

Sistema FIEB



PELO FUTURO DA INOVAÇÃO

*Biossíntese de celulose bacteriana a partir de
Gluconacetobacter hansenii e aplicação no
desenvolvimento de biomateriais: caracterização e
avaliação das propriedades*

Silmar Baptista Nunes

Sistema FIEB



CENTRO UNIVERSITÁRIO SENAI CIMATEC
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
GESTÃO E TECNOLOGIA INDUSTRIAL

Silmar Baptista Nunes

***Biossíntese de celulose bacteriana a partir de
Gluconacetobacter hansenii e aplicação no desenvolvimento
de biomateriais: caracterização e avaliação das propriedades***

Tese de Doutorado

Salvador, 2022

SILMAR BAPTISTA NUNES

***Biossíntese de celulose bacteriana a partir de
Gluconacetobacter hansenii e aplicação no desenvolvimento
de biomateriais: caracterização e avaliação das propriedades***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu do
Centro Universitário SENAI CIMATEC como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor em GESTÃO E TECNOLOGIA INDUSTRIAL.

Orientadora: Prof^a Dr^a Bruna Aparecida Souza Machado

Coorientadora: Prof^a Dr^a Josiane Dantas Viana Barbosa

Salvador, 2022

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Centro Universitário SENAI CIMATEC

N972e Nunes, Silmar Baptista

Biossíntese de celulose bacteriana a partir de *Gluconacetobacter hansenii* e aplicação no desenvolvimento de biomateriais: caracterização e avaliação das propriedades / Silmar Baptista Nunes. – Salvador, 2022.

103 f. : il. color.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Bruna Aparecida Souza Machado.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Josiane Dantas Viana Barbosa.

Tese (Doutorado em Gestão e Tecnologia industrial) – Programa de Pós-Graduação, Centro Universitário SENAI CIMATEC, Salvador, 2022.

Inclui referências.

1. Celulose Bacteriana. 2. Montmorillonita. 3. Amido. 4. colágeno. 5. Glicerol. 6. polímeros biodegradáveis I. Centro Universitário SENAI CIMATEC. II. Machado, Aparecida Souza. III. Barbosa, Josiane Dantas Viana.

CDD 574.192

Silmar Baptista Nunes

Biossíntese de celulose bacteriana a partir de *Gluconacetobacter hansenii* e aplicação no desenvolvimento de biomateriais: caracterização e avaliação das propriedades

Aprovado em ____ de _____ de 2022.

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Bruna Aparecida Souza Machado - Orientadora

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Sergipe
Professora Titular vinculada ao Centro Universitário SENAI CIMATEC

Prof^a Dr^a Josiane Dantas Viana Barbosa

Doutora em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Campina Grande
Professora vinculada ao Centro Universitário SENAI CIMATEC

Prof^a Dr^a Joyce Batista Azevedo

Doutora em Ciências de Materiais pela Universidade Federal de Campina Grande
Professora vinculada ao Centro Universitário SENAI CIMATEC

Prof^a Dr^a Fernando Luiz Pellegrini Pessoa

Doutor em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro
Professor titular vinculado ao Centro Universitário SENAI CIMATEC

Prof^a Dr^a Cintia Silva Minafra e Rezende

Doutora em Ciência Animal pela Universidade Federal de Goiás
Professora da Universidade Federal de Goiás

Prof^a Dr^a Jania Betania Alves da Silva

Doutora em Engenharia Química pela Universidade Federal da Bahia
Professora da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Dedico este trabalho aos meus pais, Victor e Teresa, tanto amor e esforço para chegar nesse momento. Aos meus filhos, João Victor e João Lucas, e minha esposa, Cassiane, maiores incentivadores para não desanimar nos momentos de fraqueza e proporcionar muita felicidade ao longo desses anos.

Agradecimentos

A Deus, a quem entreguei todos os meus projetos.

Aos meus pais, por sempre terem acreditado e apoiado todas as minhas escolhas e decisões ao longo da minha trajetória.

Aos meus filhos João Victor e João Lucas, por serem a minha principal fonte de inspiração.

A minha esposa Cassiane, por ser a companheira de todos os momentos; por me inspirar a prosseguir e buscar sempre mais, seja através de um simples gesto carinhoso, seja pelo apoio e ajuda na elaboração desse trabalho.

À orientadora e amiga Prof^a. Dr^a. Bruna Machado, pela orientação, pelo apoio, pela inspiração e amizade no transcorrer da pesquisa, bem como pela oportunidade de realizar o trabalho nesta área.

A Prof. Dr^a. Josiane Dantas, meu sincero agradecimento pela confiança, estímulo e conhecimento transmitidos.

Aos meus irmãos, Tere e Júnior, pelo companheirismo, amizade e apoio que serviram de estímulo para eu prosseguir.

Ao Prof. Dr. Leone Andrade, pela motivação a iniciar esse grande desafio.

Aos colegas do trabalho do SENAI CIMATEC: pela amizade, ajuda, compreensão e disponibilidade.

A toda equipe do laboratório por toda ajuda, atenção e colaboração na realização das atividades para o desenvolvimento do trabalho, em especial a Katharine Hodel e Fabricia Oliveira.

