), para aumento de conteúdo e densidade da massa óssea (GUILLERMINET et al., 2010), como anti-hipertensivo, inibindo o efeito da enzima de conversão da angiotensina I (ACE), antioxidante e antimicrobiano (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011), potencial fotoprotetor e de redução de mudanças relacionadas ao envelhecimento da matriz extracelular por meio do estímulo de processos anabolizantes no tecido da pele (ZAGUE et al., 2011).

Entretanto, a biossíntese do colágeno depende da hidroxilação de prolina e lisina de fibrilas de colágeno, na matriz extracelular da cartilagem e tecido conjuntivo, com a vitamina C, a qual é um ácido orgânico antioxidante, também denominado ácido ascórbico, que atua nesse caso como uma coenzima (CLARK et al., 2002). Proporcionando, o aumento da produção de colágeno na pele e estimulando a produção de malondialdeído por meio da peroxidação lipídica, promovendo assim a expressão do gene do colágeno (TRAIKOVICH, 1999; BURKE, 2007). Nesse contexto, a vitamina C age mutualmente nos processos completos de síntese, maturação, secreção e degradação do colágeno (RONCHETTI; QUAGLINO; BERGAMINI, 1996).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. MATÉRIA-PRIMA

##### 3.1.1. Microrganismos e Materiais

A cultura de produção de celulose *Gluconacetobacter xylinus* (ATCC 10245) cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen - A7E5B69), foi gentilmente obtida do Laboratório de Química e Biotecnologia de Biomassas da UTFPR Campus Curitiba. A sacarose, o chá verde, chá branco, *Hibiscus* e colágeno hidrolisado (100% puro e de origem de pele bovina) foram adquiridos comercialmente no Mercado Municipal de Curitiba, Paraná, Brasil. O bagaço de uva (composta por pele, semente e caule) da espécie *Vitis labrusca* e variedade Bordô foi obtida a partir do processo de fabricação de vinhos da região de Toledo – PR, Brasil e, posteriormente empregado ao processo de secagem em estufa de circulação de ar a 40°C. O resíduo seco foi então moído em moinho de facas e armazenado sob refrigeração à -20°C até o momento das análises.

#### 3.2. SELEÇÃO DA PROPORÇÃO DA MISTURA TERNÁRIA DE CHÁ BRANCO, *HIBISCUS* E BAGAÇO DE UVA PELO DELINEAMENTO SIMPLEX-CENTROIDE

As proporções das misturas de chá branco, *Hibiscus* e bagaço de uva foram determinadas pelo planejamento experimental simplex-centroide expandido de 10 ensaios (TABELA 5) (HAMINIUK et al., 2007), para obter a proporção que apresentasse maior atividade antioxidante com a adição de 15% de colágeno (g/g, %). Para a extração foram adicionados 0,03 g das misturas das matrizes, conforme as proporções definidas pelo delineamento, em 3 mL de água destilada à 100°C por 30 min. Passado este período, as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado na análise de atividade antioxidante.

**TABELA 5 – DELINEAMENTO SIMPLEX-CENTROIDE EXPANDIDO DE 10 ENSAIOS PARA AS MISTURAS DE CHÁ BRANCO, *Hibiscus* E BAGAÇO DE UVA**

Ensaio	Proporções		
	Chá branco	<i>Hibiscus</i>	Bagaço de uva
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	1/2	1/2	0
5	1/2	0	1/2
6	0	1/2	1/2
7	1/3	1/3	1/3
8	2/3	1/6	1/6
9	1/6	2/3	1/6
10	1/6	1/6	2/3

FONTE: A autora (2019).

A análise estatística foi conduzida utilizando o valor de cada replicata com o objetivo de se obter a análise de falta de ajuste (Lack-of-fit). A Metodologia de Superfície de Resposta permite a modelagem dos resultados usando equações de segunda-ordem. Modelos de regressão múltipla quadrático (Equação 1) e cúbico especial (Equação 2) foram utilizados para a atividade antioxidante.

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_1 \beta_2 X_1 X_2 + \beta_1 \beta_3 X_1 X_3 + \beta_2 \beta_3 X_2 X_3 \quad (1)$$

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_1 \beta_2 X_1 X_2 + \beta_1 \beta_3 X_1 X_3 + \beta_2 \beta_3 X_2 X_3 + \beta_1 \beta_2 \beta_3 X_1 X_2 X_3 \quad (2)$$

### 3.3. SELEÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA

O delineamento Plackett-Burman (PB) foi utilizado para definir fatores que influenciam significativamente na produção da celulose bacteriana. Um delineamento Plackett-Burman de 8 experimentos (PLACKETT; BURMAN, 1946) foi utilizado para selecionar 7 variáveis, incluindo nutrientes e parâmetros físicos em níveis superiores (+1) e inferiores (-1) (TABELA 6 e 10). A sacarose, etanol, chá verde, ácido acético e complexo vitamínico foram estabelecidas de acordo com o estudo de Fontana et al. (1991), Zeng, Small e Wan (2011), Keshk (2014), Yim, Song e Kim (2016), com modificações. Os parâmetros físicos de tamanho do inóculo (número de discos (plugs), com diâmetro e espessura de 2,2 e 1,0 mm, respectivamente) e tempo de incubação, também foram estudados como possíveis fatores que influenciam a produção de CB.

**TABELA 6 – CONDIÇÕES DE CULTIVO E SEUS NÍVEIS NO DELINEAMENTO PLACKETT-BURMAN PARA A PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA**

<b>Símbolos</b>	<b>Variáveis</b>	<b>Nível inferior (-1)</b>	<b>Nível superior (+1)</b>
X <sub>1</sub>	Sacarose (g carboidrato/L)	50	70
X <sub>2</sub>	Etanol 95% (v/v)	30	60
X <sub>3</sub>	Ácido acético (mL/L)	5	20
X <sub>4</sub>	Chá verde (g/L)	3	6
X <sub>5</sub>	Complexo vitamínico (mg/L)	500	1000
X <sub>6</sub>	Tamanho do inóculo (nº de plug)	1	2
X <sub>7</sub>	Tempo de incubação (dias)	5	10

FONTE: A autora (2019).

### 3.3.1. Cálculo de produtividade

Com os dados adquiridos no delineamento PB, foi calculado a produção de celulose bacteriana (g celulose/dia.L) pela Equação 3 desenvolvida nos diferentes meios de cultivo pelo *Gluconacetobacter xylinus*.

$$\text{Produção de Celulose Bacteriana} = \left( \frac{M_b}{T_c * V_c} \right) \quad (3)$$

Onde,

M<sub>b</sub>: Massa da membrana de biocelulose em gramas de celulose;

T<sub>c</sub>: Tempo de cultivo em dias;

V<sub>c</sub>: Volume do meio de cultura em litros (0,150 L).

### 3.4. PRODUÇÃO E TRATAMENTO DA CELULOSE BACTERIANA

O delineamento Plackett-Burman (PLACKETT; BURMAN, 1946) foi utilizado para definir a formulação de meio de cultura enriquecido com compostos bioativos do chá verde (CV) que influenciaram significativamente a produção de CB. Foram utilizados sete fatores, entre os quais nutrientes como sacarose, etanol a 95%, ácido acético, chá verde e um complexo vitamínico, além de parâmetros físicos como tamanho do inóculo (número de discos de celulose bacteriana) e tempo de incubação. As mesmas condições otimizadas no delineamento Plackett-Burman foram usadas para o meio de cultura enriquecido com compostos bioativos da mistura ternária (MT). No entanto, a quantidade de chá verde foi substituída pela quantidade de mistura ternária incorporada com colágeno hidrolisado. A proporção da mistura ternária foi obtida no delineamento experimental simplex-centroide. Logo, todos os nutrientes e o

tamanho de inóculo para ambos os meios enriquecidos foram adicionados em 150 mL de água destilada autoclavada e incubados estaticamente a 28°C durante 10 dias. Para a produção de CB (branco), foram utilizadas as mesmas quantidades de nutrientes definidas no meio otimizado pelo desenho de Plackett-Burman, no entanto, nenhum complexo vitamínico e compostos bioativos foram adicionados. Neste contexto, para formar uma película (CB), foi necessário um tempo de incubação de 20 dias a 28°C. Após incubação, as membranas CB (branco), CB em meios de cultura com chá verde (CB-CV) e meio com a mistura ternária (CB-MT) foram purificadas por um tratamento com solução NaOH 0,1 mol/L à temperatura ambiente durante 2 h (para evitar a perda de compostos bioativos da membrana) e lavados com água destilada (LOPES et al., 2014). Posteriormente, as membranas CB foram liofilizadas (Liotop, L101, SP, BR).

### 3.5. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS NOS MEIOS DE CULTURA ENRIQUECIDOS

A análise de Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD/UV-Vis) foi utilizada na identificação dos compostos bioativos nos meios de cultura enriquecidos com bioativos e baseada na metodologia de Haminiuk et al. (2012), com modificações. Os meios de cultura não fermentados de chá verde (MU-CV) e da mistura ternária (MU-MT), bem como os meios fermentados de chá verde (MF-CV) e da mistura ternária (MF-MT) foram filtrados em um filtro de 0,45 µm. Em seguida, 50 µL dos meios enriquecido com compostos bioativos (antes e após a fermentação) foram injetados em sistema cromatográfico (Agilent, 1260 Infinity LC, Califórnia, Estados Unidos), com um detector de arranjo de diodos.

A separação foi realizada utilizando uma coluna C18, 4,6 mm x 250 mm, 5 µm (Acclaim 120) a 40 ± 0,2°C. A fase móvel era composta de um solvente A (1,0% ácido fosfórico, v/v) e um Solvente B (metanol). O gradiente aplicado foi: 5–15% B por 2 min; 15–25% B por 5 min; 25–30% B por 10 min; 30–35% B por 15 min; 35–50% B por 25 min; 50–60% B por 30 min; 60–80% B por 35 min; 80–100% B por 45 min, seguido da lavagem e acondicionamento da coluna. A vazão utilizada foi de 1,0 mL/min, sendo a corrida monitorada em 280 nm. A quantificação dos compostos foi realizada usando a curva de calibração de 5

padrões (catequina, rutina, ácido gálico, miricetina e quercetina), cujos tempos de retenção estão apresentados na TABELA 7. Todos os padrões utilizados foram da empresa Sigma, São Paulo, SP, BRA.

**TABELA 7 – TEMPO DE RETENÇÃO DOS PADRÕES UTILIZADOS NA CURVA DE CALIBRAÇÃO**

<b>Padrões</b>	<b>Tempo de Retenção do perfil cromatográfico (min)</b>
Ácido Gálico	6,5 a 7,9
Catequina	10,2 a 10,8
Rutina	24,0 a 25,1
Miricetina	26,5 a 27,3
Quercetina	30,9 a 32,5

FONTE: A autora (2019).

### 3.6. CARACTERIZAÇÃO DA PELÍCULA DE BIOCELULOSE

#### 3.6.1. Determinação da estabilidade térmica da membrana

Para realização da determinação da estabilidade térmica da membrana foi empregada a análise calorimétrica diferencial pelo equipamento DSC 8500 da Perkin Elmer da Central Analítica da Engenharia Química, na Universidade Federal do Paraná e baseou-se na metodologia de Vieira et al. (2013), com modificações necessárias as especificações do equipamento. Pesou-se aproximadamente 12 a 15 mg de celulose bacteriana *in natura* em cadinho de alumínio hermeticamente fechado sob aquecimento de -100 a 145°C com taxa de aquecimento de 5°C/min utilizando atmosfera de nitrogênio cujo fluxo foi de 20 mL/min. O equipamento foi calibrado para temperatura e fluxo de calor usando um padrão de alta pureza de índio.

#### 3.6.2. Dessorção dos compostos bioativos das membranas

A dessorção dos compostos bioativos da CB foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Buran et al. (2014), com modificações. 1 g das membranas de celulose bacteriana enriquecidas com bioativos foram colocadas em frascos com 50 mL de etanol a 80%. Os frascos com as membranas foram mantidos em um agitador a 45 rpm por 4 h à temperatura ambiente. Os compostos dessorvidos foram utilizados para determinar fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante através de ensaios colorimétricos.

#### 3.6.2.1. Determinação dos fenólicos totais

A concentração de Fenólicos Totais (CFT) foi determinada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). Em tubos de ensaio de 10 mL foram adicionados 7,4 mL de água ultrapura, 150 µL de extrato puro e 500 µL do reativo Folin-Ciocalteu. Posteriormente a 3 minutos, foram adicionados 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (15%, m/v) a cada tubo seguido de agitação. Após 2h de reação, a absorbância foi determinada em um espectrofotômetro (BEL, UV-M51 UV/VIS, MI, Itália) a 765 nm. Os cálculos foram baseados em uma curva de calibração ( $y = 0,001x - 0,0022$ ;  $R^2 = 0,9915$ ) obtida com ácido gálico (Sigma, São Paulo, SP, Brasil) e os resultados de CFT foram expressos como mg equivalentes de ácido gálico por litro (mg EAG/L).

#### 3.6.2.2. Determinação dos flavonoides totais

A concentração de Flavonoides Totais (FT) foi determinada pelo método colorimétrico de cloreto de alumínio de Zhuang, Lu, e Yang (1992). Em tubos de ensaio de 5 mL foram adicionados 250 µL de amostra, 1,25 mL de água ultrapura e 75 µL de Nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) (5%, m/v). Após 6 minutos, adicionou-se 150 µL de Cloreto de alumínio hexahidratado (AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) (10%, m/v) e deixou reagir durante 5 min. Em seguida, foram adicionados e misturados 500 µL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L e 275 µL de água ultrapura. Após 5 min de reação, a absorbância foi medida a 510 nm (BEL, UV-M51 UV/VIS, MI, Itália). Os valores foram calculados a partir de uma curva de calibração ( $y = 0,0064x + 0,0068$ ;  $R^2 = 0,9923$ ) obtida com o padrão catequina (Sigma, São Paulo, SP, BRA) e os resultados foram expressos como mg equivalentes de catequina por litro (mg EC/L).

#### 3.6.2.3. Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante (AA) foi realizada de acordo com o método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e pelo método (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico (ABTS). O Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-

tetrametilcroman-2-carboxílico) foi usado como padrão de calibração e os resultados foram expressos em mmol equivalentes de Trolox por grama de extrato (mmol ET/g). Todos os reagentes usados foram da empresa Sigma, São Paulo, SP, Brasil.

A capacidade de sequestro do radical DPPH• foi determinada de acordo com Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Em tubos de 5 mL foram adicionados 500 µL da amostra, 2,36 mL de etanol e 2,14 mL da solução de DPPH em etanol a 1000 µmol/L. A mistura foi armazenada no escuro durante 30 min e a absorbância determinada a 517 nm (BEL, UV-M51 UV/VIS, MI, Itália). As absorbâncias foram correlacionadas com uma curva padrão de Trolox ( $y = -0,0029x + 0,8655$ ;  $R^2 = 0,9780$ ).

A determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS foi realizada conforme Re et al. (1999). Foram preparadas 7 mmol/L de solução de ABTS e 2,45 mmol/L de solução de persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ) e deixou-se reagir durante 16 h à temperatura ambiente ( $23 \pm 1$  °C) no escuro. Aproximadamente 1 mL da solução ABTS foi diluído com 50 mL de água para obter uma absorbância de 0,7 a 734 nm. Em tubos de ensaio de 5 mL foram adicionados 4 mL da solução diluída de ABTS (solução radical ABTS) e 40 µL das amostras, e armazenados no escuro durante 2 h. A absorbância foi determinada a 734 nm (BEL, UV-M51 UV/VIS, MI, Itália) e correlacionada com uma curva padrão de Trolox ( $y = -0,0002x + 0,7106$ ;  $R^2 = 0,9928$ ).

### 3.6.3. Caracterização da estrutura química das membranas

A Espectroscopia no infravermelho médio com reflexão total atenuada (MIR-ATR) foi realizada para caracterização da estrutura química das membranas liofilizadas utilizando o espectrômetro (Varian, 640-IR, Califórnia, Estados Unidos), no Departamento de Química e Biologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba. As varreduras foram feitas em comprimento de onda de 450 a 4000  $cm^{-1}$  (RUKA; SIMON; DEAN, 2012).



#### 3.6.4. Determinação da Cristalinidade das membranas

As amostras previamente liofilizadas, foram colocadas em um porta-amostra e analisadas em um difratômetro de raio X (Bruker D8 Advance, Massachusetts, Estados Unidos) com detector de alta velocidade de energia dispersiva modelo Lynxye XE-T, no Laboratório de Difração e espalhamento de Raio X do Departamento de Física da Universidade Federal do Paraná, operando com varredura de 2 °/min e ângulos entre 10 a 80° (2 $\theta$ ) (DU et al., 2018).

#### 3.6.5. Identificação das microestruturas das membranas

A identificação da microestruturas das membranas foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), no Centro de Microscopia Eletrônica (CEM) da Universidade Federal do Paraná. As membranas liofilizadas, foram revestidas com 90 nm de ouro em preparação para imagens de MEV (Tescan, Vega 3 LMU, Brno, República Checa), operando a 15kV e com ampliação de 500-30000 vezes, conforme obteve-se a qualidade de imagem.

#### 3.6.6. Propriedades mecânicas

##### 3.6.6.1. Teste de tração, alongamento e compressão

As membranas liofilizadas foram testadas para resistência à tração, alongamento e compressão conforme a norma ASTM-D 882 em texturômetro (Brookfield, CT-3, Massachusetts, Estados Unidos), no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná. As amostras foram previamente cortadas com 15 mm de largura e 80 mm de comprimento e, os valores médios determinados a partir de 10 amostras. Para o teste de compressão as espessuras de 1 mm foram medidas com um paquímetro digital Jomarca (Stainless Hardened, São Paulo, Brasil) em 10 pontos aleatórios para obter um valor médio.

### 3.6.7. Análise de Atividade Antimicrobiana

Com o intuito de viabilizar o uso da membrana para posteriores aplicações e aumentar a potencialidade da atividade antimicrobiana, cortou-se as membranas em dimensões de 20 mm x10 mm e submergiu-se então as membranas em solução de cefalexina 64 mg/L por 1 h.