Ao SENAI CIMATEC, pela disponibilidade do espaço físico e apoio financeiro para realizar a pesquisa.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Resumo

Nos últimos anos a celulose bacteriana (CB) tem sido objeto de muitas pesquisas pelo alto potencial de aplicação em áreas como biomedicina ou materiais, bem como, devido a sua biossíntese ser ambientalmente correta. A CB é caracterizada como um homopolímero e diferencia-se da celulose vegetal por suas propriedades, destacando-se principalmente a biocompatibilidade e biodegradabilidade dos materiais produzidos. A produção de compósitos de CB com diversos polímeros é um método efetivo para melhorar suas propriedades físicas, químicas e estruturais. Dentro desse contexto, o objetivo deste trabalho foi produzir CB e aplicar no desenvolvimento de biomateriais, caracterizando e avaliando suas propriedades mecânicas, de barreira e morfológicas. Para a produção da CB foi utilizada a cepa de *Gluconacetobacter hansenii* (ATCC 23769), onde optou-se pelo processo de fermentação estática com diferentes fontes de carbono (glicose, manitol, sacarose e xilose), variando entre duas concentrações (25 e 50 g·L⁻¹). Para a obtenção das diferentes formulações foi adicionado montmorillonita (MMT), colágeno, amido e glicerol para avaliar as novas características dos biomateriais a base de CB. Na produção envolvendo a adição de MMT, as membranas de CB foram expostas as concentrações de 0,5, 1 e 2% desse composto. Quanto às adições de colágeno, amido e glicerol, foram produzidas nove formulações utilizando a técnica de casting. As formulações foram caracterizadas em termos de propriedades físicas e de barreira, morfológicas e estabilidade térmica. Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente para definir como a concentração de amido e/ou colágeno que interferiu na obtenção de um biomaterial com características adequadas para utilização como biocurativo. Os resultados mostraram que a *G. hansenii* apresentou melhor rendimento de CB com a utilização de glicose na concentração de 50 g·L⁻¹. A incorporação de MMT melhorou significativamente as propriedades mecânicas e térmicas das membranas, expondo temperatura de degradação estendida e uma diminuição da capacidade de retenção de água e uma melhoria na taxa de perda de água. Quanto a adição de colágeno, amido e glicerol nas formulações, a atividade de água, solubilidade, umidade, espessura, permeabilidade ao vapor d'água, gramatura, opacidade, alongação e resistência a tração foram diretamente influenciadas pela sua composição, configurando o desempenho das formulações produzidas em diferentes potenciais de aplicação como biocurativos. Além disso, a microscopia eletrônica de varredura demonstrou, para todos os biomateriais produzidos, que a adição de biopolímeros a matriz de celulose tornou a superfície compacta, o que também influenciou o aspecto visual. Sendo assim, os resultados obtidos demonstraram que a CB modificada com os compostos avaliados apresentou dados interessantes para uma análise mais aprofundada das suas propriedades, considerando suas aplicações potenciais em diferentes áreas, a exemplo da produção de novas tecnologias baseadas em biocurativos, favorecendo o crescimento da indústria biomédica nesta área.

Palavras-chave: celulose bacteriana; montmorillonita; amido; colágeno; glicerol, polímeros biodegradáveis; cicatrização de feridas, biomateriais, biocurativo.

Abstract

In recent years, bacterial cellulose (BC) has been the object of much research due to its high potential for application in areas such as biomedicine or materials, as well as because its biosynthesis is environmentally friendly. The BC is characterized as a homopolymer and is differentiated from vegetable cellulose by its properties, highlighting mainly the biocompatibility and biodegradability of the materials produced. The production of BC composites with various polymers is an effective method to improve their physical, chemical and structural properties. Within this context, the objective of this work was to produce BC and apply it in the development of biomaterials, characterizing and evaluating its mechanical, barrier and morphological properties. For the production of BC, the *Gluconacetobacter hansenii* strain (ATCC 23769) was used, where we opted for the static fermentation process with different carbon sources (glucose, mannitol, sucrose and xylose), varying between two concentrations (25 and 50 g·L⁻¹). To obtain the different formulations, montmorillonite (MMT), collagen, starch and glycerol were added to evaluate the new characteristics of the BC-based biomaterials. In the production involving the addition of MMT, the BC membranes were exposed to concentrations of 0.5, 1 and 2% of this compound. As for the additions of collagen, starch and glycerol, nine formulations were produced using the casting technique. The formulations were characterized in terms of physical and barrier properties, morphology and thermal stability. The results obtained were statistically evaluated to define how the concentration of starch and/or collagen interfered in obtaining a biomaterial with characteristics suitable for use as a biocurative. The results showed that *G. hansenii* presented better BC yield with the use of glucose in the concentration of 50 g·L⁻¹. The incorporation of MMT significantly improved the mechanical and thermal properties of the membranes, exposing extended degradation temperature and a decrease in water holding capacity and an improvement in water loss rate. As for the addition of collagen, starch and glycerol in the formulations, the water activity, solubility, moisture, thickness, water vapor permeability, weight, opacity, elongation and tensile strength were directly influenced by their composition, configuring the performance of the formulations produced in different potential applications as biocuratives. Furthermore, the scanning electron microscopy demonstrated, for all the biomaterials produced, that the addition of biopolymers to the cellulose matrix made the surface compact, which also influenced the visual aspect. Thus, the results obtained showed that the BC modified with the evaluated compounds presented interesting data for further analysis of their properties, considering their potential applications in different areas, such as the production of new technologies based on biocuratives, favoring the growth of the biomedical industry in this area.

Keywords: bacterial cellulose; montmorillonite; starch; collagen; glycerol, biodegradable polymers; wound healing, biomaterials, biodressing.