Posteriormente, a atividade antimicrobiana das membranas CB em meio com chá verde (CB-CV), em meio com a mistura ternária (CB-MT) e em meio de solução salina 0,9% como controle (C) foi avaliada pelo método por contato contra *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), de acordo com metodologia descrita por Liao et al., (2010), com modificações apresentadas por Pagno et al. (2015). O microrganismo foi inoculado em caldo triptona de soja (TSB) e incubado a 37°C por 24 h, até atingir a fase de crescimento exponencial. Para a análise, a atividade antimicrobiana de cada bactéria a densidade do inóculo foi ajustada para 1x10<sup>6</sup> unidades formadoras de colônias (CFUs/mL) em solução salina (0,9 %).

Subsequentemente, as membranas de biocelulose foram dispostas em tubos Eppendorf e foram aplicadas 500 µL das suspensões bacterianas as membranas. Após a incubação, uma alíquota de 100 µL as suspensões bacterianas foram transferidas separadamente para tubos contendo solução salina esterilizada para obter diluições em série das suspensões, e as misturas resultantes foram agitadas. Em seguida, 10 µL das soluções bacterianas das misturas foram distribuídas uniformemente nas placas com ágar triptona de soja (TSA). As placas foram incubadas a 37°C numa placa de Petri por 24 h e em seguida, as células viáveis em cada uma das placas foram contadas quantificando as CFUs. A atividade antibacteriana foi calculada como porcentagem de inibição conforme a Equação (4), descrita por Pagno et al. (2015):

$$\% \text{Inibição} = \left( \frac{\text{UFC}_{\text{controle}} - \text{UFC}_{\text{amostra}}}{\text{UFC}_{\text{controle}}} \right) \times 100 \quad (4)$$

Onde:  $UFC_{controle}$  é o número de colônias que cresceram nos tubos controle;  $UFC_{amostra}$  é o número de colônias que se desenvolveram nas membranas com compostos bioativos.

### 3.6.8. Capacidade de absorção de água

A capacidade de absorção de água (CAA) foi desenvolvida pela imersão da membrana de biocelulose em água deionizada e armazenada até o equilíbrio, aproximadamente 48 h, em estufa à  $35 \pm 2$  °C. Em seguida, a membrana foi retirada da água, bem como o excesso de água removido da superfície. Posteriormente, a membrana foi pesada em balança analítica. O método será repetido até peso constante e a CAA será calculada de acordo com a Equação 5 (SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010):

$$CAA (\%) = \left( \frac{W_h - W_d}{W_d} \right) \times 100 \quad (5)$$

Onde,

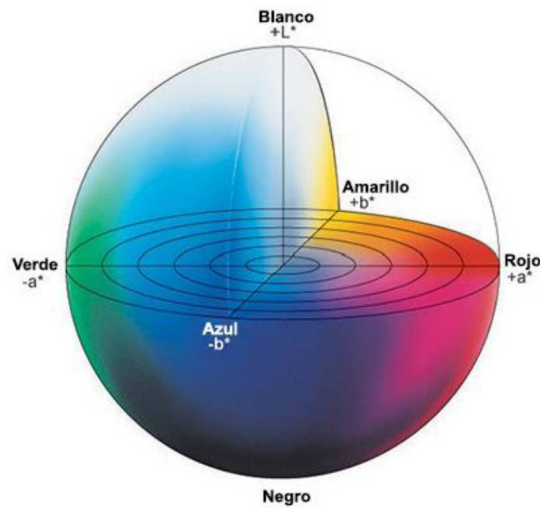
$W_h$ : peso da membrana de biocelulose hidratada;

$W_d$ : peso da membrana de biocelulose seca.

### 3.6.9. Análise de cor

As membranas *in natura* e liofilizada, em triplicata, foram avaliadas em espectrofotômetro de medida de cor portátil (HunterLab, MiniScan XE Plus, Virgínia, EUA) no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná. A caracterização da cor é especificada numericamente em um espaço tridimensional esférico (Figura 3). Dessa forma, os resultados foram expressos em valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  em que os valores de  $L^*$  (luminosidade ou brilho) varia do preto (0) ao branco (10), os valores da croma  $a^*$  variam do verde (-60) ao vermelho (+60) e os valores da croma  $b^*$  variam do azul (-60) ao amarelo (+60). (BIBLE; SINGHA, 1993; KONICA MINOLTA SENSING, s.a.).

**FIGURA 3 - ESFERA DE COR L\* a\* b\* DEFINIDA PELA COMISSÃO INTERNACIONAL DE ILUMINAÇÃO (CIE).**



FONTE: Konica Minolta Sensing, s.a.

#### 3.6.10. Análise do teor de umidade por infravermelho e atividade de água

As membranas *in natura* foram submetidas a 60°C por 40 min (ou até estabilização da massa) em um sistema de secagem infravermelho (Gehaka, IVT 200, São Paulo, BRA) para a medida do teor de umidade. Enquanto que análise da atividade de água ( $a_w$ ) das membranas *in natura* e liofilizadas foram feitas com auxílio do equipamento AquaLab (Decagon Devices, Série 3TE, Washington, EUA). Ambas as análises foram feitas em triplicata no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná.

### 3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as medidas foram realizadas em pelo menos três repetições, com exceção do CLAE-DAD/UV-Vis que foram empregadas em duplicata e propriedades mecânicas que foram empregadas em decuplicata. Os dados obtidos foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística dos dados foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey afim de determinar as diferenças significativas das amostras no intervalo de confiança de 95% ( $p \leq 0,05$ ), representada pelas diferentes letras minúsculas dentro de uma coluna. Para todas as análises estatísticas foi utilizado o software Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, Estados Unidos).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. SELEÇÃO DA PROPORÇÃO DA MISTURA TERNÁRIA PELO DELINEAMENTO SIMPLEX-CENTROIDE

A atividade antioxidante total apresenta interações entre os compostos fenólicos que podem ser sinérgicos, aditivos ou antagônicos, e essas interações dependem da proporção das matrizes ou da proporção de compostos fenólicos na mistura (ENKO; GLISZCZYŃSKA-ŚWIGLO, 2015; SKROZA et al., 2015). A Tabela 8, portanto, apresenta o delineamento experimental com os 10 ensaios utilizados neste estudo bem como a resposta obtida para atividade antioxidante.

**TABELA 8-** DADOS EXPERIMENTAIS PARA O SIMPLEX-CENTROIDE E A RESPOSTA OBTIDA PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Ensaio*	Proporção da Mistura (%)			AA DPPH (mmol TE/g)
	Chá branco	<i>Hibiscus</i>	Bagaço de uva	
1	100,00	0,00	0,00	169,61 <sup>f</sup> ± 0,00
2	0,00	100,00	0,00	106,10 <sup>d</sup> ± 0,00
3	0,00	0,00	100,00	56,47 <sup>c</sup> ± 0,01
4	50,00	50,00	0,00	178,26 <sup>a</sup> ± 0,00
5	50,00	0,00	50,00	175,40 <sup>a</sup> ± 0,00
6	0,00	50,00	50,00	91,76 <sup>b</sup> ± 0,03
7	33,33	33,33	33,33	177,44 <sup>a</sup> ± 0,01
8	66,66	16,67	16,67	178,70 <sup>a</sup> ± 0,00
9	16,67	66,66	16,67	118,77 <sup>e</sup> ± 0,03
10	16,67	16,67	66,66	92,79 <sup>b</sup> ± 0,00

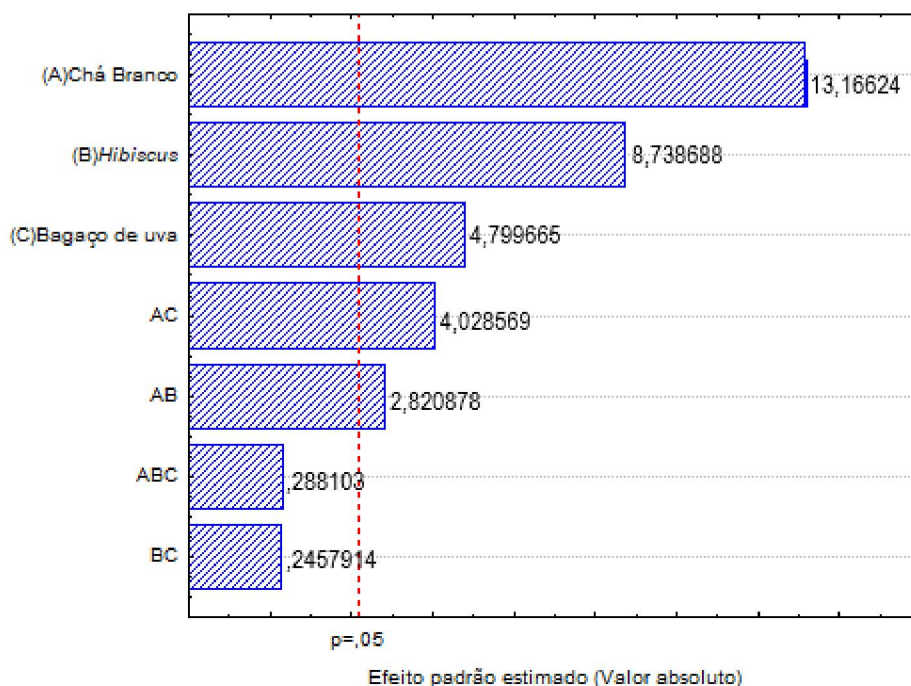
\* Cada ensaio foi adicionado 15% de colágeno hidrolisado.

FONTE: A autora (2019).

As atividades antioxidantes apresentadas na Tabela 8 não exibiram diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) em relação à proporção do chá branco, *Hibiscus* e bagaço de uva nas misturas. No entanto, entre os ensaios para a mistura ternária, a que apresentou maior atividade antioxidante foi a proporção (66,66% chá branco, 16,67% *Hibiscus* e 16,67% bagaço de uva), cuja AA obtida foi de  $178,70 \pm 0,00$  mmol TE/g. Portanto, esta proporção foi determinada como meio de cultura otimizado para a produção de celulose bacteriana.

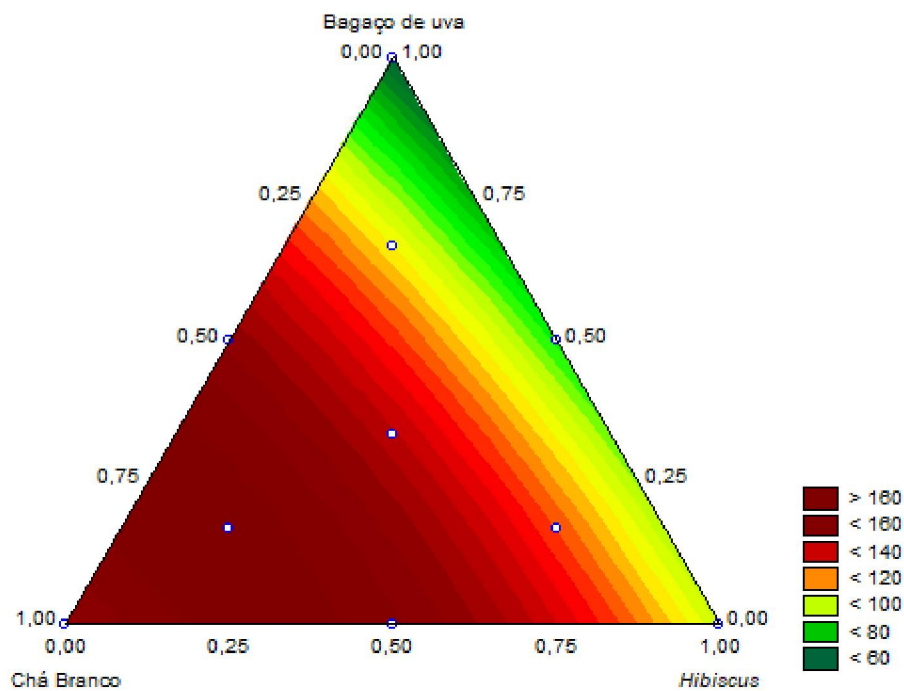
A partir da Tabela 8, pode-se observar que o chá branco apresentou uma maior atividade antioxidante ( $169,61 \pm 0,00$  mmol TE/g) em relação as matrizes individuais, denotando uma diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ), e conseqüentemente essa amostra tende a ser mais significativa no diagrama de Pareto (Figura 4) e na superfície resposta apresentada na Figura 5. A Figura 4 mostra uma significância ( $p \leq 0,05$ ) nos coeficientes lineares (chá branco (A), *Hibiscus* (B) e bagaço de uva (C)) e nos coeficientes que descrevem a interação binária (chá branco e bagaço de uva (AC); chá branco e *Hibiscus* (AB)). Enquanto que a os coeficientes que representam a interação binária (*Hibiscus* e bagaço de uva (BC)) e a ternária (ABC) não foram significativos. Estes resultados estão de acordo com a Figura 5, cujo modelo cúbico especial foi o que apresentou um melhor ajuste aos dados experimentais, com um alto valor de  $R^2$  de 0,9341 e baixo valor de erro puro. Além disso, na Tabela 9 pode-se verificar que entre os resultados de atividade antioxidante há alguns dados significativamente diferente ( $p \leq 0,05$ ). Além disso, a partir dos dados da Figura 4 e 5 pode-se observar que a atividade antioxidante pode ser influenciada de acordo com a quantidade de chá branco nas proporções da mistura.

**FIGURA 4 - GRÁFICO DE PARETO PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**



FONTE: A autora (2019).

**FIGURA 5. SUPERFÍCIE DE CONTORNO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE OBTIDA PARA O MODELO CÚBICO ESPECIAL DAS MISTURAS ( $R^2 = 0,9341$ )**



FONTE: A autora (2019).

**TABELA 9 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO MODELO CUBICO ESPECIAL PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Parâmetros	Atividade Antioxidante				
	S.Q	G.L	M.Q	F	p
Fonte de Variação					
Regressão	21700,54	6	3616,76	30,72	0,000*
Resíduos	1530,67	13	117,74		
Total	23231,21	19			

\*Modelo cúbico especial.  $p \leq 0,05$

S.Q: Soma dos Quadrados; G.L: Graus de Liberdades; M.Q: Média dos Quadrados.

FONTE: A autora (2019).

#### 4.2. SELEÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA

No planejamento Plackett-Burman de 8 execuções cada linha representa um experimento e cada coluna representa uma variável independente. Os sinais +1 e -1 representam os níveis superior e inferior das variáveis independentes sob estudo. Os resultados do delineamento Plackett-Burman de 8 experimentos sobre os efeitos das 7 variáveis de cultivo na produção de CB e peso seco da

membrana estão resumidos na Tabela 10 e seus aspectos visuais estão apresentados na Figura 6.

**TABELA 10. PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN PARA 7 VARIÁVEIS COM VALORES CODIFICADOS E RESULTADOS PARA PRODUÇÃO DE CB E PESO SECO DA MEMBRANA\*.**

Experimentos	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	Produção CB (g/dia.L)	Peso CB seca (g/L)
1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	13,63 <sup>b</sup> ± 3,18	1,08 <sup>ab</sup> ± 0,25
2	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	93,99 <sup>c</sup> ± 0,77	12,88 <sup>c</sup> ± 0,11
3	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	4,03 <sup>ab</sup> ± 0,47	0,64 <sup>a</sup> ± 0,08
4	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	2,49 <sup>a</sup> ± 1,26	0,20 <sup>a</sup> ± 0,10
5	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	13,69 <sup>b</sup> ± 2,65	2,16 <sup>b</sup> ± 0,42
6	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	1,98 <sup>a</sup> ± 0,25	0,16 <sup>a</sup> ± 0,02
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	6,41 <sup>ab</sup> ± 2,61	1,01 <sup>ab</sup> ± 0,41

\*Ambos são concentrações no meio de cultivo para 1 litro.

Nota: X<sub>1</sub>: Sacarose, X<sub>2</sub>: Etanol 95%, X<sub>3</sub>: Ácido acético, X<sub>4</sub>: Chá verde, X<sub>5</sub>: Complexo vitamínico, X<sub>6</sub>: Tamanho do inóculo e X<sub>7</sub>: Tempo de incubação.

FONTE: A autora (2019).

**FIGURA 6 - ASPECTO VISUAL DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA**



O delineamento experimental Plackett-Burman foi utilizado neste estudo para obter a melhor combinação entre nutrientes e parâmetros físicos que promovessem alta produção de CB. Na Tabela 10 é possível observar que para 1 L de meio de cultivo o experimento 2 apresentou a maior produção de celulose



bacteriana ( $93,99 \pm 0,77$  g/dia.L) e peso seco da membrana ( $12,88 \pm 0,11$  g/L). As variáveis que exerceram efeito significativo na produção da celulose bacteriana foram observadas a partir da análise de regressão (ANOVA) das respostas experimentais e apresentadas na Tabela 11.

**TABELA 11 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE REGRESSÃO PARA O DELINEAMENTO PLACKETT-BURMAN**

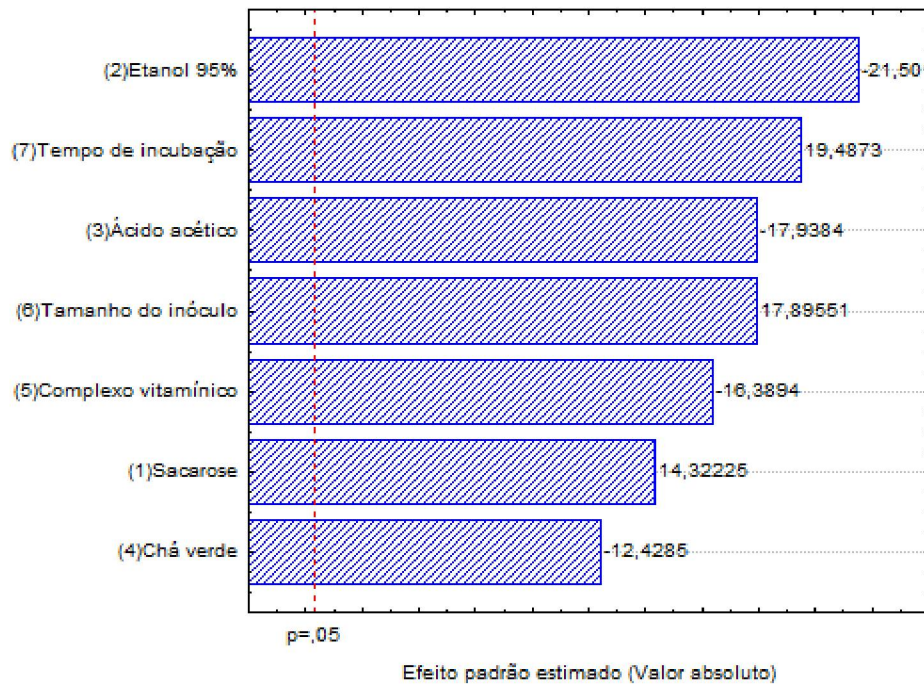
Variáveis	Produção de CB (g/dia.L)			Peso seco da membrana (g/L)		
	Efeito	T	p	Efeito	T	p
X <sub>1</sub>	18,3775	14,3223	0,0000	2,59375	-17,3807	0,0000
X <sub>2</sub>	-27,5900	-21,5019	0,0000	-3,60875	-13,9849	0,0000
X <sub>3</sub>	-23,0175	-17,9384	0,0000	-2,86625	-18,7299	0,0000
X <sub>4</sub>	-15,9475	-12,4285	0,0000	-2,30625	17,9113	0,0000
X <sub>5</sub>	-21,0300	-16,3894	0,0000	-3,08875	23,1111	0,0000
X <sub>6</sub>	22,9625	17,8955	0,0000	2,95375	-17,3807	0,0000
X <sub>7</sub>	25,0050	19,4873	0,0000	3,81125	-13,9849	0,0000

Nota: X<sub>1</sub>: Sacarose, X<sub>2</sub>: Etanol 95%, X<sub>3</sub>: Ácido acético, X<sub>4</sub>: Chá verde, X<sub>5</sub>: Complexo vitamínico, X<sub>6</sub>: Tamanho do inóculo e X<sub>7</sub>: Tempo de incubação.