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1. Fluxograma da estratégia metodológica deste estudo.....23

Capítulo 2

Figura 1. Principais princípios e etapas envolvidas na produção de CB..... 26

Figura 2. Principais propriedades da celulose bacteriana..... 36

Capítulo 3

Figure 1. Complete methodology used for BC and BC-MMT biocomposite production and characterization. 51

Figure 2. Effect of different carbon sources at 25 g·L⁻¹ (a) and 50 g·L⁻¹ (b) concentrations on bacterial growth over time. BC was fermented by static culture for a 14-day period.....54

Figure 3. BC produced by *G. hansenii*: (a) BC produced in glucose-containing media after a 14-day incubation period; (b) pure BC membrane after purification process..... 55

Figure 4. Physical and barrier properties: (a) Water activity (*a_w*) content; (b) Water absorption; (c) Water holding capacity (WHC); (d) Water release test (WRR); (e) Grammage; and (f) Thickness of pure BC and BC-MMT biocomposites. No significant difference between values with the same superscript numbers (1, 2, 3) in a bar ($p > 0.05$), according to Tukey's test with 95% confidence..... 57

Figure 5. Thermogravimetric analysis (TGA) curves for BC and BC-MMT composites. The composites (BC-MMT1, BC-MMT2 and BC-MMT3) were prepared by impregnation of BC sheets in respective concentrations (0.5, 1 and 2%) of MMT suspensions..... 58

Figure 6. Scanning electron microscopy (SEM) micrographs of the surface and cross-section morphology of pure BC: (a) 3300×; (b) 5000×..... 58

Figure 7. Scanning electron microscopy (SEM) micrographs of the surface and cross section morphology of: (a) ×3000 and (b) ×160 BC-MMT0.5; (c) ×3000 and (d) ×230 BC-MMT2..... 60

Capítulo 4

Figure 1. The main steps of the methodology used for bacterial cellulose (BC) and BC-collagen-starch biocomposite production and characterization. Created via BioRender.com..... 69

Figure 2. Visual appearance of the pure bacterial cellulose (BC; control) and BC-collagen-starch biocomposites. (a) F1, (b) F2, (c) F3, (d) F4, (e) F5, (f) F6, (g) F7, (h) F8, and (i) F9..... 73

Figure 3. Physical and barrier properties of pure bacterial cellulose (BC, F1) and BC-collagen-starch biocomposites (F2-F9). (a) Water activity (*a_w*) content; (b) Water solubility; (c) Moisture content; (d) Total solids content; (e) Thickness; (f) Water vapor permeability; (g) Grammage and (h) Opacity. Bars followed by the same letters were not significantly different at $p < 0.05$ according to Tukey's test with 95% confidence..... 75

Figure 4. Characterization of pure bacterial cellulose (BC,F1) and BC-collagen-starch biocomposites (F2-F9). (a) Swelling rate and (b) water retention rate..... 77

Figure 5. Mechanical properties of pure bacterial cellulose (BC,F1) and BC-collagen-starch biocomposites (F2-F9). (a) Elongation (%) and (b) tensile strength (MPa)..... 77

Figure 6. Scanning electron microscopy (SEM) surface micrographs of the surfaces of the pure bacterial cellulose (BC, F1) and BC-collagen-starch biocomposite (F2-F9). (a) F1, (b) F2, (c) F3, (d) F4, (e) F5, (f) F6, (g) F7, (h) F8, and (i) F9..... 78

Figure 7. Thermal analysis of pure bacterial cellulose (BC,F1) and BC-collagen-starch biocomposites (F2-F9). (a) Thermogravimetric analysis (TGA) and (b) differential thermogravimetry (DTG)..... 79

Figure 8. Scores scatter plot by principal component analysis of pure bacterial cellulose (BC,F1) and BC-collagen-starch biocomposites (F2-F9)..... 80

Lista de Tabelas

Capítulo 2

<i>Tabela 1. Aplicações na área biomédica com uso de CB.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabela 2. Aplicações na área de alimentos com uso de CB.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabela 3. Aplicações na área eletrônica com uso de CB.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabela 4. Aplicações na área cosmética com uso de CB.....</i>	<i>46</i>

Capítulo 3

<i>Table 1. Media components and concentration.....</i>	<i>52</i>
<i>Table 2. Sample name and montmorillonite (MMT) concentration of biocomposites.....</i>	<i>52</i>
<i>Table 3. Experimental program of pure BC and BC-MMT biocomposite analysis.....</i>	<i>54</i>
<i>Table 4. Comparison of reports of BC production by <i>G. hansenii</i> in various media.....</i>	<i>55</i>
<i>Table 5. Physical and barrier properties of flexible formulations of pure BC and BC-MMT composites. No significant difference between values with the same superscript letter (a,b,c) in a column ($p > 0.05$), according to Tukey's test with 95% confidence.....</i>	<i>56</i>

Capítulo 4

<i>Table 1. Sample name and composition of biocomposites based on bacterial cellulose and combined with starch and collagen.....</i>	<i>70</i>
<i>Table 2. Data regarding the physical properties, barrier, and mechanical properties of pure bacterial cellulose (sample F1) and bacterial cellulose–collagen–starch biocomposites (samples F2–F9).....</i>	<i>76</i>