FONTE: A autora (2019).

Pode-se observar que a concentração de sacarose, o etanol 95%, o tamanho do inóculo e o tempo de incubação exerceram de maneira positiva um efeito significativo positivo sobre a produção de CB em um nível de confiança  $p < 0,05$ . Enquanto que o ácido acético, chá verde e complexo vitamínico exerceram efeito significativo negativo sobre a produção de CB em um nível de confiança  $p < 0,05$ . Os dados apresentados na Tabela 11 estão de acordo com os resultados obtidos no gráfico de Pareto (Figura 7). Esses resultados indicam, que a melhor composição e condição para a produção de CB exigem concentrações de sacarose, etanol 95%, tamanho do inóculo e tempo de incubação em níveis superiores. Enquanto que a quantidade de ácido acético, chá verde e complexo vitamínico devem estar em níveis inferiores.

**FIGURA 7 - GRÁFICO DE PARETO PARA O DELINEAMENTO PLACKETT-BURMAN**



Portanto, a partir dos níveis ideais para produção a composição otimizada foi 70 g/L de sacarose, 30 mL de etanol 95 % (v/v), 5,3 g/L de ácido acético, 3 g/L de chá verde, 500 mg/L de complexo vitamínico, 2 plugs (2,20 mm de diâmetro e 1,00 mm de espessura) do inóculo, incubados por 10 dias. O rendimento máximo (produtividade) de CB para 150 mL do meio estatisticamente otimizado para CV (Figura 8) foi de  $26,18 \pm 4,90$  g/L, enquanto que o MT (Figura 9) foi de  $25,55 \pm 5,90$  g/L. Valores estes superiores ao valor apresentado para a produção de CB (branco) ( $0,03 \pm 0,10$  g/L). É importante ressaltar que a membrana CB (branco) levou 20 dias para ser formada, enquanto as membranas CB enriquecidas se desenvolveram em 10 dias. Portanto, os resultados obtidos para a produção de membranas CB demonstram a importância da inserção dos compostos bioativos das matrizes utilizadas neste trabalho para obtenção de celulose bacteriana em menor tempo e com propriedades antioxidantes. Vieira et al. (2013), apresentou um rendimento máximo de 3,6 g/L em seu estudo para

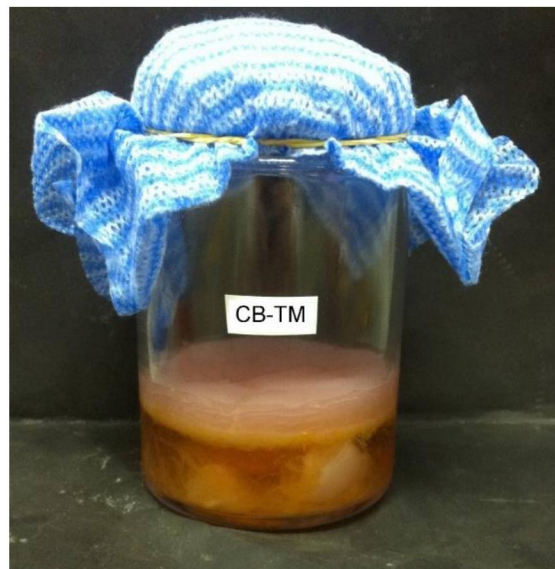
a produção de CB no chá verde por *Acetobacter xylinum* (atualmente denominado *Gluconacetobacter xylinus*). Resultado este que foi inferior ao apresentado em nosso estudo em 7,27 vezes para o CV e 7,09 vezes o MT. Demonstrando que o delineamento Plackett-Burman para a composição do meio de cultivo e a interação entre os nutrientes foram capazes de aumentar a produção de CB.

**FIGURA 8.** BIOFILME DE CELULOSE BACTERIANA OBTIDA NA COMPOSIÇÃO OTIMIZADA PARA O CHÁ VERDE



FONTE: A autora (2019).

**FIGURA 9.** BIOFILME DE CELULOSE BACTERIANA OBTIDA NA COMPOSIÇÃO OTIMIZADA PARA A MISTURA TERNÁRIA

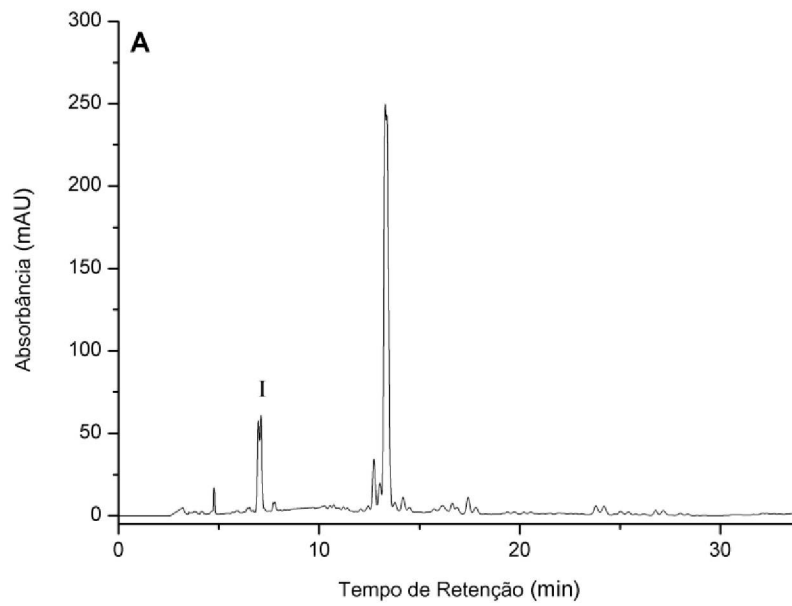


FONTE: A autora (2019).

#### 4.3. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS NOS MEIOS DE CULTURA ENRIQUECIDOS

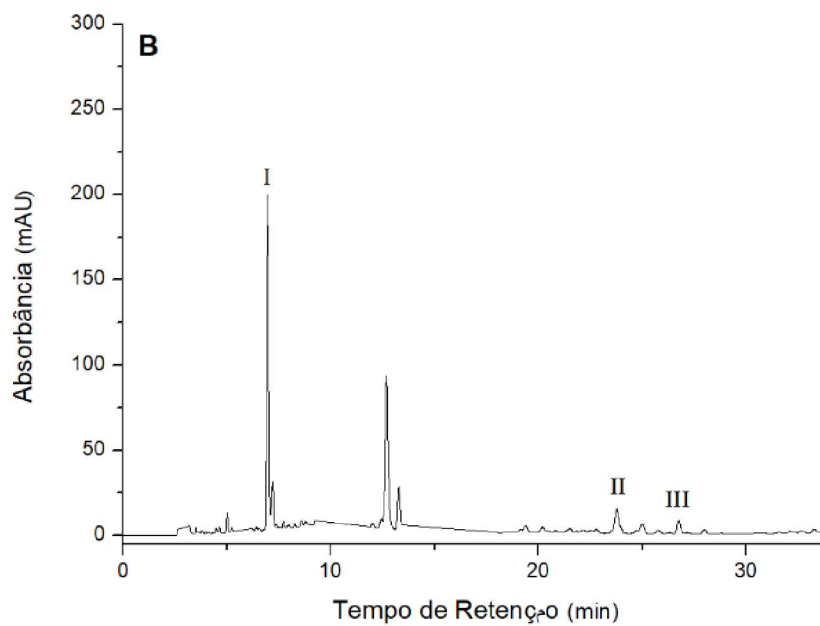
Os cromatogramas de CLAE-DAD/UV-Vis dos meios de cultivo são mostrados no Gráfico 1 (A, B, C e D). Os compostos bioativos identificados no meio de cultivo não fermentado de chá branco e no meio de cultivo não fermentado da mistura ternária (Gráfico 1A e 1C, respectivamente) foram os mesmos identificados em estudos anteriores por Tan et al. (2017), Pimentel-Moraes et al. (2018) e Xu et al. (2018), em que ambos utilizaram as mesmas matrizes. Nota-se nos Gráficos 1B e 1D que após a fermentação do meio há um aumento ou diminuição dos picos de alguns compostos, caracterizando uma metabolização pela *G. xylinus* e uma bioissorção dos mesmos pela CB (Tabela 12), respectivamente. Os dados experimentais estão de acordo com o estudo de Kaprasob et al. (2017), os quais relatam que o aumento nos níveis da correlação entre compostos fenólicos e antioxidantes são ocasionados pela biotransformação (também denominado metabolização) no processo de fermentação. Zaets et al. (2014) denotaram em seu estudo que filmes à base de celulose bacteriana são capazes de bioissorver elementos químicos, o que explica a diminuição de alguns picos. Dessa forma, os resultados indicam uma metabolização do ácido gálico pela *Gluconacetobacter xylinus*. Em resumo, a incorporação de nutrientes adequados no processo de fermentação contribuiu para aumentar a síntese de metabólitos microbianos biologicamente ativos.

**GRÁFICO 1A** – CROMATOGRAMA EPRESENTATIVO DE CLAE-DAD/UV-Vís DO MEIO NÃO FERMENTADO DE CHÁ VERDE. I. ÁCIDO GÁLICO, II. RUTINA, III. MIRICETINA, IV. CATEQUINA



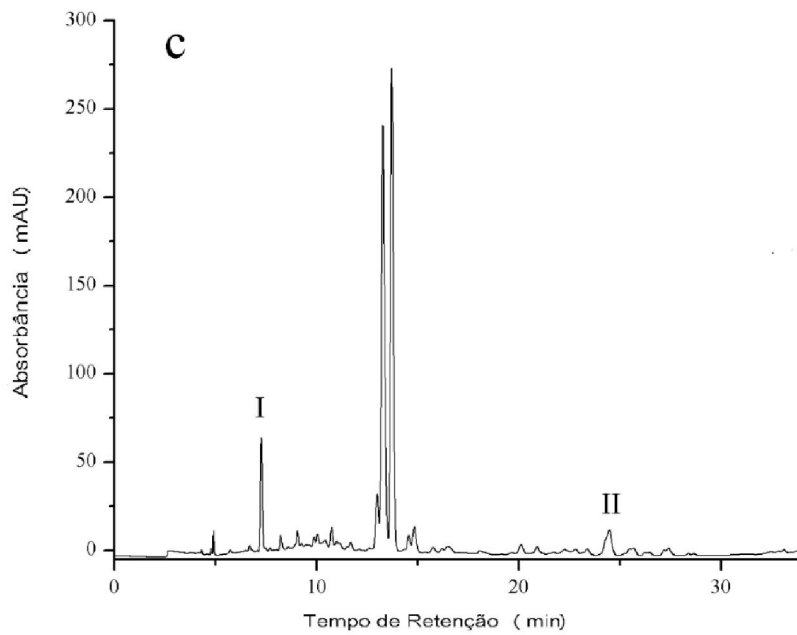
FONTE: A autora (2019).

**GRÁFICO 1B** – CROMATOGRAMA EPRESENTATIVO DE CLAE-DAD/UV-Vís DO MEIO FERMENTADO DE CHÁ VERDE. I. ÁCIDO GÁLICO, II. RUTINA, III. MIRICETINA, IV. CATEQUINA



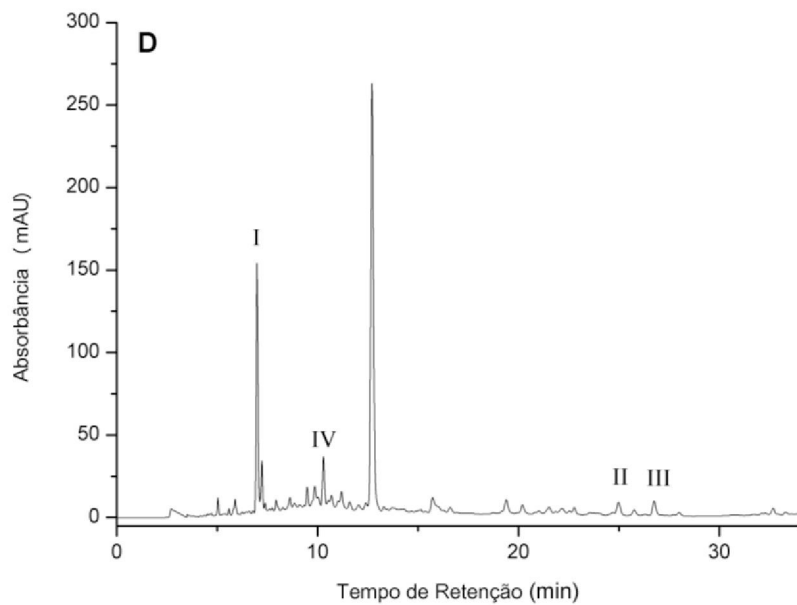
FONTE: A autora (2019).

**GRÁFICO 1C** – CROMATOGRAMA EPRESENTATIVO DE CLAE-DAD/UV-Vis DO MEIO NÃO FERMENTADO DA MISTURA TERNÁRIA. I. ÁCIDO GÁLICO, II. RUTINA, III. MIRICETINA, IV. CATEQUINA



FONTE: A autora (2019).

**GRÁFICO 1D** – CROMATOGRAMA EPRESENTATIVO DE CLAE-DAD/UV-Vis DO MEIO FERMENTADO DA MISTURA TERNÁRIA. I. ÁCIDO GÁLICO, II. RUTINA, III. MIRICETINA, IV. CATEQUINA



FONTE: A autora (2019).

A Tabela 12 expressa os dados de identificação dos compostos bioativos no meio de cultura enriquecidos apresentados nos Gráficos 1A, 1B, 1C e 1D. Dados estes que demonstram quantitativamente o que foi anteriormente discutido.

**TABELA 12 – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (TEMPO DE RETENÇÃO E ABSORBÂNCIA) DOS COMPOSTOS BIOATIVOS NOS MEIOS DE CULTIVO ENRIQUECIDOS**

Meio de Cultura	Compostos identificados	Tempo de retenção (min)	Absorbância (mAU)
MU-CV	Ácido gálico	7,1	61,3
MF-CV	Ácido gálico	6,9	200,1
	Rutina	24,1	15,4
	Miricetina	26,8	8,6
MU-MT	Ácido Gálico	7,3	64,2
	Rutina	24,5	11,5
MF-MT	Ácido Gálico	6,9	200,2
	Rutina	24,9	9,3
	Miricetina	26,8	10,2
	Catequina	10,3	36,5

Nota: MU-CV: Meio não fermentado de chá verde, MF-CV: Meio fermentado de chá verde, MU-MT: Meio não fermentado da mistura ternária e MF-MT: Meio fermentado da mistura ternária.  
 FONTE: A autora (2019).

#### 4.4. DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS MEIOS DE CULTURA

A Tabela 13 resume os resultados obtidos das concentrações de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante para os meios de cultura enriquecido com compostos bioativos. Nos resultados do CFT, o meio de cultura puro não fermentado (MU-Puro) e fermentado (MF-Puro) não apresentaram compostos fenólicos totais. Isso já era esperado, já que na composição do meio de cultura puro não há fontes de compostos bioativos. Em contraste, nos resultados de CFT para o meio de cultivo não fermentado de chá verde ( $571,67 \pm 0,00$  mg EAG/L) e meio de cultivo fermentado de chá verde ( $533,20 \pm 0,01$  mg EAG/L) é possível observar após o processo fermentativo uma diminuição dos compostos fenólicos totais de aproximadamente 7%. Esta pequena diminuição, portanto, não apresentou diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ). Da mesma forma, as amostras do meio de cultivo não fermentado da mistura ternária ( $299,93 \pm 0,09$  mg EAG /L) e do meio de cultivo fermentado da mistura ternária ( $271,27 \pm 0,01$  mg EAG /L) também apresentaram após a fermentação uma pequena diminuição para CFT (10%) e não apresentaram diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ). Essas diminuições estão de acordo com os dados

apresentados na análise de CLAE-DAD/UV-Vis para os meios enriquecidos e como explicada anteriormente está associada a bioadsorção de alguns compostos bioativos. Os meios com chá verde e com a mistura ternária apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre si para CFT, onde o chá verde apresentou maior quantidade de compostos fenólicos. Vale salientar que os meios de cultivo foram desenvolvidos a partir de matrizes diferentes.

Concentrações de FT também não foram encontradas em MU-Puro e MF-Puro. Entretanto, além de apresentar concentrações de FT, as amostras do meio de cultivo não fermentado de chá verde ( $564,69 \pm 0,08$  mg EC/L) e do meio de cultivo fermentado de chá verde ( $44,27 \pm 0,00$  mg EC/L) apresentou após a fermentação uma diminuição mais expressiva dos compostos bioativos (aproximadamente 92%), o que resultou na diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os meios. Analogamente, o meio de cultivo não fermentado da mistura ternária ( $371,51 \pm 0,03$  mg EC/L) e o meio de cultivo fermentado da mistura ternária ( $66,35 \pm 0,00$  mg EC/L) apresentou uma diminuição dos compostos de cerca de 82%, conseqüentemente houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ). Na análise de CLAE-DAD/UV-Vis também é possível ver uma diminuição expressiva de alguns picos de compostos não identificados, no entanto, não podemos correlacionar com a diminuição apresentada para FT. Sendo assim necessário a utilização de outros padrões de flavonoides na análise CLAE-DAD/UV-Vis para a identificação dos compostos.