Lista de Siglas e Abreviaturas

a_w : atividade de água

CB: celulose bacteriana

CCT: Tropical Culture Collection

CNC: nanocristais de celulose

CNF: nanofibras de celulose

CONITEC: Comitê Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS

COVID-19: Doença do coronavírus 2019

MMT: montmorillonita

NR: suspensão de látex

pH: potencial hidrogeniônico

PHB: polihidroxibutirato

RGD: sequência de reconhecimento Ácido argino-glicino-espártico

SBQ: Sociedade Brasileira de Queimaduras

SUS: Sistema Único de Saúde

WHC: capacidade de retenção de água, do inglês *water holding capacity*

WRR: taxa de descarga de água, do inglês *water release rate*

Sumário

Resumo	viii
Abstract	ix
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xii
Lista de Siglas e Abreviaturas	xiii
Sumário	xv
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	17
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVOS	20
1.1.1 OBJETIVO GERAL	20
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
2. ORGANIZAÇÃO DO DOCUMENTO	21
CAPÍTULO 2: REVISÃO DE LITERATURA	24
1. CELULOSE BACTERIANA (CB): BACTÉRIAS PRODUTORAS E VIAS DE BIOSÍNTESE	24
2. PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA (CB)	27
2.1 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH) E TEMPERATURA	27
2.2 COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA	28
2.3 OXIGÊNIO DISSOLVIDO E TIPO DE CULTIVO	29
3. INCORPORAÇÃO DE COMPOSTOS À CELULOSE BACTERIANA PARA PRODUÇÃO DE BIOMATERIAIS	30
3.1 EXEMPLOS DE COMPOSTOS QUE CONTRIBUEM PARA A MELHORIA DAS PROPRIEDADES DA CELULOSE BACTERIANA	31
3.1.1 COLÁGENO	31
3.1.2 AMIDO	32
3.1.3 GLICEROL	33
3.1.4 MONTMORILLONITA (MMT)	34
4. POTENCIAIS APLICAÇÕES DA CELULOSE BACTERIANA	35
4.1 APLICAÇÃO NA ÁREA BIOMÉDICA	36
4.2 APLICAÇÃO NA ÁREA DE ALIMENTOS	41
4.3 APLICAÇÃO NA ÁREA ELETRÔNICA	43
4.4 APLICAÇÃO NA ÁREA DE COSMÉTICOS	45
CAPÍTULO 3: ARTIGO 1	48
CAPÍTULO 4: ARTIGO 2	66
CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO GERAL	88
ANEXOS	89
ANEXO I: PRODUÇÃO CIENTÍFICA	89
REFERÊNCIAS	91

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A celulose bacteriana (CB) é um homopolímero e distingue-se da celulose de origem vegetal por suas propriedades únicas, como boa biocompatibilidade (UZYOL; SAÇAN, 2017), o que tem atraído grande atenção devido ao seu alto grau de polimerização, boa biodegradabilidade e excelentes propriedades mecânicas, além de não ser tóxica e alergênica (REVIN et al., 2018). Além dessas propriedades, a CB apresenta outras características como a alta pureza, alta cristalinidade, elevada capacidade de retenção e absorção de água (99% de sua massa) devido ao diâmetro menor das microfibrilas (ORLANDO et al., 2020).

Sua fibra tem uma alta proporção, com um diâmetro de 20–100 nm. Essa característica implica em uma área de superfície muito alta por unidade de massa o que a torna altamente hidrofílica. Portanto, CB é usada extensivamente em muitos campos, incluindo o desenvolvimento de materiais biomédicos, para a entrega de medicamentos, engenharia de tecidos, indústria de alimentos, diafragma acústico, papel funcional, displays ópticos, biomateriais nanoestruturados (REVIN et al., 2018). Ressalta-se ainda que a CB tem potencial uso na funcionalização química e na preparação de biocompósitos (DÓRAME-MIRANDA et al., 2019), podendo ser aplicada ainda em diferentes setores.

Segundo Nóbrega et al. (2019), a estrutura química de CB é composta por cadeias de (1→4)-D-anidroglucopirranose delimitadas por ligações β -glicosídicas. A geometria da CB é determinada pelas interações entre ligações de hidrogênio intra-moleculares e inter-moleculares, interações hidrofóbicas e de van der Waals, e forma cadeias paralelas. Apesar das semelhanças com outros tipos de nanocelulose como nanofibras de celulose (CNF) ou nanocristais de celulose (CNC), nanofibras de CB tem propriedades únicas, sendo propiciadas pela sua estrutura química que permite a formação de um material em estrutura 3D, resultando em maior cristalinidade, conferindo à mesma uma maior resistência mecânica.

Entre as bactérias produtoras de celulose, as espécies mais eficazes são do gênero *Gluconacetobacter* (também denominado *Acetobacter*) (ULLAH et al., 2015; NUMATA et

al., 2019a). Quando essas espécies são cultivadas em laboratório sob condições estáticas, a celulose se forma como uma membrana inchada na interface ar-água, aumentando de espessura se o tempo de cultivo aumenta (NUMATA et al., 2019a). No entanto, o baixo rendimento do processo de produção estático e o alto custo de produção da CB restringiram a eficácia comercial da CB. Encontrar um meio de cultura ideal e condições de crescimento adequadas que garantam níveis mais altos de celulose ajudará na viabilidade dessa tecnologia em uma situação industrial (SAICHANA et al., 2015).

Os meios de cultura comumente usados para a produção de CB requerem principalmente uma fonte de carbono e nitrogênio e sais para tamponar o pH (SAICHANA et al., 2015). Os componentes que formam o meio de cultura são importantes porque influenciam na cinética de produção da CB. Molina-Ramírez et al. (2017) estudaram o uso de diferentes fontes de carbono para preparação do meio: glicose, frutose e sacarose. Enquanto as fontes de carbono não influenciaram nas características estruturais da CB, diferentes níveis de produção foram obtidos. Esses resultados são relevantes para melhorar a produção industrial da CB, que poderá implicar na viabilidade em diferentes aplicações.

Na área médica, por exemplo, na aplicação de curativos tradicionais existe o risco de dor e trauma adicional ao trocar desses materiais devido ao crescimento do tecido de granulação nas fibras desses materiais, o que poderia dificultar o processo de cicatrização (ANDERSON, 2010; TOON et al., 2015). O uso de gaze, fiapos, emplastros, ataduras (naturais ou sintéticas) e algodão têm limitação em danos epidérmicos ou na pele ou queimaduras, pois não impedem o crescimento de infecções microbianas e proporcionam um ambiente úmido para a cicatrização (PORTELA et al., 2019). Um curativo ideal não apenas cobre e protege a área afetada, mas também otimiza o ambiente da ferida para facilitar a cicatrização (PORTELA et al., 2019; YE et al., 2019b).

A CB constitui uma ótima matriz para a síntese de compósitos funcionais devido à sua enorme área nanoporosa e à presença de átomos de oxigênio ricos em elétrons (FU; ZHANG; YANG, 2013). Portanto, alguns pesquisadores investigaram compósitos poliméricos reforçados com CB e com diferentes materiais, incluindo materiais condutores (YE et al., 2019a), óxido de grafeno (LUO et al., 2016), nanotubos de carbono (HOSSEINI; KOKABI; MOUSAVI, 2018), cerâmica (DHARMALINGAM et al., 2019) e

biopolímeros (LI et al., 2019b) para várias aplicações biotecnológicas, não apenas no setor médico, mas garantindo possibilidades de aplicação em outros setores como de alimentos e cosméticos.

Dentro desse contexto é importante destacar que há um crescente interesse no desenvolvimento de novos materiais que possam ser aplicados aos diferentes setores tecnológicos, garantindo melhorias no desenvolvimento de produtos baseados em biomateriais. Dessa forma, novas tecnologias podem ser construídas ou aprimoradas aproveitando do potencial da CB devido suas propriedades intrínsecas, a exemplo de sua resistência mecânica significativa na hidratação, além de *in situ*, moldabilidade adequada, biocompatibilidade e biodegradabilidade (WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019a). Dependendo das concentrações dos biomateriais pode-se verificar influência nas características dos biomateriais, como espessura, gramatura, permeabilidade ao vapor d'água, durabilidade, densidade, solubilidade, opacidade, índice de intumescimento, resistência a tração, elasticidade, entre outras (SAYED et al., 2020).

Dentre os polímeros utilizados na produção de materiais com aplicações biomédicas pode-se destacar as proteínas (como colágeno, elastina e fibroína da seda) e os polissacarídeos (como quitosana, alginato, goma xantana, ácido hialurônico e pectina) (SELL et al., 2010; SIONKOWSKA, 2011). Além disso, diversos compostos são empregados como bons formadores de filmes biodegradáveis, tais como colágeno, amido e glicerol (BASIAK; LENART; DEBEAUFORT, 2018). O colágeno é um importante componente que faz parte do substrato natural das células e atua na orientação do estímulo à formação tecidual. Suas características de destaque que permitem a consideração de seu uso na confecção de biomateriais são a biocompatibilidade e estabilidade (DE MELO et al., 2017). O amido é um dos carboidratos mais abundantes encontrado em plantas. Sua utilização na formação de biomateriais se baseia na sua principal propriedade, a gelatinização, que permite atribuir resistência mecânica e térmica aos polímeros (ABRAL et al., 2019). O glicerol, composto orgânico pertencente à função álcool, possui uma importante propriedade plastificante, que permite a garantia de boa qualidade dos produtos finais (CAZÓN; VÁZQUEZ; VELAZQUEZ, 2019).

Outro material que vem sendo investigado para a confecção de biomateriais é a Montmorillonita (MMT), um argilo mineral expansível. Esse material tem atraído inúmeras pesquisas, devido intrínsecas características que contribuem para a produção

de biomateriais, promovendo melhorias substanciais às propriedades nanocompósitas, como baixo custo e alta capacidade de troca catiônica, entre outras (BOURAKADI et al., 2019; LIU; CATCHMARK, 2019; SAJJAD et al., 2019).

Portanto, o objetivo deste estudo se baseia na utilização da cepa *Gluconacetobacter hansenii* para avaliação das melhores condições de produção de CB para o desenvolvimento de biomateriais combinados com diferentes tipos de compostos, a exemplo da MMT, glicerol, amido e colágeno. Além disso, realizar a caracterização dos biomateriais produzidos em relação as propriedades barreira, mecânica e morfológica; afim de caracterizar a CB para o desenvolvimento de novos produtos com potencial aplicação industrial.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi produzir celulose bacteriana (CB) a partir de *Gluconacetobacter hansenii* e aplicar o bioproduto purificado no desenvolvimento de diferentes formulações de biomateriais.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a concentração (25 e 50 g.L⁻¹) e o tipo de fontes de carbono (glicose, manitol, sacarose e xilose) na obtenção de CB por fermentação estática em frasco a partir de *Gluconacetobacter hansenii* (ATCC 23769) para definição da melhor condição de processo fermentativo e aplicar no desenvolvimento de diferentes formulações de biocompósitos;
- Produzir formulações de biocompósitos utilizando CB como matriz polimérica incorporadas com montmorillonita (MMT) em diferentes concentrações (0,5, 1 e 2%);
- Avaliar a influência da MMT nas propriedades da CB;
- Produzir formulações de biocompósitos utilizando CB como matriz polimérica incorporadas com amido e colágeno em diferentes concentrações (amido: 0, 1 e 2% / colágeno: 0, 1,12 e 2,23%);
- Avaliar a influência do amido e colágeno nas propriedades da CB.