O processo de bioadsorção é compreendido pela etapa da adsorção, da separação sólido-líquido e de uma possível regeneração do bioadsorvente carregado de um componente (RUBIO; TESSELE, 2002). Neste estudo acredita-se que a *G. xylinus* metabolizou os compostos bioativos para a sua produção, bem como a membrana CB os adsorveu.

Para o método DPPH, também não foram encontradas atividade antioxidante nas amostras de MU-Puro e MF-Puro. No entanto apresentou-se uma concentração da atividade antioxidante das amostras do meio de cultivo não fermentado de chá verde ( $706,57 \pm 0,01$  mmol ET/g) e do meio de cultivo fermentado de chá verde ( $466,82 \pm 0,01$  mmol ET/g) uma diminuição de aproximadamente 34% após o processo fermentativo. Assim como, as amostras do meio de cultivo não fermentado da mistura ternária ( $505,04 \pm 0,02$  mmol ET/g), e do meio de cultivo fermentado da mistura ternária ( $361,52 \pm 0,01$  mmol



ET/g) exibiu uma diminuição da AA de 28%. Da mesma forma, houve diminuição da atividade antioxidante para o método ABTS após a fermentação. As amostras do meio de cultivo não fermentado de chá verde ( $7077,08 \pm 0,02$  mmol ET/g) e do meio de cultivo fermentado de chá verde ( $5239,58 \pm 0,02$  mmol ET/g) apresentaram diminuição de 26%. Enquanto, o meio de cultivo não fermentado da mistura ternária ( $10072,92 \pm 0,01$  mmol ET/g) e do meio de cultivo fermentado da mistura ternária ( $8789,58 \pm 0,00$  mmol ET/g) exibiram uma diminuição para AA de 12%. Essas diminuições das AA nos meios de cultivo podem ser associadas a diminuição das concentrações de CFT e FT, resultante de uma interação sinérgica (ENKO; GLISZCZYŃSKA-ŚWIGLO, 2015; SKROZA et al., 2015).

Logo, é possível observar que após a fermentação as concentrações de CFT, FT e da AA dos meios de cultura diminuiriam, indicando uma biossorção desses compostos bioativos pela membrana (ZAETS et al., 2014), como também uma modulação desses compostos através da metabolização pela *Gluconacetobacter xylinus* (KAPRASOB et al., 2017).

**TABELA 13** – FENÓLICOS TOTAIS (CFT), FLAVONOIDES TOTAIS (FT) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA) DO MEIO DE CULTURA

Meio de cultura	CFT (mg EAG/L)	FT (mg EC/L)	AA (mmol ET/g)	
			DPPH	ABTS
MU-Puro	$0,00^a \pm 0,00$	$0,00^a \pm 0,00$	$0,00^a \pm 0,00$	$0,00^a \pm 0,00$
MF-Puro	$0,00^a \pm 0,00$	$0,00^a \pm 0,00$	$0,00^a \pm 0,00$	$0,00^a \pm 0,00$
MU-CV	$571,67^c \pm 0,00$	$564,69^d \pm 0,08$	$706,57^e \pm 0,01$	$7077,08^d \pm 0,02$
MF-CV	$533,20^c \pm 0,01$	$44,27^b \pm 0,00$	$466,82^c \pm 0,01$	$5239,58^b \pm 0,02$
MU-MT	$299,93^b \pm 0,09$	$371,51^c \pm 0,03$	$505,04^d \pm 0,02$	$10072,92^e \pm 0,01$
MF-MT	$271,27^b \pm 0,01$	$66,35^b \pm 0,00$	$361,50^b \pm 0,01$	$8789,58^c \pm 0,00$

Nota: MU-Puro: Meio controle não fermentado, MF-Puro: Meio controle fermentado, MU-CV: Meio não fermentado de chá verde, MF-CV: Meio fermentado de chá verde, MU-MT: Meio não fermentado da mistura ternária e MF-MT: Meio fermentado da mistura ternária.

FONTE: A autora (2019).

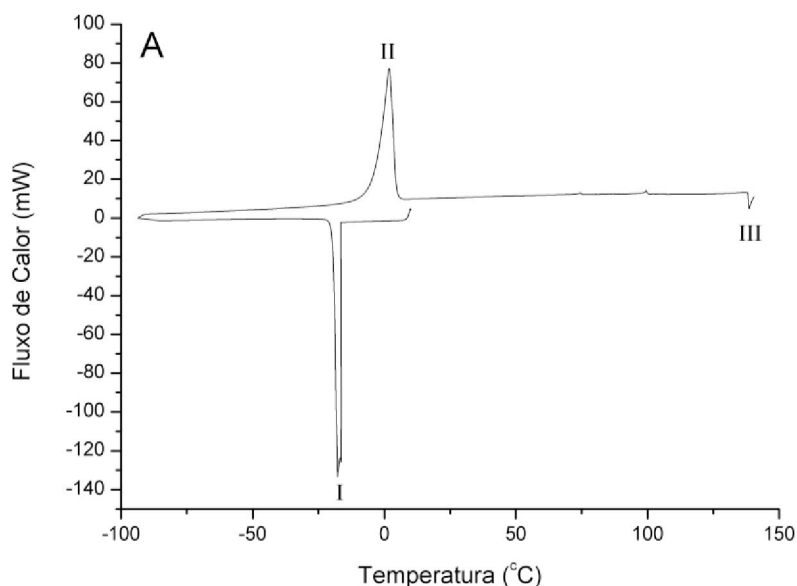
#### 4.5. CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA

##### 4.5.1. Determinação da estabilidade térmica das membranas

Os Gráfico 2A e 2B apresentam as curvas de DSC das membranas de celulose obtida nos meios com chá verde e com a mistura ternária, respectivamente. É possível observar no Gráfico 6A que a membrana CB-CV apresenta três pontos, os quais são o ponto de vitrificação em  $-19,6^\circ\text{C}$ , ponto de

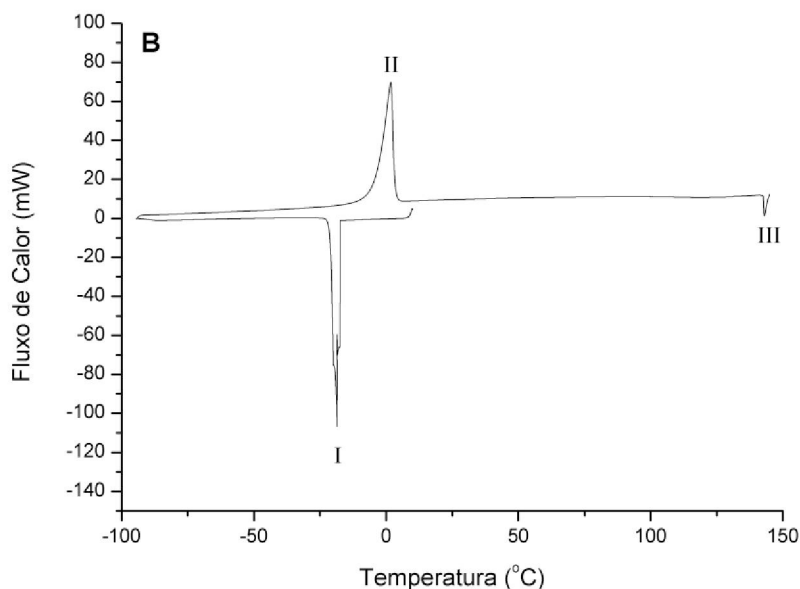
cristalização em 1°C e de estabilidade térmica até 137,8°C. A membrana CB-MT apresentou ponto de vitrificação (-18°C) e cristalização (1°C) similares a membrana CB-CV, no entanto, o ponto de estabilidade térmica foi maior, isto é, apresentou uma temperatura de 143,2°C. Vale observar que ambas as membranas apresentaram um pico endotérmico próximo a 19°C e um pico exotérmico em -1°C. Os valores obtidos para o ponto de vitrificação e estabilidade térmica são próximos dos resultados apresentados por Vieira et al. (2013). Este autor apresentou em seu estudo da membrana com chá verde um ponto de vitrificação em -20°C, ponto de cristalização em torno de 10°C e estabilidade térmica em 137°C. É importante realizar a análise de calorimetria exploratória diferencial para verificar se há variação no comportamento térmico da membrana de celulose bacteriana e a que temperatura é possível trabalhar no processo de secagem da membrana sem que haja degradação térmica (VIEIRA et al., 2013).

**GRÁFICO 2A - CURVAS DSC DA MEMBRANA CB-CV**



I. Ponto de vitrificação, II. Ponto de cristalização e III. Estabilidade Térmica.  
FONTE: A autora (2019).

**GRÁFICO 2B - CURVAS DSC DA MEMBRANA CB-MT**



I. Ponto de vitrificação; II. Ponto de cristalização; III. Estabilidade Térmica.

FONTE: A autora (2019).

#### 4.5.2. Determinação de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante

A Tabela 14 expressa os resultados obtidos para as membranas em relação as concentrações de CFT, FT e AA. É possível observar que o CB-Pura não apresentou concentrações de CFT, FT e atividade antioxidante. Contudo, os dados experimentais da concentração de CFT para as membranas CB-CV ( $879,65 \pm 0,01$  mg EAG/L) e CB-MT ( $1312,80 \pm 0,03$  mg EAG/L) apresentaram-se maiores do que os observados no meio de cultura enriquecidos com compostos bioativos. A explicação está no fato de que a *G. xylinus* pode ser capaz de aumentar esses níveis através da biotransformação dos compostos existentes no meio durante a fermentação. Esse comportamento foi evidenciado em bactérias ácido-lácticas no estudo de Kaprasob et al. (2017). A biossorção também pode ser observada ao compararmos à Tabela 13 e 14, uma vez que a migração de fenólicos do meio com chá verde e com a mistura ternária para as membranas foi de 38,47 e 27,96 mg EAG/L, respectivamente. A alta concentração de CFT nas membranas enriquecidas é positiva para futuras aplicações, como por exemplo, a aplicação em alimentos. O uso em cosméticos é uma outra alternativa aplicação das membranas apresentadas neste estudo,

uma vez que a alta capacidade de absorção de água das CBs (PECORARO et al., 2008) é um fator que influencia a taxa de liberação dos compostos bioativos quando em contato com a pele (CZAJA et al., 2006). Portanto, a alta concentração de CFT associada as propriedades únicas das membranas CB beneficia esse tipo de aplicação.

Em contrapartida, a concentração de FT para as membranas CB-CV ( $26,44 \pm 0,02$  mg EC/L) e CB-MT ( $29,19 \pm 0,02$  mg EC/L), foi inferior aos observados no meio de cultura enriquecidos com compostos bioativos. Essa migração de flavonoides do meio com chá verde e com a mistura ternária para as respectivas membranas foram pequenas quando comparadas a alta concentração de flavonoides no meio com chá verde ( $523,42$  mg EC/L) e na mistura ternária ( $305,16$  mg EC/L) antes da fermentação. Vale salientar, que os flavonoides podem ser conjugados pela glicuronidação, sulfatação ou metilação, como também metabolizados a pequenos compostos fenólicos (WALLE; VINCENT; WALLE, 2003). Portanto, a metabolização dos flavonoides a pequenos compostos fenólicos explica o aumento na concentração da CFT.

O resultado encontrado neste estudo da atividade antioxidante para o método DPPH foi de  $17,75 \pm 0,00$  mmol ET/g para membrana CB-CV e  $16,71 \pm 0,00$  mmol ET/g para CB-MT. Enquanto que a concentração de AA para o método ABTS para as membranas CB-CV e CB-MT foram de  $973,33 \pm 0,01$  mmol ET/g e  $575,94 \pm 0,00$  mmol ET/g, respectivamente. É possível observar que atividade antioxidante das membranas foi muito menor do que a AA do meio de cultivo. Quando há uma alta concentração de compostos bioativos na membrana, como apresentada em nosso estudo, presumiu-se que a atividade antioxidante seria proporcionalmente elevada, no entanto, isso não ocorreu. No entanto, para o método DPPH, obteve-se uma baixa concentração de AA. Uma razão para isso é que a diminuição da atividade antioxidante pode estar associada à uma interação antagônica dos compostos bioativos (SKROZA et al., 2015). Em contraste, ambas as membranas enriquecidas apresentaram alta concentração de atividade antioxidante para o método ABTS.

Tsai, Ho e Chen (2017) não exibiram propriedades antioxidantes para a membrana CB pura em seu estudo, entretanto, ao incorporar nanocompósitos as membranas CB eles observaram uma capacidade efetiva na remoção de radicais livres. Similarmente, Sukhtezari et al. (2016) obtiveram uma capacidade

efetiva na remoção de radicais livres da membrana CB produzida em extrato de *Scrophularia striata*. Faltam estudos na literatura sobre a adição de compostos bioativos naturais nos meios de cultura, bem como a avaliação da atividade antioxidante desses meios.

É importante salientar que as variações de resultado entre os métodos se dá devido ao radical DPPH reagir com polifenóis. Enquanto o radical ABTS reage com uma ampla gama de antioxidantes devido a sua alta reatividade, logo as absorvâncias dos antioxidantes determinados pelo DPPH e pelo ABTS são parcialmente diferentes (MAREČEK et al., 2017).

**TABELA 14** – FENÓLICOS TOTAIS (CFT), FLAVONOIDES TOTAIS (FT) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE(AA) DA CELULOSE BACTERIANA

Membrana	CFT (mg EAG/L)	FT (mg EC/L)	AA (mmol ET/g)	
			DPPH	ABTS
CB-Pura	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
CB-CV	879,65 <sup>b</sup> ± 0,01	26,44 <sup>b</sup> ± 0,02	17,75 <sup>c</sup> ± 0,00	973,33 <sup>c</sup> ± 0,01
CB-MT	1312,80 <sup>b</sup> ± 0,03	29,19 <sup>b</sup> ± 0,02	16,70 <sup>b</sup> ± 0,00	575,94 <sup>b</sup> ± 0,00

Nota: CB-CV: membrana de CB no chá verde e CB-MT: membrana de CB na mistura temária.  
 FONTE: A autora (2019).

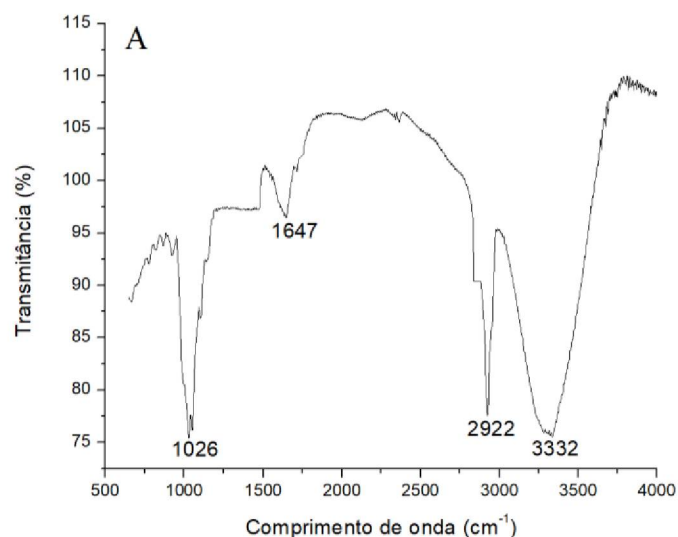
#### 4.5.3. Caracterização das estruturas químicas das membranas

Os espectros agrupados das membranas CB-Pura, CB-CV e CB-MT são apresentados nos Gráficos 3A, 3B e 3C, os quais denotam as posições dos picos de vários grupamentos funcionais. Os espectros MIR-ATR das membranas CB-CV e CB-MT apresentaram picos semelhantes aos das membranas CB-Pura (1026, 1647, 2922 e 3332 cm<sup>-1</sup>). Validando assim a estrutura básica da celulose pura. Movasaghi, Rehman e Rehman (2008) detalharam em seu estudo as frequências espectrais relacionada as estruturas das células em geral. Portanto, o primeiro pico (1038 cm<sup>-1</sup>) observado na CB-CV refere-se ao alongamento de C-O ribose. Além disso, juntamente com os picos 1026 e 1046 cm<sup>-1</sup> observados em CB-Pura e CB-MT, respectivamente, refere-se a conexão das frequências de alongamento com as da curvatura dos grupos C-OH dos carboidratos (como glicose, frutose e glicogênio). É possível observar que as membranas CB-CV e CB-MT apresentam um novo pico a 1415 cm<sup>-1</sup> quando comparado a CB-Pura, o que pode indicar deformação de C-H e N-H, bem como alongamento de C-N.

Os picos para as bandas proteicas da Amida I foram obtidos a 1647, 1641 e 1716  $\text{cm}^{-1}$  para as membranas CB-Pura, CB-CV e CB-MT, respectivamente. Da mesma forma, as amostras apresentaram picos para a vibração de alongamento C-H em 2922, 2913 e 2930  $\text{cm}^{-1}$  para a membrana CB-Pura, CB-CV e CB-MT, respectivamente. A banda de 3000-3600  $\text{cm}^{-1}$  dispostas nas membranas CB-Pura, CB-CV e CB-MT, pode designar ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares. Vieira (2013), Sukhtezari et al. (2017) e Du et al (2018) apresentam picos semelhantes ao apresentado em nosso estudo, o que indica que a CB possui uma estrutura básica independente da composição do meio de cultivo.

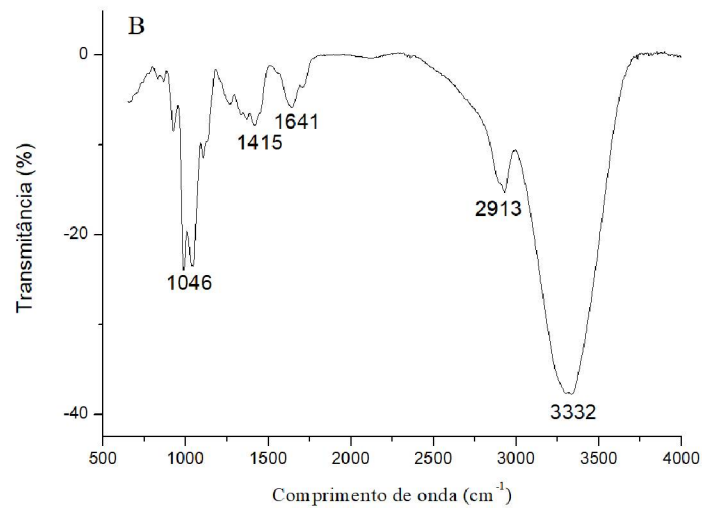
Em geral, as membranas CB-CV e CB-MT apresentam espectros muito semelhantes, inclusive no pico 1415  $\text{cm}^{-1}$  não identificado na CB pura de Du et al. (2018). A presença desse novo pico, pode estar associada aos grupamentos dos compostos fenólicos caracterizados nas membranas. No entanto, não é possível afirmar esse entendimento pois não foi encontrado estudos que determinem os grupamentos dos compostos fenólicos por essa técnica.