2. ORGANIZAÇÃO DO DOCUMENTO

Este trabalho foi organizado no formato de capítulos, a fim de promover um melhor entendimento acerca da estruturação do mesmo. No total, são 5 capítulos, onde cada capítulo refere-se a um item específico do trabalho, conforme descrito a seguir:

No Capítulo 1, é apresentada a Introdução com informações gerais sobre o conceito, propriedades e processo de produção de CB, com identificação de gêneros bacterianos responsáveis, bem como os melhores meios utilizados. Também é apresentada uma prévia de possibilidades de aplicação da CB em diferentes setores industriais. Neste Capítulo, também são denotados os objetivos geral e específicos deste trabalho.

No Capítulo 2, consta a Revisão de Literatura. Nela, são aprofundadas as principais informações referentes ao tema deste trabalho, iniciando com uma conceituação mais aprofundada sobre a CB, bactérias produtoras com ênfase para a produção por *Gluconacetobacter hansenii*, bactéria utilizada no desenvolvimento dos experimentos deste estudo. Além disso, são abordadas as vias de biossíntese da CB com as principais vias de produção pelo microrganismo. Em seguida, são apresentadas informações acerca dos parâmetros que influenciam na produção de CB relatando formas de otimização de sua produção. Também são apresentadas as possibilidades de incorporação de compostos à CB para a produção de biomateriais. Alguns exemplos de compostos são trazidos, mais especificamente os utilizados nas experimentações deste trabalho (colágeno, amido, glicerol e MMT), visando destacar a potencialidade de produção de biocompostos com incorporação de agentes que promovam melhorias às propriedades da CB. Por fim, são apresentadas as potenciais aplicações da CB para o desenvolvimento de biocompósitos passíveis de serem aplicados em diversos setores industriais. Abordagens de aplicação nos setores biomédico, de alimentos, eletrônico e de cosméticos são destacadas, bem como exemplos de investigações e aplicações práticas destes biomateriais produzidos.

No Capítulo 3, têm-se o primeiro artigo publicado durante o desenvolvimento desta tese. Intitulado *Evaluation of Different Methods for Cultivating Gluconacetobacter hansenii for Bacterial Cellulose and Montmorillonite Biocomposite Production: Wound-Dressing Applications*, esta publicação traz informações acerca das experimentações

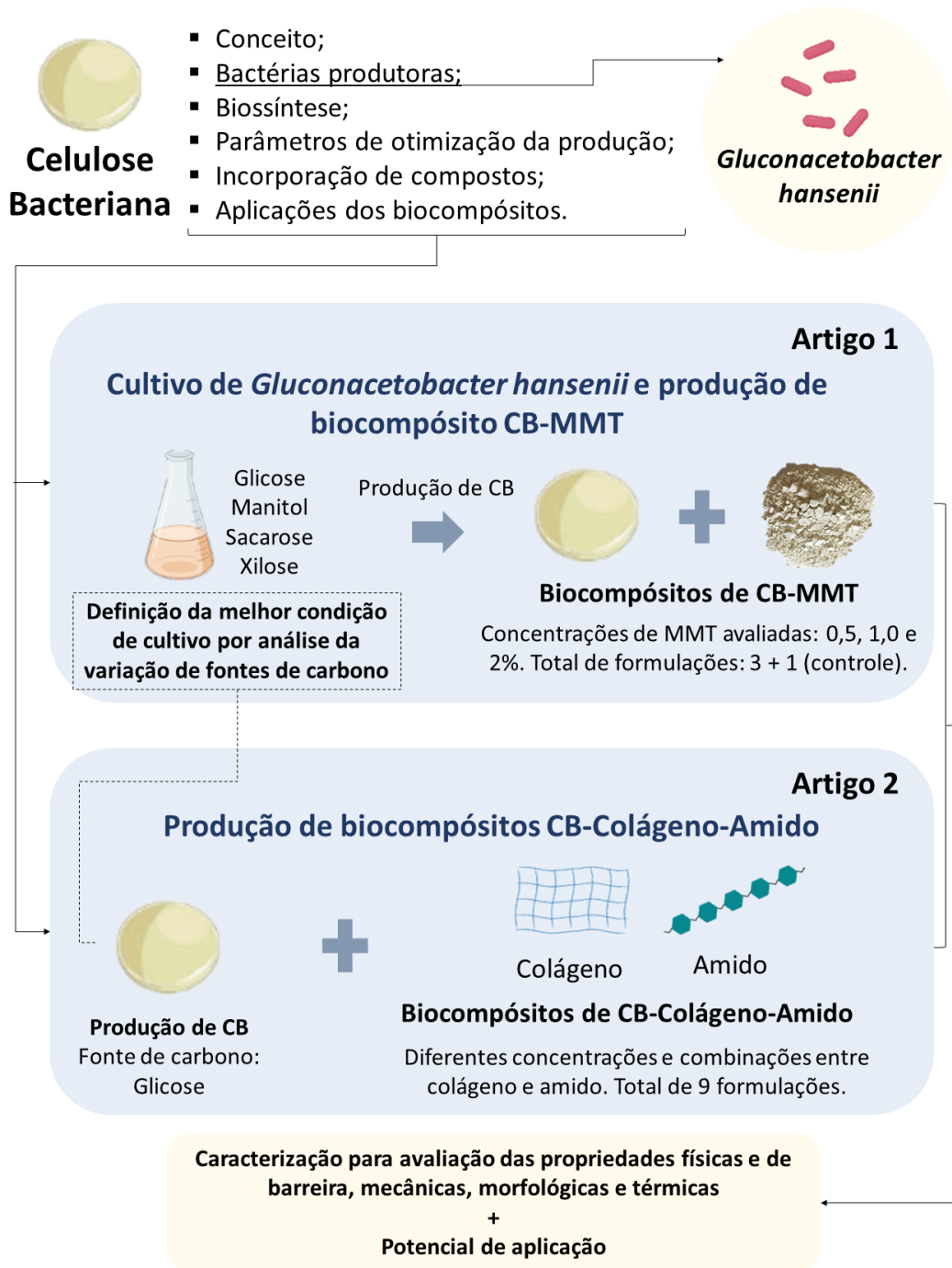
realizadas para a análise das melhores condições de produção da CB por meio da variação das concentrações de diferentes fontes de carbono (glicose, manitol, sacarose e xilose), bem como a caracterização de um biocompósito produzido pela adição de MMT no preparo de formulações a base de CB, no intuito de avaliar melhorias às propriedades físico-químicas dos biomateriais produzidos.

No Capítulo 4, é apresentado o segundo artigo publicado durante o desenvolvimento desta tese. Intitulado *Development of Bacterial Cellulose Biocomposites Combined with Starch and Collagen and Evaluation of Their Properties*, esta publicação fez uso da melhor condição de produção da CB (em relação as concentrações de fonte de carbono aplicadas, identificada nos ensaios anteriores, publicados no artigo 1), para a produção de biocompósitos compostos por CB, colágeno e amido. Este estudo teve por finalidade também avaliar melhorias promovidas às propriedades físico-químicas dos biomateriais produzidos. Dessa forma, ambos estudos se basearam na avaliação de potenciais biomateriais passíveis de aplicação em atendimento aos setores industriais.

Por último, no Capítulo 5 é apresentada a conclusão deste trabalho, trazendo as informações-chave coletadas por meio do desenvolvimento experimental realizado. Dentro desse contexto, também são apontadas perspectivas futuras em relação ao potencial de aplicação destes biomateriais produzidos.

A Figura 1 apresenta o fluxograma da estratégia metodológica utilizada neste estudo, o que justifica a apresentação no formato de capítulos inter-relacionados, mais especificamente em relação à produção científica por meio dos dois artigos produzidos no decorrer deste projeto de pesquisa.

Figura 1. Fluxograma da estratégia metodológica deste estudo.



Fonte: Criado pelo autor através da ferramenta BioRender.com.

CAPÍTULO 2: REVISÃO DE LITERATURA

1. CELULOSE BACTERIANA (CB): BACTÉRIAS PRODUTORAS E VIAS DE BIOSÍNTESE

A CB é produzida por bactérias e por ser de origem não vegetal, sua morfologia é diferente. A CB possui a mesma fórmula química da celulose produzida por plantas $(C_6H_{10}O_5)_n$, com unidades de β -D-glucopiranosose interligadas por ligações intermoleculares de hidrogênio. A celulose vegetal necessita de processos de purificação complexos para a extração da lignina e da hemicelulose, enquanto o processo de obtenção e de purificação de CB é menos complexo, mais puro, além de diminuir o custo final do produto (HODEL et al., 2020a).

A CB é um biopolímero obtido por processo fermentativo e quando em cultivo estático, apresenta-se sob a forma de uma película. É produzida em meio contendo sacarídeos e nitrogênio orgânico, através de rotas de biossíntese realizada por bactérias de gêneros como: *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes* (CHAWLA et al., 2009). Em termos de estrutura, possui estrutura nanométrica, alto índice de cristalinidade, alta porosidade, biocompatibilidade e elevado potencial tecnológico. Além disso, possui a vantagem de ser livre de lignina, hemicelulose e pectina, tornando-a altamente pura e mais facilmente aproveitável pelo fato de não haver a recalcitrância presente na celulose vegetal. Essa característica impacta diretamente na redução do custo dos processos por não necessitar de pré-tratamento e de hidrólise para o isolamento desses materiais (ABITBOL et al., 2016).

Quando comparada a celulose vegetal, a CB possui maior capacidade de retenção de água, resistência mecânica e à tração, possibilidade de inserções de materiais para obtenção de compósitos, maior adaptabilidade biológica e grande capacidade de modificação química (DYDAK et al., 2018; GOPI et al., 2019). Dentre as características mais relevantes destaca-se o alto grau de cristalinidade da estrutura, que se relaciona com a propriedade de alta resistência mecânica apresentada pela CB (CHAWLA et al., 2009). As propriedades intrínsecas da CB fazem com que ela seja considerada como um biopolímero promissor, tornando-se um dos biomateriais mais propícios para utilização em aplicações biomédicas, especialmente para serem aplicadas como materiais de curativo (GOPI et al., 2019; YE et al., 2019c), visto que possui capacidade de formar

barreira contra infecções aliada a baixa atividade celulolítica por parte dos tecidos humanos (CZAJA et al., 2006).