**GRÁFICO 3A – ANÁLISE ESPECTRAL MIR-ATR DA MEMBRANA CB-PURA**



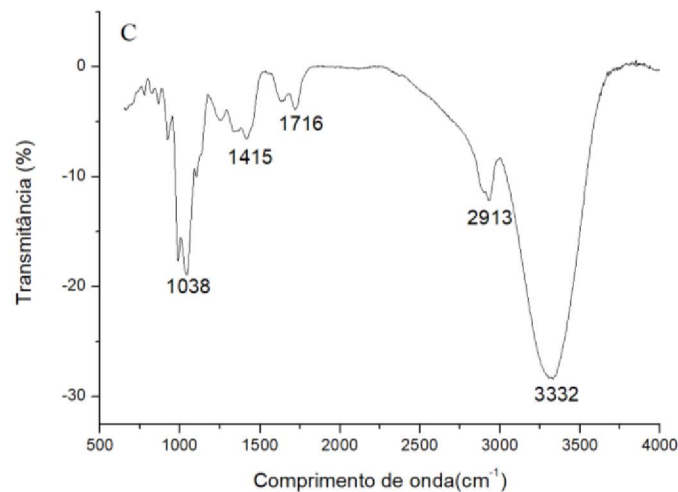
FONTE: A autora (2019).

**GRÁFICO 3B – ANÁLISE ESPECTRAL MIR-ATR DA MEMBRANA CB-CV**



FONTE: A autora (2019).

**GRÁFICO 3C – ANÁLISE ESPECTRAL MIR-ATR DA MEMBRANA CB-MT.**



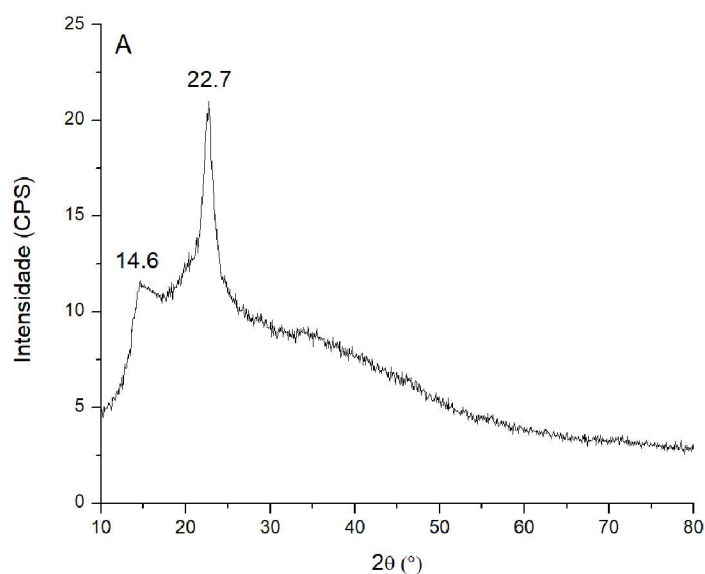
FONTE: A autora (2019).

#### 4.5.4. Determinação da cristalinidade das membranas

Os Gráficos 4A, 4B e 4C mostram os difratogramas de raio-X das membranas de CB-Pura, CB-CV e CB-MT, respectivamente. É possível observar que os dois picos apresentados no CB-Pura (14,6° e 22,7°) são similares aos da CB-CV (14,6° e 22,8°). No estudo de Vieira et al. (2013), a membrana CB com chá verde apresentou dois picos a 15,0° e 22,4°. Esses picos foram semelhantes aos resultados apresentados em nossa pesquisa para o CB-CV. Estes dados propõem que a membrana CB-CV exibe formas cristalinas típicas de celulose I

(Jeon, et al., 2010; Du et al., 2018). A membrana CB-MT tem apenas um pico a  $2\theta$  de  $22,7^\circ$ . No entanto, este pico é semelhante ao da CB-Pura ( $22,7^\circ$ ) e da CB-CV ( $22,8^\circ$ ) do presente estudo. O índice de cristalinidade das membranas CB-Pura, CB-CV e CB-MT foi de 53,0%, 48,9% e 21,3%, respectivamente. Conseqüentemente, a fase amorfa é de 47% para a CB-Pura, 51,1% para a CB-CV e 78,7% para CB-MT. Em relação às propriedades mecânicas, a fase cristalina tende a aumentar a rigidez, enquanto a fase amorfa promove melhor absorção de energia (VIEILLE; AUCHER; TALETB, 2009). Essa redução na cristalinidade é explicada pela diminuição na força de algumas ligações de hidrogênio de regiões mais regulares da CB, tornando essas regiões mais amorfas (GAO et al., 2009).

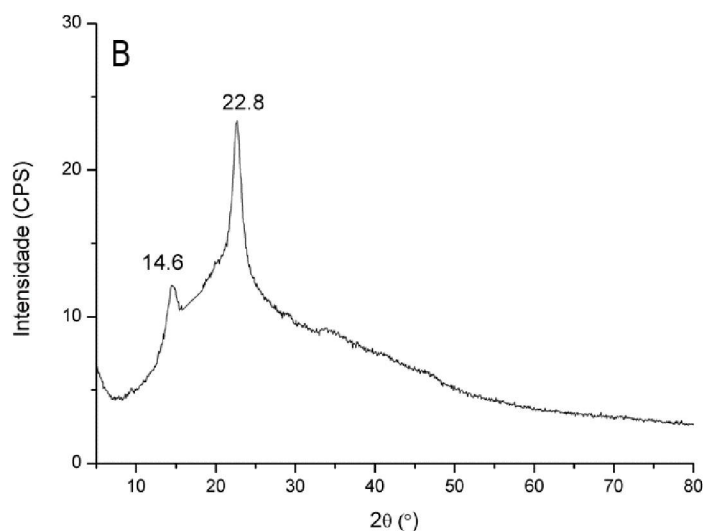
**GRÁFICO 4A – DIFRATOGRAMA DE RAIOS-X DA MEMBRANA CB-PURA**



FONTE: A autora (2019).

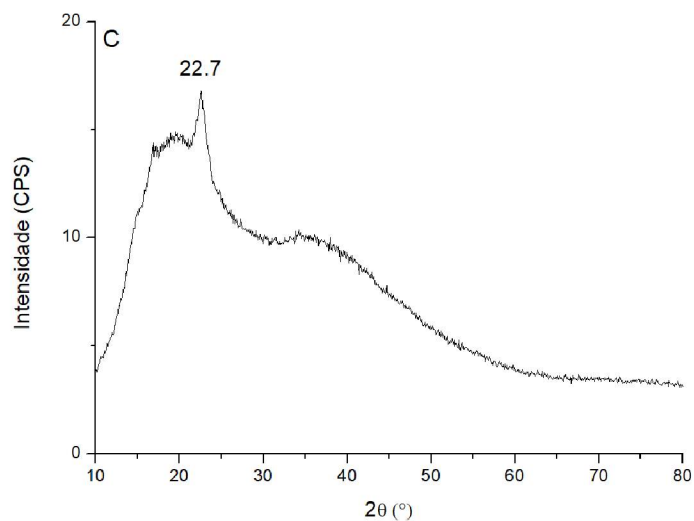


**GRÁFICO 4B – DIFRATOGRAMA DE RAIOS-X DA MEMBRANA CB-CV.**



FONTE: A autora (2019).

**GRÁFICO 4C – DIFRATOGRAMA DE RAIOS-X DA MEMBRANA CB-MT.**



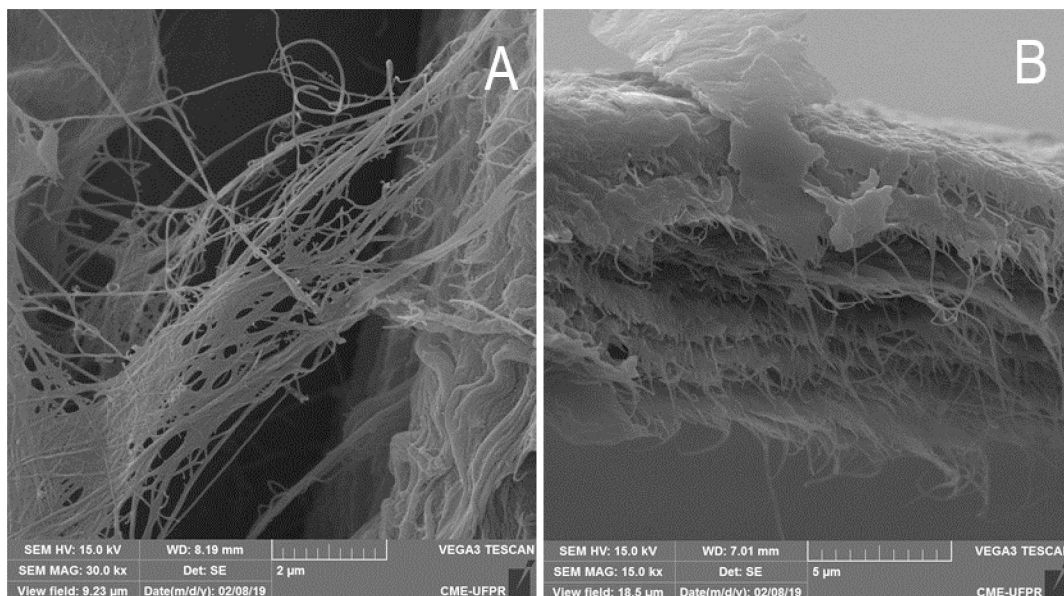
FONTE: A autora (2019).

#### 4.5.5. Identificação das microestruturas das membranas

A Figura 10, 11 e 12 exibem micrografias MEV de visão superior e seção transversal da morfologia das membranas CB-pura, CB-CV e CB-MT, respectivamente. É possível observar as diferenças na morfologia e estrutura entre as membranas, bem como redes nanodimensionais e microfibrilas. Assim, as estruturas CB-Pura são muito mais finas e aparentemente mais frágeis do que as membranas enriquecidas com compostos bioativos. Esta fragilidade da membrana CB-Pura está associada à sua aparência mais fina em relação a

outras membranas e à necessidade de mais tempo para ser produzida. Além disso, uma ampliação muito maior foi necessária para que essas estruturas fossem visualizadas. Em contrapartida, a vista superior da membrana CB-MT tinha uma estrutura mais espessa do que CB-Pura e membrana CG-CV. Isto deve-se à CB-MT que possui colágeno hidrolisado em sua composição. Estes resultados evidenciam que a CB-MT é mais densa e mais compacta e, conseqüentemente, pode possuir propriedades físico-mecânicas otimizadas. As micrografias da visão da seção transversal de todas as membranas possuem multicamadas. Estes confirmam que a formação da membrana, também chamada biofilme, ocorreu pela aderência em camadas dos microrganismos (DONLAN, 2002). Este desenvolvimento do biofilme natural é caracterizado pela adesão inicial por células microbianas e sua irreversível ligação pela produção de substâncias poliméricas extracelulares (COSTA; SILVA; TAVARES, 2017). A morfologia porosa compo-ndo-se de uma rede interligada por microfibrilas de celulose e feixes de microfibrilas são características da membrana CB (CAI; KIM, 2010), as quais foram observadas em todas as membranas.

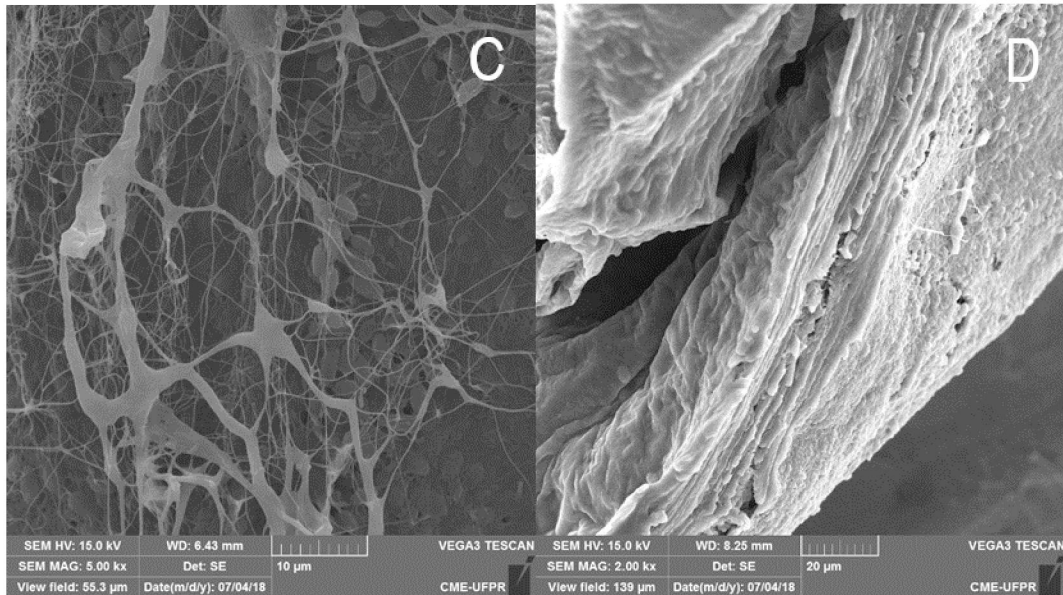
**FIGURA 10 – IMAGENS MEV DAS SUPERFÍCIES DA MEMBRANA CB-PURA**



(A) Vista superior com ampliação de 30.000x; (B) vista da seção transversal com ampliação de 15.000x.

FONTE: A autora (2019).

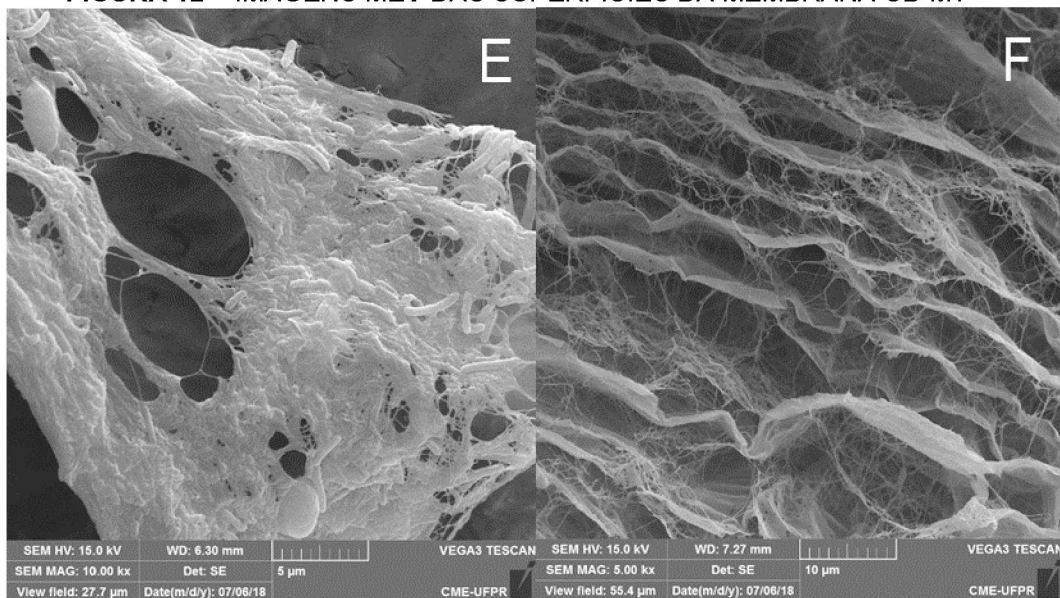
**FIGURA 11 – IMAGENS MEV DAS SUPERFÍCIES DA MEMBRANA CB-CV**



(C) Vista superior com ampliação de 5.000x; (D) vista da seção transversal com ampliação de 2.000x.

FONTE: A autora (2019).

**FIGURA 12 – IMAGENS MEV DAS SUPERFÍCIES DA MEMBRANA CB-MT**



(E) Vista superior com ampliação de 10.000x e (F) vista da seção transversal com ampliação de 5.000x.

FONTE: A autora (2019).

#### 4.5.6. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas resultantes do ensaio de tração, alongamento e compressão são mostradas na Tabela 15. Nas micrografias MEV, anteriormente apresentadas, discutiu-se que a incorporação de colágeno

poderia proporcionar propriedades físico-mecânicas otimizadas para a CB-MT. Logo, os resultados das propriedades mecânicas aqui apresentados demonstraram-se de acordo com essa hipótese. Para membrana CB-CV e membrana CB-MT, a resistência à tração foi cerca de  $6,5 \pm 0,0$  MPa e  $10,3 \pm 0,3$  MPa, respectivamente. Ou seja, a membrana CB-MT apresentou-se 1,6 vezes superior a membrana CB-CV em para a resistência à tração. Similarmente, as propriedades mecânicas de alongamento para membrana CB-MT ( $7,7 \pm 0,2$  MPa) apresentou-se 6,1 vezes superior a membrana CB-CV ( $1,3 \pm 0,2$  MPa). Para resistência à compressão a membrana CB-MT ( $4,8 \pm 0,4$  MPa) apresentou-se 2,1 vezes superior a membrana CB-CV ( $2,3 \pm 0,5$  MPa). Consequentemente, a membrana CB-MT possui diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação a membrana CB-CV para a todas as propriedades mecânicas avaliadas. Saibuatong e Phisalaphong (2010) apresentou para CB pura uma resistência à tração de aproximadamente 5,0 MPa e alongamento de 4,0 MPa. Ao utilizar gel de aloe vera no meio de cultura da CB este autor obteve resultados para resistência à tração entre 5,5-9,0 MPa e para alongamento entre 4,8-5,0 MPa. Resultados estes inferiores aos aqui apresentados para a membrana CB-MT. É importante destacar que quanto maior a cristalinidade, mais rígido e termicamente estável é o material, no entanto, esta rigidez diminui a resistência à tração e o alongamento. Em contrapartida, as regiões amorfas promovem elasticidade e resistência ao impacto (CARRAHER, 2003; ACTON, 2013). Assim, os resultados de cristalinidade obtidos previamente na análise de difração de raios X estão relacionados à diferença das propriedades mecânicas obtidas nesta pesquisa.

A embalagem ativa de alimentos visa aumentar a vida útil e a capacidade nutricional dos alimentos, bem como fornecer aos clientes qualidade de alimentos (ROSSI, et al., 2017). Dessa forma, estudos recentes se concentraram no desenvolvimento de filmes com propriedades mecânicas melhores, como resistência à tração e alongamento na ruptura. Além disso, a integridade do alimento embalado precisa ser mantida e a migração de componentes para os alimentos precisa ser evitada (BLANCO et al., 2018). Atualmente, o ácido polilático (PLA) é um material de base biológica, particularmente utilizado para aplicações de embalagens biodegradáveis devido à sua transparência, alta resistência e moderadas propriedades de barreira (LI; HUNEULT, 2007). O

PLA possui uma resistência à tração de  $41,8 \pm 0,6$  MPa e alongamento na ruptura de  $4,1 \pm 0,4\%$  (KAMTHAI; MAGARAPHAN, 2015). Este valor de resistência à tração é 4,1 vezes maior do que o da CB-MT. No entanto, o CB-MT apresentou um valor de alongamento maior que o PLA em 1,9 vezes. Nesse contexto, é possível observar pelos resultados das propriedades mecânicas, que nesse caso, a membrana CB-MT apresentou melhores características físico-mecânicas em resposta a resistência a tração, alongamento e compressão quando comparadas a outros estudos para celulose bacteriana. Além disso, o CB-MT apresentou um maior valor de alongamento que o biopolímero de PLA. Portanto, pode ser uma alternativa na aplicação em embalagem de alimentos.

**TABELA 15** – PROPRIEDADES MECÂNICAS DAS MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA

Membrana	Resistência à tração (MPa)	Alongamento (%)	Compressão (MPa)
CB-CV	$6,5^a \pm 0,0$	$1,3^a \pm 0,2$	$2,3^a \pm 0,5$
CB-MT	$10,3^b \pm 0,3$	$7,7^b \pm 0,2$	$4,8^b \pm 0,4$

Nota: CB-CV: membrana de CB em chá verde e CB-MT: membrana de CB na mistura ternária.  
 FONTE: A autora (2019).

#### 4.5.7. Atividade antimicrobiana

O controle não exibiu atividade antimicrobiana no estudo, enquanto que a membrana CB-CV apresentou um efeito inibitório contra as bactérias testadas, exibindo taxas de inibição de  $99,4 \pm 0,6\%$  para *E. coli* e  $91,5 \pm 8,2\%$  para *S. aureus*. Entretanto, para a membrana CB-MT o efeito inibitório apresentou-se apenas contra a *S. aureus* ( $99,9 \pm 0,1\%$ ), não havendo diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre as membranas. Resultados estes, maiores que os apresentados no estudo de Tsai, Ho e Chen (2017), cujas membranas incorporadas com nanopartículas de silimarina-zeína apresentaram efeito inibitório de apenas  $21,6 \pm 2,8\%$  para *E. coli* e  $62,1 \pm 1,9\%$  para *S. aureus*. Isto demonstra que a atividade antimicrobiana não está devidamente relacionada à membrana CB, mas aos compostos bioativos presentes nas membranas CB, como visto no estudo de Du et al. (2018), cuja atividade antimicrobiana de suas membranas estava associada a incorporação de quitosana e carboximetilquitosana.

#### 4.5.8. Capacidade de absorção de água pela membrana

Para a membrana CB-CV obteve-se uma capacidade de absorção de água de  $365,4 \pm 47,9\%$ , enquanto a CB-MT apresentou uma capacidade de  $449,9 \pm 16,1\%$ . Resultados estes, inferiores aos apresentados por Saibuatong e Phisalaphong (2010) para a CB pura (490%) e para a CB com aloe vera (735%). E também inferior ao obtido por Vieira et al. (2013) para a membrana com chá verde ( $529,0 \pm 4,0\%$ ). Esses mesmos autores observaram para diferentes meios uma capacidade de absorção de água entre 73 a 2144%. Essas diferenças são explicadas pela composição do meio de cultura (VIEIRA et al., 2013). Vale ressaltar que a capacidade de absorção de água, também denominada reidratação, é importante por influenciar na taxa de liberação dos compostos bioativos (CZAJA et al., 2006).

#### 4.5.9. Análise de cor

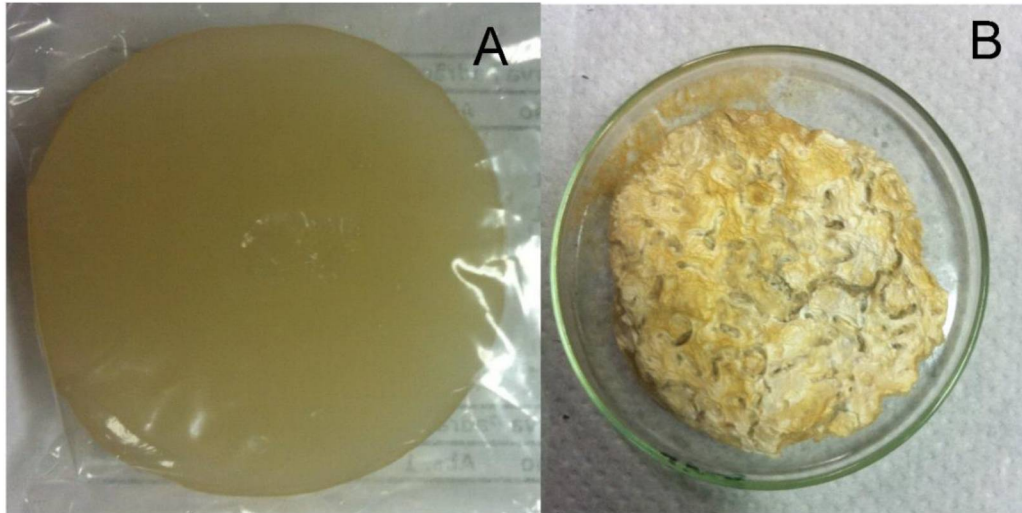
Com relação à medida de cor (Tabela 16), os valores atribuídos à coloração das membranas de celulose bacteriana em meio com chá verde *in natura* e liofilizada (Figura 13), meio com a mistura ternária *in natura* e liofilizada (Figura 14), se apresentaram dentro do primeiro quadrante da Figura 3 e na Figura 15. Valores estes, positivos de  $a^*$  e  $b^*$  que representam a cor vermelha e amarela. Essas cores estão em conformidade com o aspecto visível das membranas e do meio de cultura. Além disso, é importante destacar que as membranas apresentaram alta concentração de compostos fenólicos totais e flavonoides totais. Os flavonoides, como as antocianinas, são responsáveis pela maioria das cores como azul, violeta e todas as tonalidades de vermelho em flores e frutos (MARKAKIS, 1982).

**TABELA 16.** DADOS OBTIDOS PARA AS MEDIADAS DE COR DAS MEMBRANAS CBs

Membrana	Parâmetros de cor		
	L*	a*	b*
CB-CV <i>in natura</i>	$61,8^a \pm 1,0$	$3,9^a \pm 0,1$	$20,7^a \pm 0,3$
CB-MT <i>in natura</i>	$60,6^a \pm 1,6$	$11,8^c \pm 1,3$	$7,7^b \pm 0,3$
CB-CV liofilizada	$71,6^b \pm 0,1$	$4,9^a \pm 1,6$	$24,3^a \pm 1,2$
CB-MT liofilizada	$61,7^a \pm 0,0$	$8,2^b \pm 0,1$	$32,1^c \pm 0,3$

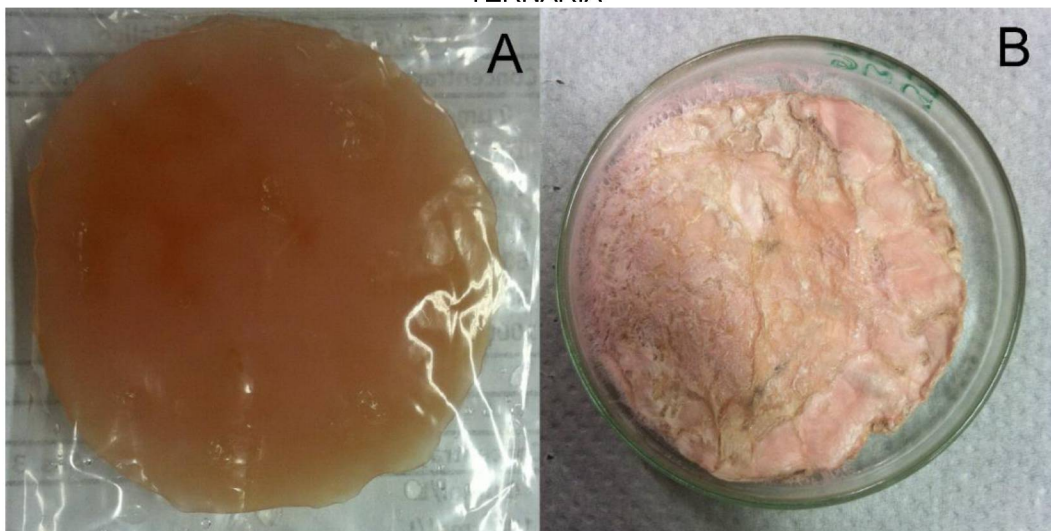
Nota: CB-CV: membrana de CB em chá verde e CB-MT: membrana de CB na mistura ternária. L\*: luminosidade (varia do preto ao branco),  $a^*$ : valores da croma que variam do verde ao vermelho e  $b^*$ : valores da croma que variam do azul ao amarelo. FONTE: A autora (2019).

**FIGURA 13 – MEMBRANAS OBTIDAS PARA O MEIO DE CULTIVO COM CHÁ VERDE**



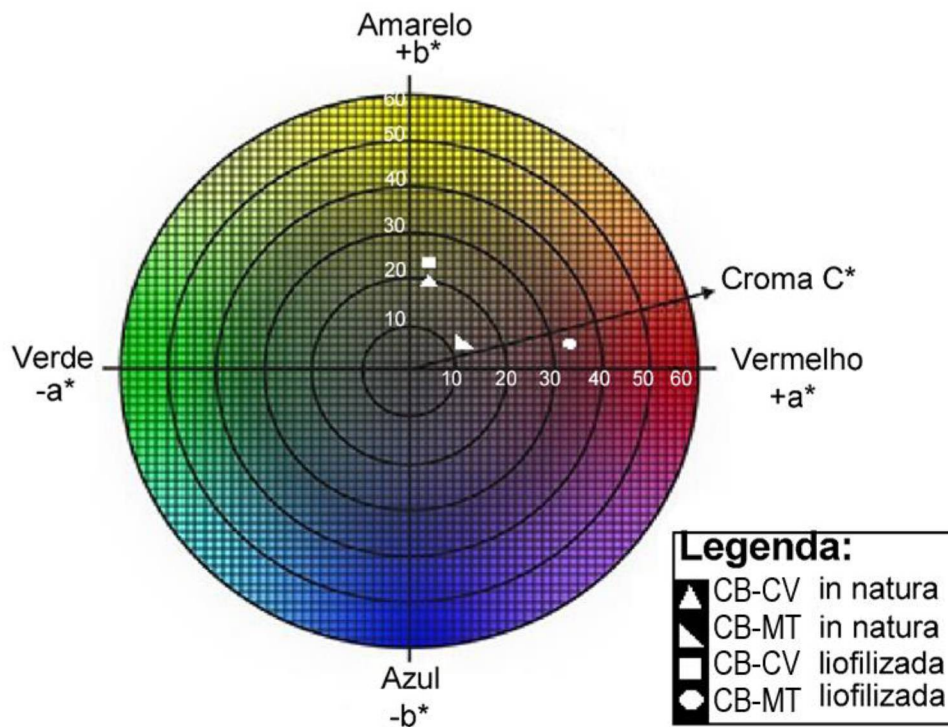
(A) CB-CV in natura e (B) CB-CV liofilizada.  
FONTE: A autora (2019).

**FIGURA 14 – MEMBRANAS OBTIDAS PARA O MEIO DE CULTIVO COM A MISTURA TERNÁRIA**



(A) CB-MT in natura e (B) CB-MT liofilizada.  
FONTE: A autora (2019).

**FIGURA 15 – DISTRIBUIÇÕES DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA AS MEMBRANS DENTRO DO ESPACO DE COR**



FONTE: A autora (2019).

#### 4.5.10. Teor de umidade por método infravermelho e atividade de água

A Tabela 17 exibe os dados obtidos para o teor de umidade por método infravermelho e atividade de água das membranas de celulose bacteriana. O teor de umidade é um parâmetro quantitativo que mensura o percentual em peso de toda água livre e água ligada presente no produto (SCOTT, 1957). O alto teor de umidade apresentado na Tabela 16 já era esperado, uma vez que as membranas foram produzidas em um meio de cultura líquido. Além disso, o presente estudo demonstrou a elevada capacidade de absorção de água que as membranas CB-CV e CB-MT possuem.

Em contrapartida, a atividade de água é uma medida qualitativa da disponibilidade de água livre propensa a inúmeras reações físicas, químicas e biológicas (WELTI-CHANES; VERGARA, 1997). É possível observar na Tabela 15 que a  $a_w$  das membranas CB-CV *in natura* e CB-MT *in natura* apresentaram após o processo de liofilização uma redução da atividade de água em aproximadamente 47%. Vale destacar que a ação microbiana é mutável em



relação a atividade de água, sendo que  $a_w$  inferior a 0,6 é desfavorável ao crescimento microbiano. A partir de 0,65 a  $a_w$  favorece o crescimento de microrganismos específicos e até 0,75 podem desenvolver algumas leveduras, bactérias halófitas e fungos xerofílicos. E de forma geral, a atividade de água menor que 0,90 inibe o desenvolvimento de grande parte das bactérias patogênicas, com exceção do *Staphylococcus aureus* que em condições de aerobiose se desenvolve em atividade de água a 0,86 (GARCIA, 2004). Portanto, os resultados aqui apresentados para as membranas liofilizadas de CB-CV e CB-MT indicam que as mesmas apresentam menos susceptibilidade ao crescimento microbiano indesejado do que as membranas *in natura*.

**TABELA 17 – DADOS OBTIDOS PARA O TEOR DE UMIDADE POR MÉTODO INFRAVERMELHO E ATIVIDADE DE ÁGUA DAS MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA**

Membrana	Umidade Infravermelho (%)	Atividade de água
CB-CV <i>in natura</i>	84,5 <sup>a</sup> ± 2,3	0,96 <sup>a</sup> ± 0,00
CB-MT <i>in natura</i>	88,8 <sup>a</sup> ± 4,6	0,98 <sup>a</sup> ± 0,02
CB-CV liofilizada	-	0,51 <sup>b</sup> ± 0,03
CB-MT liofilizada	-	0,51 <sup>b</sup> ± 0,00

Nota: CB-CV: membrana de CB em chá verde e CB-MT: membrana de CB na mistura ternária.  
 FONTE: A autora (2019).

## 5. CONCLUSÃO

Os meios de cultura otimizados com chá verde e misturas ternárias influenciaram a produção das membranas por *Gluconacetobacter xylinus*, o qual promoveu uma produtividade de 99,9% para CB-CV e CB-MT em comparação com CB (branco). Além disso, meios de cultura enriquecidos formaram as membranas CBs em menos tempo do que o meio sem compostos bioativos. As membranas apresentaram alta concentração de compostos fenólicos, demonstrando que os compostos bioativos foram incorporados nas membranas. Isto foi possível observar através da análise determinação de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante, bem como da análise CLAE-DAD/UV-Vis do meio de cultura. Esta alta concentração de compostos bioativos permitiu que a membrana CB-MT tivesse um efeito inibitório contra *S. aureus* e CB-CV teve um efeito inibitório contra as bactérias gram-negativas *E. coli* e *S. aureus*. Na análise MIR-ATR, as membranas CB-MT e CB-CV apresentaram um novo pico em relação à membrana CB, que pode estar associada à incorporação dos compostos bioativos. É importante destacar que

Os espectros MIR-ATR e difratogramas de raios-X demonstraram que as membranas CB possuem uma estrutura básica independente da composição do meio de cultura. Paralelo a isso, a adição de colágeno ao meio de cultivo com mistura ternária foi responsável por melhorar as propriedades mecânicas da membrana CB-MT, cujas micrografias MEV já demonstravam uma estrutura mais espessa.

Em geral, os resultados demonstraram a eficácia das membranas CB-CV e CB-MT enriquecidas com compostos bioativos na promoção das propriedades antioxidantes e atividade antimicrobianas. Fatores estes, que tornam as membranas um produto de alto valor agregado e que são essenciais no favorecimento de oportunidades para a aplicação dessas membranas em alimentos, cosméticos, dispositivos médicos e embalagens ativas para alimentos. Este trabalho também abre novas perspectivas para futuras pesquisas que aprofundem o estudo do processo de metabolização pela *Gluconacetobacter xylinus* e bioissorção dos compostos bioativos pela CB.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTON, Q.A. (2013). *Eye Proteins—Advances in Research and Application*. Atlanta: Scholarly Editions, (Chapter 2).

AGBOBATINKPO, P.B.; THORSEN, L.; NIELSEN, D.S.; AZOKPOTA, P.; AKISSOE, N.; HOUNHOUIGAN, J.D.; JAKOBSEN, M. Biodiversity of aerobic endospore-forming bacterial species occurring in Yanyanku and Ikpiru, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa* used to produce food condiments in Benin. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v.163, n.2-3, p.231-238, 2013.

ALMEIDA, I.F.; PEREIRA, T.; SILVA, N.H.C.S.; GOMES, F.P.; SILVESTRE, A.J.D.; FREIRE, C.S.R.; LOBO, J.M.S.; COSTA, P.C. Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: An in vivo skin compatibility study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s.l.], v.86, n.3, p.332-336, 2014.

ASTM D638-14. **Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics**, ASTM International, West Conshohocken, Pensilvânia, 2014.

ATEF, M.; OJAGH, S.M. Health benefits and food applications of bioactive compounds from fish byproducts: A review. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v.35, p.673-681, 2017.

AZMAN, N.A.M.; PEIRÓ, S.; FAJARÍ, L.; JULIÀ, L.; ALMAJANO, M.P. Radical Scavenging of White Tea and Its Flavonoid Constituents by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v.62, n.25, p.5743-5748, 2014.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I.S.M.; RAHMAN, M.M.; SHARIF, K.M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M.H.A.; GHAFUOR, K.; NORULAINI, N.A.N.; OMAR, A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, [s.l.], v.117, p.426-436, 2013.

BAE, J.; KUMAZOE, M.; FUJIMURA, Y.; TACHIBANA, H. Diallyl disulfide potentiates anti-obesity effect of green tea in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity. **The Journal Of Nutritional Biochemistry**, [s.l.], v.64, p.152-161, 2019.

BARCIA, M.T.; PERTUZATTI, P.B.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GODOY, H.T.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Phenolic composition of grape and winemaking by-products of Brazilian hybrid cultivars BRS Violeta and BRS Lorena. **Food Chemistry**, [s.l.], v.159, p.95–105, 2014.

BASTIANETTO, S.; MÉNARD, C.; QUIRION, R. Neuroprotective action of resveratrol. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease**, [s.l.], v.1852, n. 6, p.1195-1201, 2015.

BIBLE, B.B.; SINGHA, S. Canopy position influences CIELAB coordinates of peach color. **HortScience**, [s.l.], v.28, n.10, p.992-993, 1993.

BILEK, S.E.; BAYRAM, S.K. Fruit juice drink production containing hydrolyzed collagen. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v.14, p.562-569, 2015.

BITENCOURT, R.G.; QUEIROGA, C.L.; DUARTE, G.H.B.; EBERLIN, M.N.; KOHN, L.K.; ARNS, C.W.; CABRAL, F.A. Sequential extraction of bioactive compounds from *Melia azedarach* L. in fixed bed extractor using CO<sub>2</sub>, ethanol and water. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [s.l.], v.95, p.355-363, 2014.

BLANCO, A.; MONTE, M.C.; CAMPANO, C.; BALEA, A.; MERAYO, N.; NEGRO, C. Nanocellulose for Industrial Use. **Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications**, [s.l.], [s.v], p.74–126, 2018.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, [s.l.], v.28, p.25-30, 1995.

BROWN, A.J. On an acetic ferment which forms cellulose. **Journal of the Chemical Society - Transactions**, [s.l.], v.49, p.432-439, 1886.

BURAN, J.T.; SANDHU, A.K.; LI, Z.; ROCK, C.R.; YANG, W.W.; GU, L. Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins and polyphenols from blueberries using macroporous adsorbent resins. **Journal of Food Engineering**, [s.l.], v.128, p.167–173, 2014.

BURKE, K. Interaction of vitamins C and E as better cosmeceuticals. **Dermatologic Therapy**, [s.l.], v.20, n.5, p.314-321, 2007.

CACICEDO, M.L.; CASTRO, M.C.; SERVETAS, I.; BOSNEA, L.; BOURA, K.; TSAFRAKIDOU, P.; DIMA, A.; TERPOU, A.; KOUTINAS, A.; CASTRO G.R. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. **Bioresource Technology**, [s.l.], v.213, p.172-180, 2016.

CAI, Z.J.; KIM, J. Preparation and characterization of novel bacterial cellulose/gelatin scaffold for tissue regeneration using bacterial cellulose hydrogel. **Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine**, [s.l.], v.1, p.021002 1-6, 2010.

CARVALHO, M.; JERÓNIMO, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; SILVA, B.M. Green tea: A promising anticancer agent for renal cell carcinoma. **Food Chemistry**, [s.l.], v.122, n.1, p.49-54, 2010.

CARRAHER, C.E. (2003). *Polymer Chemistry* (6th ed.). New York: Marcel Dekker, (Chapter 2).

CASAZZA, A.A.; ALIAKBARIAN, B.; MANTEGNA, S.; CRAVOTTO, G.; PEREGO, P. Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. **Journal of Food Engineering**, [s.l.], v.100, p.50–55, 2010.

CHÁVEZ-PACHECO, J.L.; MARTÍNEZ-YEE, S.; CONTRERAS-ZANTELLA, M.; ESCAMILLA-MARVÁN, E. Celulosa bacteriana em *Gluconacetobacter xilinum*: Biosíntesis y aplicaciones. **Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, [s.l.], v.7, n.1, p.18-25, 2004.

CHAWLA, P.R.; BAJAJ, I.B.; SURVASE, S.A.; SINGHAL, R.S. Microbial cellulose: fermentative production and applications, **Food Technology and Biotechnology**, [s.l.], v.47, n.2, p.107–124, 2009.

CZAJA, W.; KRYSZYŃCZAK, A.; BIELECKI, S.; BROWN, R.M. Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, [s.l.], v.27, n.2, p.145–151, 2006.

CLARK, A.G.; ROHRBAUGH, A.L.; OTTERNESS, I.; KRAUS, V.B. The effects of ascorbic acid on cartilage metabolism in guinea pig articular cartilage explants. **Matrix Biology**, [s.l.], v.21, n.2, p.175-184, 2002.

COMPAORÉ, C.S.; NIELSEN, D.S.; OUOBA, L.I.; BERNER, T.S.; NIELSEN, K.F.; SAWADOGO-LINGANIN, H.; DIAWARA, B.; OUÉDRAOGO, G.A.; JAKOBSEN, M.; THORSEN, L. Co-production of surfactin and a novel bacteriocin by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* H4 isolated from Bikalga, an African alkaline *Hibiscus sabdariffa* aseed fermented condiment. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l.], v.162, n.3, p.297–307, 2013.

COSTA, R.; SANTOS, L. Delivery systems for cosmetics - From manufacturing to the skin of natural antioxidants. **Powder Technology**, [s.l.], v.322, p.402-416, 2017.

COSTA, F.; SILVA, B.; TAVARES, T. Biofilm Bioprocesses. In: LARROCHE, C.; SANROMA'N, M. A.; DU, G.; PANDEY, A. (Ed). **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Bioprocesses, Bioreactors and Controls**. Cambridge: Elsevier, p.143-175, 2017.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, p.1250-1318, 2000.

DA-COSTA-ROCHA, I.; BONNLAENDER, B.; SIEVERS, H.; PISCHEL, I.; HEINRICH, M. *Hibiscus sabdariffa* L. – A phytochemical and pharmacological review. **Food Chemistry**, [s.l.], v.165, p.424-443, 2014.

DAFALLAH, A.A.; AL-MUSTAFA, Z. Investigation of the antiinflammatory activity of *Acacia nilotica* and *Hibiscus sabdariffa*. **The American Journal of Chinese Medicine**, [s.l.], v.24, p.263-269, 1996.

DAMIANI, E.; BACCHETTI, T.; PADELLA, L.; TIANO, L.; CARLONI, P. Antioxidant activity of different white teas: Comparison of hot and cold tea infusions. **Journal Of Food Composition And Analysis**, [s.l.], v.33, n.1, p.59-66, 2014.

DENIS, A.; BRAMBATI, N.; DESSAUVAGES, B.; GUEDJ, S.; RIDOUX, C.; MEFFRE, N.; AUTIER, C. Molecular weight determination of hydrolyzed collagens. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v.22, p.989-994, 2008.

DHAR, P.; KAR, C. S.; OJHA, D.; PANDEY, S. K.; MITRA, J. Chemistry, phytotechnology, pharmacology and nutraceutical functions of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) and roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed oil: An overview. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v.77, p.323-332, 2015.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces, **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v.8, n.9, p.881-890, 2002.

DOURADO, F.; RYNGAJLLO, M.; JEDRZEJCZAK-KRZEPKOWSKA, M.; BIELECKI, S.; GAMA, M. Taxonomic Review and Microbial Ecology in Bacterial NanoCellulose Fermentation. In: GAMA, M.; DOURADO, F.; BIELECKI, S. (Ed). **Bacterial Nanocellulose: from Biotechnology to Bio-Economy**, Cambridge: Elsevier, p.20-34, 2016.

DOURADO, F.; LEAL, M.; MARTINS, D.; FONTÃO, A.; RODRIGUES, A.C.; GAMA, M. Celluloses as Food Ingredients/Additives: Is There a Room for BNC?. In: GAMA, M.; DOURADO, F.; BIELECKI, S. (Ed). **Bacterial Nanocellulose: from Biotechnology to Bio-Economy**, Cambridge: Elsevier, p.142-151, 2016.

DU, R.; ZHAO, F.; PENG, Q.; ZHOU, Z.; HAN, Y. Production and characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* isolated from Chinese persimmon vinegar. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.] v.194, p.200-207, 2018.

EL-SAIED H.; BASTA, A.H.; GOBRAN, R.H. Research progress in friendly environmental technology for the production of cellulose products (bacterial cellulose and its application). **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, [s.l.], v.43, p.797-820, 2004.

ENKO, J.; GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, A. Influence of the interactions between tea (*Camellia sinensis*) extracts and ascorbic acid on their antioxidant activity: analysis with interaction indexes and isobolograms. **Food Additives & Contaminants: Part A**, [s.l.], v.32, p.1234-1242, 2015

FARHADI, K.; ESMAEILZADEH, F.; HATAMI, M.; FOROUGH, M.; MOLAIE, R. Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in West Azarbaijan province, Iran. **Food Chemistry**, [s.l.], v.199, p.847-855, 2016.

FECHTNER, S.; SINGH, A.; CHOURASIA, M.; AHMED, S. Molecular insights into the differences in anti-inflammatory activities of green tea catechins on IL-1 $\beta$  signaling in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [s.l.], v.329, p.112-120, 2017.

FERNÁNDEZ-AGULLÓ, A.; FREIRE, M.S.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, J. Effect of the extraction technique on the recovery of bioactive compounds from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) wood industrial wastes. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v.64, p.105-113, 2015.

FONTANA, J.D.; SOUZA, A.M.; TORRIANI, I.; MORESCHI, J.C. GALLOTTI, B.J.; NARCISO, G.P., et al. Nature of plant stimulators in the production of *Acetobacter xylinum* (-tea fungus-) biofilm used in skin therapy. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s.l.], v. 28-29, p. 341-351, 1991.

FRIEDMAN, M.; KIM, S.Y.; LEE, S.J.; HAN, G.P.; HAN, J.S.; LEE, K.R.; KOZUKUE, N. Distribution of Catechins, Theaflavins, Caffeine, and Theobromine in 77 Teas Consumed in the United States. **Journal Of Food Science**, [s.l.], v.70, n.9, p.550-559, 2005.

GAO, C.; XIONG, G.Y.; LUO, H.L.; REN, K.J.; HUANG, Y.; WAN, Y.Z. Dynamic interaction between the growing Ca-P minerals and bacterial cellulose nanofibers during early biomineralization process. **Cellulose**, [s.l.], v.17, n.2, p.365-373, 2009.

GARCIA, D. M. **Análise de Atividade de água em alimentos armazenados no interior de granjas de integração avícola**. 50 f. Dissertações (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do sul - UFRGS, Porto Alegre, 2004.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; MONTERO, M.P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v.25, n.8, p.1813-1827, 2011.

GONDOIN, A.; GRUSSU, D.; STEWART, D., MCDUGALLI, G.J. White and green tea polyphenols inhibit pancreatic lipase *in vitro*. **Food Research International**, [s.l.], v.43, p.1537-1544, 2010.

GUILLERMINET, F.; BEAUPIED, H.; FABIEN-SOULÉ, V.; TOMÉ, D.; BENHAMOU, C-L.; ROUX, C.; BLAIS, A. Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: An *in vitro* and *in vivo* study. **Bone**, [s.l.], v.46, n.3, p.827-834, 2010.

HAMINIUK, C.W.I.; SIERAKOWSKI, M.-R.; BRANCO, I.G.; MACIEL, G.M.; MASSON, M.L. Rheological study of ternary mixtures and pectic gels of red fruit pulps. **International Journal of Food Science & Technology**, [s.l.], v.42, p.629–639, 2007.

HAMINIUK, C.W.I.; MACIEL, G.M.; PLATA-OVIEDO, S.V.; PERALTA, R.M. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science & Technology**, [s.l.], v.47, n.10, p.2023-2044, 2012.

HAZRA, A.; DASGUPTA, N.; SENGUPTA, C.; DAS, S. Next generation crop improvement program: Progress and prospect in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). **Annals Of Agrarian Science**, [s.l.], v.16, n.2, p.128-135, 2018.

HOLSER, R.A.; BOST, G.; VAN BOVEN, M. Phytosterol composition of hybrid *Hibiscus* seed oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v.52, p.2546–2548, 2004.

HUTCHENS, S.A.; LEON, R.V.; O'NEILL, H.M.; EVANS, B.R. Statistical analysis of optimal culture conditions for *Gluconacetobacter hansenii* cellulose production. **Letters in Applied Microbiology**, [s.l.], v.44, n.2, p.175–180, 2007.

ISLAM, M.U.; ULLAH, M.W.; KHAN, S.; SHAH, N.; PARK, J.K. Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v.102, p.1166–1173, 2017.

JARA-PALACIOS, M.J.; HERNANZ, D.; CIFUENTES-GOMEZ, T.; ESCUDERO-GILETE, M.L.; EREDIA, F.J.; SPENCER, J.P.E. Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. **Food Chemistry**, [s.l.], v.183, p.78-82, 2015.

JEON, J.H.; OH, I.K.; KEE, C.D.; KIM, S.J. Bacterial cellulose actuator with electrically driven bending deformation in hydrated condition. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [s.l.], v.146, p.307–313, 2010.

JIANG, H.; ENGELHARDT, U.H.; THRÄNE, C.; MAIWALD, B.; STARK, J. Determination of flavonol glycosides in green tea, oolong tea and black tea by UHPLC compared to HPLC. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 83, p.30–35, 2015.

JONAS, R.; FARAH, L.F. Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, [s.l.], v.59, p.101-106, 1998.

KAMTHAI, S.; MAGARAPHAN, R. Thermal and mechanical properties of polylactic acid (PLA) and bagasse carboxymethyl cellulose (CMCB) composite by adding isosorbide diesters. **Aip Conference Proceedings**, [s.l.], v.1664, n.1, 0600061-0600065, 2015.

KAPRASOB, R.; KERDCHOECHUEN, O.; LAOHAKUNJIT, N.; SARKAR, D.; SHETTY, K. Fermentation-based biotransformation of bioactive phenolics and volatile compounds from cashew apple juice by select lactic acid bacteria. **Process Biochemistry**, [s.l.], v.59, p.141-149, 2017.

KASTURE, V.S.; CHOPDE, C.T.; DESHMUKH, V.K. Anticonvulsive activity of *Albizia lebeck*, *Hibiscus rosa sinesis* and *Butea monosperma* in experimental animals. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v.71, n.1-2, p.65-75, 2000.

KESHK, S.M.A.S.; SAMESHIMA, K. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. **African Journal of Biotechnology**, [s.l.], v.4, n.6, p.478–482, 2005.

KESHK, S.M.A.S.; SAMESHIMA, K. The utilization of sugar cane molasses with/without the presence of lignosulfonate for the production of bacterial cellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v.72, n.2, p.291–296, 2006.

KESHK, S.M.A.S. Vitamin C enhances bacterial cellulose production in *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v.99, p.98-100, 2014.

KIM, Y.J.; HOUNG, S-J.; IM, J.H.; KIM, Y-R.; JI, H.G.; LEE, S-J. Nanoemulsified green tea extract shows improved hypocholesterolemic effects in C57BL/6 mice. **The Journal Of Nutritional Biochemistry**, [s.l.], v.23, n.2, p.186-191, 2012.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.P.; BOHN, A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.], v.44, p.3358–3393, 2005.

KRIS-ETHERTON, P.M.; HECKER, K.D.; BONANOME A.; COVAL, S.M.; BINKOSKI, A.E.; HILPERT, K.F.; GRIEL, A.E.; ETHERTON, E.D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal Of Medicine**, [s.l.], v.113, n.9, p.71-88, 2002.

KOMES, D.; HORŽIĆ, D.; BELŠČAK, A.; GANIĆ, K.K.; VULIĆ, I. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. **Food Research International**, [s.l.], v.43, p.167–176, 2010.



KONICA MINOLTA SENSING. Disponível em: <<http://sensing.konicaminolta.com.mx/2014/09/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lab/>>. Acesso em: 13 nov. 2018.

KURODA, Y.; HARA, Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, [s.l.], v.436, n.1, p.69-97, 1999.

KURŠVIETIENĖ, L.; STANEVIČIENĖ, I.; MONGIRDIENĖ, A.; BERNATONIENĖ, J. Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. **Medicina**, [s.l.], v.52, n.3, p.148-155, 2016.

LAGOS, J.B.; VARGAS, F.V.; OLIVEIRA, T.G.; MAKISHI, G.L.A.; SOBRAL, P.J.A. Recent patents on the application of bioactive compounds in food: a short review. **Current Opinion In Food Science**, [s.l.], v.5, p.1-7, 2015.

LI, H.; HUNEALULT, M.A. Effect of nucleation and plasticization on the crystallization of poly(lactic acid). **Polymer**, [s.l.], v.48, n.23, p.6855-6866, 2007.

LIAO, J.; ANCHUN, M.; ZHU, Z.; QUAN, Y. Antibacterial titanium plate deposited by silver nanoparticles exhibits cell compatibility. **International Journal of Nanomedicine**, [s.l.], v.5, p.337-342, 2010.

LIU, Y.; LUO, L.; LIAO, C.; CHEN, L.; WANG, J.; ZENG, L. Effects of brewing conditions on the phytochemical composition, sensory qualities and antioxidant activity of green tea infusion: A study using response surface methodology. **Food Chemistry**, [s.l.], v.269, p.24-34, 2018.

LOPES, T.D.; RIEGEL-VIDOTTI, I.C.; GREIN, A.; TISCHER, C.A.; FARIA-TISCHER, P.C. de S. Bacterial cellulose and hyaluronic acid hybrid membranes: Production and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v.67, p.401-408, 2014.

LÓPEZ, V.; CALVO, M.I. White Tea (*Camellia sinensis Kuntze*) Exerts Neuroprotection against Hydrogen Peroxide-Induced Toxicity in PC12 Cells. **Plant Foods For Human Nutrition**, [s.l.], v.66, n.1, p.22-26, 2011.

MACHADO, A.; LIRIA, C.W.; PROTI, P.B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M.T.M. Miranda. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, [s.l.], v.27, n.5, p.781-789, 2004

MAGANHA, E.G.; HALMENSCHLAGER, R.C.; ROSA, R.M.; HENRIQUES, J.A. P.; RAMOS, A.L.L.P.; SAFFI, J. Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*. **Food Chemistry**, [s.l.], v.118, n.1, p.1-10, 2010.

MAO, J.T. White Tea: The Plants, Processing, Manufacturing, and Potential Health Benefits. In: PREEDY, V. (Ed). **Tea In Health And Disease Prevention**, London: Academic Press, p.33-40, 2013.

MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in foods. In: MARKAKIS, P. (Ed.) **Anthocyanins as Food Colors**. New York: Academic Press, p.163-180, 1982

MARCHESE, A.; COPPO, E.; SOBOLEV, A.P.; ROSSI, D.; MANNINA, L.; DAGLIA, M. Influence of in vitro simulated gastroduodenal digestion on the antibacterial activity, metabolic profiling and polyphenols content of green tea (*Camellia sinensis*). **Food Research International**, [s.l.], v.63, p.182-191, 2014.

MASAOKA, S.; OHE T.; SAKOTA, N. Production of cellulose from *Acetobacter xylinum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, [s.l.], v.75, n.1, p.18–22, 1993.

MATSUMOTO, S.H.; OHARA, S.H.; NAKAJIMA, N.T.; SUGIHARA, O.F.; TAKAHASHI, N.H. **Collagen peptide composition and food or beverage containing the same**. US 2010/0068342 A1, 15 Nov. 2007, 18 Mar. 2010.

MELLO, L.R.; FELTRIN, L.T.; NETO, P.T.F.; FERRAZ, F.A.P.J. Duraplasty with biosynthetic cellulose: An experimental study. **Journal of Neurosurgery**, [s.l.], v.86, n.1, p.143-150, 1997.

MAREČEK, V.; MIKYŠKA, A.; HAMPEL, D.; ČEJKA, P.; NEUWIRTHOVÁ, J.; MALACHOVÁ, A., et al. ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. **Journal of Cereal Science**, [s.l.], v.73, p.40–45, 2017.

MGBEAHURUIKE, E.; YRJÖNEN, T.; VUORELA, H.; HOLM, Y. Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on Piper species. **South African Journal Of Botany**, [s.l.], v.112, p.54-69, 2017.

MIKKELSEN, D.; FLANAGAN, B.M.; DYKES, G.A.; GILDLEY, M.J. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v.107, n.2, p.576–583, 2009.

MOSKOWITZ, R.W. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. **Seminars In Arthritis And Rheumatism**, [s.l.], v.30, n.2, p.87-99, 2000.

MOUMITA, S.; DAS, B.; SUNDARAY, A.; SATPATHI, S.; THANGARAJ, P.; MARIMUTHU, S.; JAYABALAN, R. Study of soy-fortified green tea curd formulated using potential hypocholesterolemic and hypotensive probiotics isolated from locally made curd. **Food Chemistry**, [s.l.], v.268, p.558-566, 2018.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, [s.l.], v.43, n.2, p.134-179, 2008.

MUKHTAR, H.; KATIYAR, S.K.; AGARWAL, R. Green Tea and Skin—Anticarcinogenic Effects. **Journal of Investigative Dermatology**, [s.l.], v.102, n.1, p.3-7 1994.

NATARAJAN, S.B.; HWANG, J-W.; KIM, Y-S.; KIM, E-K.; PARK, P-J. Ocular promoting activity of grape polyphenols—A review. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v.50, p.83-90, 2017.

OIKAWA, T.; MORINO, T.; AMEYAMA, M. Production of cellulose from D-arabitol by *Acetobacter xylinum* Ku-1. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, [s.l.], v.59, n.8, p.1564–1565, 1995.

OIKAWA, T.; OHTORI, T.; AMEYAMA, M. Production of cellulose from D-mannitol by *Acetobacter xylinum* Ku-1. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, [s.l.], v.59, n.2, p.331–332, 1995.

OLYVEIRA, L.M.; COSTA, L.M.M.; RICCARDI, C.S.; SANTOS, M.L.; DALTRO, P.B.; BASMAJI, P.; DALTRO, G.C.; GUASTALDI, A.C. Bacterial cellulose for advanced medical materials. In: GRUMEZESCU, A.M. (Ed). **Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering: Applications of Nanobiomaterials**. Cambridge: Elsevier, p.57-82, 2016.

PAGNO, C.H.; COSTA, T.M.H.; MENEZES, E.W.; BENVENUTTI, E.V.; HERTZ, P.F.; MATTE, C.R.; TOSATI, J.V.; MONTEIRO, A.R.; RIOS, A.O.; FLÔRES, S.H. Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity. **Food Chemistry**, [s.l.], v.173, p.755-762, 2015.

PARK, J.K.; JUNG, J.Y.; KHAN, T. Bacterial cellulose. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P.A. (Ed). **Handbook of Hydrocolloids**, New York: CRC Press, 2. ed., p.725-739, 2009.

PATEL, S. *Hibiscus sabdariffa*: An ideal yet under-exploited candidate for nutraceutical applications. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, [s.l.], v.4, n.1, p.23-27, 2014.

PAUL, R.; ADZET, J.P.; BROUTA-AGNÉSA, M.; BALSELLS, S.; ESTEVE, H. Hydrolyzed collagen: A novel additive in cotton and leather dyeing. **Dyes And Pigments**, [s.l.], v.94, n.3, p.475-480, 2012.

PAULA, J.T.; PAVIANI, L.C.; FOGLIO, M.A.; SOUSA, I.M.O.; DUARTE, G. H. B.; JORGE, M.P.; EBERLIN, M.N.; CABRAL, F.A. Extraction of anthocyanins and luteolin from *Arrabidaea chica* by sequential extraction in fixed bed using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [s.l.], v.86, p.100-107, 2014.

PECORARO, E.; MANZANI, D.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S.J.L. Bacterial Cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: Preparation, Properties and Applications. In. BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. (Ed). **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. Cambridge: Elsevier, p.369–383, 2008.

PICHETH, G.F.; PIRICH, C.L.; SIERAKOWSKI, M.R.; WOWHL, M.A.; SAKAKIBARA, C.N.; SOUZA, C.F.; MARTINA, A.A.; SILVA, R.; FREITAS, R.A. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v.104, p.97-106, 2017.

PIMENTEL-MORAES, S.; BORRÁS-LINARES, I.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; MARTÍNEZ-FÉREZ, A.; SEGURA-CARRETERO, A. Microwave-assisted extraction for *Hibiscus sabdariffa* bioactive compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s.l.], v.156, p.313-322, 2018.

PINELO, M.; ARNOUS, A.; MEYER, A. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. **Food Science & Technology**, [s.l.], v.17, p.579-590, 2006.

PLACKETT, R.L.; BURMAN, J.P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, [s.l.], v.33, p.305–325, 1946.

POURRAMEZAN, G.Z.; ROAYAEI, A.M.; QEZELBASH, Q.R. Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter* sp. 4B-2. **Biotechnology**, [s.l.], v.8, n.1, p.150–154, 2009.

RAMANA, K.V.; TOMAR, A.; SINGH, L. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, [s.l.], v.16, n.3, p.245–248, 2000.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, [s.l.], v.26, p.1231-1237, 1999.

REN, Q.; XING, H.; BAO, Z.; SU, B.; YANG, Q.; YANG, Y.; ZHANG, Z. Recent Advances in Separation of Bioactive Natural Products. **Chinese Journal Of Chemical Engineering**, [s.l.], v.21, n.9, p.937-952, 2013.

RHIM, J.W.; PARK, H.M.; HA, C.S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, [s.l.], v.38, n.10-11, p.1629–1652, 2013.

ROCKENBACH, I.I.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L.V.; CALIARI, V.; GENOVESE, M.I.; GONÇALVES, A.E.S.S.; FETT, R. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis Labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, [s.l.], v.127, p.174-179, 2011.

RODRIGUES, M.J.; NEVES, V.; MARTINS, A.; RAUTER, A.P.; NENG, N.R.; NOGUEIRA, J.M.F.; VARELA, J.; BARREIRA, L.; CUSTÓDIO, L. In vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of Limonium algarvense flowers' infusions and decoctions: A comparison with green tea (*Camellia sinensis*). **Food Chemistry**, [s.l.], v.200, p.322-329, 2016.

RÖMLING, U.; GALPERIN, M.Y. Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. **Trends In Microbiology**, [s.l.], v.23, n.9, p.545-557, 2015.

RONCHETTI, I.P.; QUAGLINO, D.J.; BERGAMINI, G. Ascorbic acid and connective tissue. In: HARRIS, J.R. (Ed). **Subcellular Biochemistry: Ascorbic Acid: Biochemistry and Biomedical Cell Biology**. London: Plenum Press, v.25, p.249-264, 1996.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiological Reviews**, [s.l.] v.55, p.35–58, 1991.

ROSSI, M.; PASSERI, D.; SINIBALDI, A.; ANGJELLARI, M.; TAMBURRI, E., SORBO, A., et al. Nanotechnology for Food Packaging and Food Quality Assessment. **Advances in Food and Nutrition Research**, [s.l.], [s.v.], p.149–204, 2017.

RUBIO, J.; TESSELE, F. Processos para o tratamento de efluentes na mineração. In: LUZ, A.B.; SAMPAIO, J.A.; ALMEIDA, S.L.M. (Ed). **Tratamento de Minérios**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, p.657-659, 2002.

RUKA, D.R.; SIMON, G.P.; DEAN, K.M. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v.89, n.2, p.613-622, 2012.

SACHDEWA, A.; KHEMANI, L.D. Effect of *Hibiscus rosa-sinensis* ethanol flower extract on blood glucose and lipid profile in streptozotocin induced diabetes in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v.89, p.61–66, 2003.

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

SALAS, E.; FULCRAND, H.; MEUDEC, E.; CHEYNIER, V. Reactions of anthocyanins and tannins in model solutions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v.51, p.7951-7961, 2003.

SÁNCHEZ, J.A.; NAVARRO, C.F.; BUSQUETS, J.J.; RIURO, M.J.; RIURO, F.J.; GIL, G.E.; BAÑOS, J.M. **Hidrolizado enzimático de colágeno y procedimiento de obtención**. WO2008049942, 2008.

SANTANA-RIOS, G.; ORNER, G.A.; AMANTANA, A.; PROVOST, C.; WU, S.Y.; DASHWOOD, R.H. Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the Salmonella assay. **Mutation Research**, [s.l.], v.495, p.61-74, 2001.

SCHRAMM, M.; HESTRIN, S. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. **Journal of General**

**Microbiology**, [s.l.], v.11, p.123-129, 1954.

SCOTT, W.J. Water relation of food spoilage microorganisms. **Advances in Food Research**, [s.l.], v.7, p.83-127, 1957.

SERRAME, E.; LIM SYLIANCO, C.Y., Anti-tumour promoting activity of decoctions and expressed juices from Philippine medicinal plants. **Philippine Journal of Science**, [s.l.], v.124, p.275–281, 1995.

SHAH, N.; UL-ISLAMA, M.; KHATTAKA, W.A.; PARKA, J.K. Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v.98, n.2, p.1585-1598, 2013.

SHI, Z.; ZHANG, Y.; PHILLIPS, G.O.; YANG, G. Utilization of bacterial cellulose in food. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v.35, p.539-545, 2014.

SHIBUYA, S.; OZAWA, Y.; TODA, T.; WATANABE, K.; TOMETSUKA, C.; OGURA, T.; KOYAMA, Y-C.; SHIMIZU, T. Collagen peptide and vitamin C additively attenuate age-related skin atrophy in Sod1-deficient mice. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [s.l.], v.78, n.7, p.1212-1220, 2014.

SILVA, L.R.; QUEIROZ, M. Bioactive compounds of red grapes from Dão region (Portugal): Evaluation of phenolic and organic profile. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [s.l.], v.6, n.4, p.315-321, 2016.

SINGLETON, V.L.; ROSSI JR., J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, [s.l.], v.16, p.144–158, 1965.

SKROZA, D.; MEKNIĆ, I.G.; SVILOVIĆ, S.; ŠIMAT, V.; KATALINIĆ, V. Investigation of the potential synergistic effect of resveratrol with other phenolic compounds: A case of binary phenolic mixtures. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s.l.], v.38, p.13-18, 2015.

SÖHLE, J.; KNOTT, A.; HOLTZMANN, U.; SIEGNER, R.; GRÖNNIGER, E.; SCHEPKY, A.; GALLINAT, S.; WENCK, H.; STÄB, F.; WINNEFELD, M. White Tea extract induces lipolytic activity and inhibits adipogenesis in human subcutaneous (pre)-adipocytes. **Nutrition & Metabolism**, [s.l.], v.6, n.20, não paginado, 2009.

SUKHTEZARI, S.; ALMASI, H.; PIRSA, S.; ZANDI, M.; PIROUZIFARD, M. Development of bacterial cellulose based slow-release active films by incorporation of *Scrophularia striata* Boiss. extract, **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v.156, p.340-350, 2017.

TABUCHI, M. Nanobiotech versus synthetic nanotech?. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v.25, n.4, p.389-390, 2007.

TAN, J.; ENGELHARDT, U.; LIN, Z.; KAISER, N.; MAIWALD, B. Flavonoids, phenolic acids, alkaloids and theanine in different types of authentic Chinese

white tea samples. **Journal Of Food Composition And Analysis**, [s.l.], v.57, p.8-15, 2017.

TANAKA, M.; KOYAMA, Y-I.; NOMURA, Y. Effects of Collagen Peptide Ingestion on UV-B-Induced Skin Damage. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [s.l.], v.73, n.4, p.930-932, 2009.

TENORE, G.C.; STIUSO, P.; CAMPIGLIA, P.; NOVELLINO, E. *In vitro* hypoglycaemic and hypolipidemic potential of white tea polyphenols. **Food Chemistry**, [s.l.], v.141, n.3, p.2379-2384, 2013.

THIRUVENGADAM, V.; VITTA, S. Ni–bacterial cellulose nanocomposite; a magnetically active inorganic–organic hybrid gel. **Rsc Advances**, [s.l.], v. 3, n. 31, p.12765-12773, 2013.

THRING, T.S.; HILI, P.; NAUGHTON, D.P. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v.9, n.1, não paginado, 2009.

TOURNOUR, H.H.; SEGUNDO, M.A.; MAGALHÃES, L.M.; BARREIROS, L.; QUIROZ, J.; CUNHA, L.M. Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v.74, p.397-406, 2015.

TRAIKOVICH, S.S. Use of Topical Ascorbic Acid and Its Effects on Photodamaged Skin Topography. **Archives Of Otolaryngology–head & Neck Surgery**, [s.l.], v.125, n.10, p.1091-1098, 1999.

TSAI, H-Y.; HO, C-T.; CHEN, Y-K. Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene. **Journal Of Food And Drug Analysis**, [s.l.], v. 25, n.1, p.134-147, 2017.

TSENG, T.H.; KAO, E.S.; CHU, C.Y., CHOU, F.P.; LIN WU, W.; WANG, C.J. Protective effects of dried flower extract of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v.35, p.1159–1164, 1997.

ULLAH, H.; WAHID, F.; SANTOS, H.A. KHAN, T. Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites, **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v.150, p.330–352, 2016.

VIEIRA, D.C.M.; SENNA, B.T.G.; ISHII, M.; PENNA, T.C.V. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and *Saccharomyces cerevisiae* in green tea leaves and fruits juice medium. **Asian Journal of Pharmaceutical and Health Sciences**, [s.l.], v.3, n.2, p.690-698, 2013.

VIEILLE, B.; AUCHER, J.; TALETB, L. Influence of temperature on the behavior of carbon fiber fabrics reinforced PPS laminates. **Materials Science and Engineering A**, [s.l.], v.517, n.1-2, p.51-60, 2009.

WALLE, T.; VINCENT, T.S.; WALLE, U.K. Evidence of covalent binding of the dietary flavonoid quercetin to DNA and protein in human intestinal and hepatic cells. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v.65, n.10, p.1603-1610, 2003.

WELTI-CHANES, J.; VERGARA, F. Actividad de agua: Concepto y aplicación en alimentos con alto contenido de humedad. In: AGUILERA, J.M. **Temas en Tecnología de Alimentos**. Santiago de Chile: Universidade de Santiago de Chile, p.11-26, 1997.

XU, Y.Q.; ZHANG, Y.; CHEN, J.; WANG, F.; DU, Q.; YIN, J. Quantitative analyses of the bitterness and astringency of catechins from green tea. **Food Chemistry**, [s.l.], v.258, p.16-24, 2018.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.-i.; ISHIKAWA, T. The Phylogeny of Acetic Acid Bacteria Based on the Partial Sequences of 16S Ribosomal RNA: The Elevation of the Subgenus *Gluconoacetobacter* to the Generic Level. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [s.l.], v.61, n.8, p.1244-1251, 1997.

YIM, S.M.; SONG, J.E.; KIM, H.R. Production and characterization of bacterial cellulose fabrics by nitrogen sources of tea and carbon sources of sugar. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 59, p.26-36, 2017.

YOUSUF, B.; GUL, K.; WANI, A.A.; SINGH, P. Health Benefits of Anthocyanins and Their Encapsulation for Potential Use in Food Systems: A Review. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [s.l.], v.56, n.13, p.2223-2230, 2015.

ZAETS, I.; PODOLICH, O.; KUKHARENKO, O.; RESHETNYAK, G.; SHPYLOVA, S.; SOSNIN, et al. Bacterial cellulose may provide the microbial-life biosignature in the rock records. **Advances in Space Research**, [s.l.], v.53, n.5, p.828–835, 2014.

ZAGUE, V. A new view concerning the effects of collagen hydrolysate intake on skin properties. **Archives Of Dermatological Research**, [s.l.], v.300, n.9, p.479-483, 2008.

ZAGUE, V.; FREITAS, V.; ROSA, M.C.; CASTRO, G.A.; JAEGER, R.G.; MACHADO-SANTELLI, G.M. Collagen Hydrolysate Intake Increases Skin Collagen Expression and Suppresses Matrix Metalloproteinase 2 Activity. **Journal Of Medicinal Food**, [s.l.], v.14, n.6, p.618-624, 2011.

ZENG, X.; SMALL, D.P.; WAN, W. Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 85, n.3, p.506-513, 2011.

ZHANG, X.; ZHANG, M.; HO, C-T.; GUO, X.; WU, Z.; WENG, P.; YAN, M.; CAO, J. Metagenomics analysis of gut microbiota modulatory effect of green tea polyphenols by high fat diet-induced obesity mice model. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v.46, p.268-277, 2018.



ZHUANG, X.P.; LU, Y.Y.; YANG, G.S. Extraction and determination of flavonoid in ginkgo. **Chinese Herbal Medicine**, [s.l.], v.23, p.122-124, 1992.