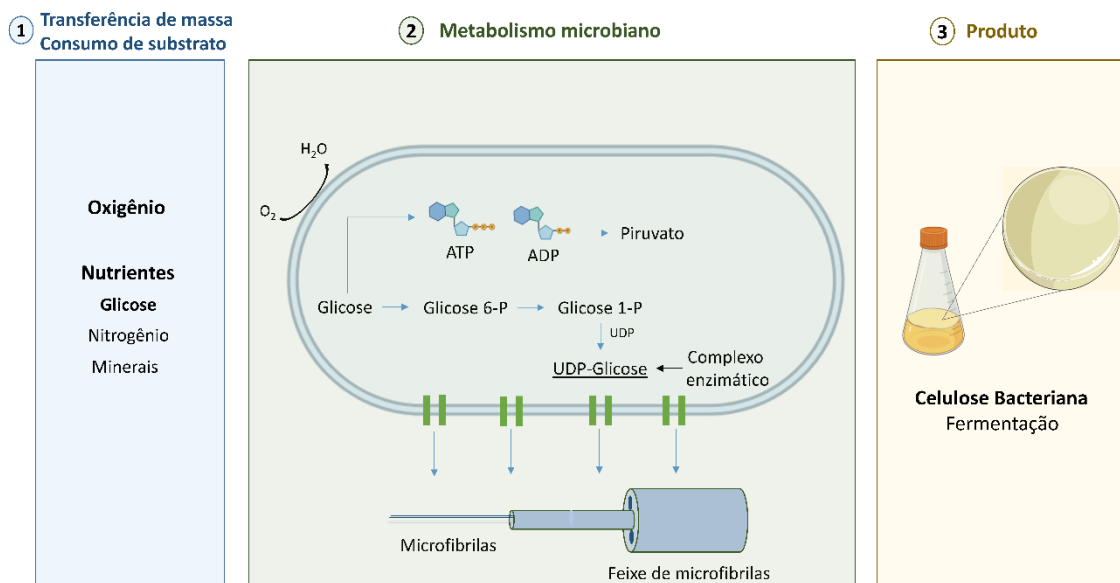
A utilização da CB na produção de biomateriais tem sido feita principalmente através da inserção de substâncias como: prata, fosfato, pectina, amido e sílica; e inserção “in situ” de hidroxiapatita, colágeno e polihidroxibutirato (PHB) (DONINI et al., 2010; HUANG et al., 2010; NAKAGAITO; IWAMOTO; YANO, 2005; RUKA; SIMON; DEAN, 2013). As inserções dessas substâncias têm como objetivo adicionar novas propriedades ao biopolímero ou melhorar as suas propriedades intrínsecas. A adição de componentes visando aumentar as características dos biomateriais de CB foram estudados por Potivara; Phisalaphong (2019), onde a CB foi imersa em suspensão de látex (NR) na presença de solução aquosa de etanol. Foi revelado que a combinação de nanocelulose fibrosa às redes e o polímero de NR forneceram um efeito sinérgico nas propriedades mecânicas dos filmes NR-CB. Em comparação com os filmes CB, a resistência à tração e o alongamento na ruptura dos filmes NR-CB foram consideravelmente melhorados em ~4 vezes. Os filmes NR-CB também exibiram melhor resistência à água e uma alta resistência a solventes não polares, como o tolueno. Outra característica importante do filme NR-CB foi a biodegradabilidade, sendo degradado completamente dentro de 5 a 6 semanas no solo.

Como citado anteriormente, diferentes gêneros de bactérias podem ser responsáveis pela produção de CB. A bactéria *Gluconacetobacter hansenii* é uma das espécies mais utilizadas nessa produção devido a sua capacidade de produzir celulose na presença de diferentes fontes de carbono e nitrogênio (CASTRO et al., 2011). A espécie apresenta morfologia de bastonetes retos ou ligeiramente curvos, podendo ser ou não móveis. São microorganismos gram-negativos, tolerantes as condições ácidas (pH abaixo de 5), aeróbios, não fotossintéticos e crescem em temperaturas que variam entre 15 e 34 °C. A bactéria *G. hansenii* pode ser encontrada na superfície de frutas e vegetais em decomposição, no vinagre ou bebidas alcólicas (DAYAL et al., 2013). Essa bactéria possui a capacidade de sintetizar celulose a partir de uma variedade de substratos como fonte de carbono (glicose, sacarose, glicerol, manitol, entre outros), e nitrogênio complexos, proporcionando a capacidade de modificar e controlar as propriedades físicas e químicas da celulose durante a sua síntese (HAIGLER et al., 1982); (HAIGLER et al., 1982); (OGAWA; TOKURA, 1992).

Em laboratório sob condições estáticas, a bactéria *G. hansenii* quando cultivada forma uma película na interface ar/água, sendo o aumento da espessura da película diretamente proporcional ao tempo de cultivo (NUMATA et al., 2019b). Essa película desempenha uma ação funcional para o microorganismo, pois funciona como um mecanismo de flotação com a finalidade de obter oxigênio com mais facilidade. Por ser um material opaco, a película funciona como barreira à radiação UV, possui a capacidade de adsorver metais pesados e, por permanecer na superfície do meio, melhora o transporte de nutrientes pelo mecanismo de difusão (KLEMM et al., 2006). E ainda, previne a desidratação do substrato, uma vez que possui caráter altamente higroscópico, protegendo o substrato de microorganismos não produtores do polímero (KLEMM et al., 2006).

A bactéria *G. hansenii* tem a capacidade de produzir celulose utilizando uma variedade de substratos carbônicos. A biossíntese da CB tem como via bioquímica mais compreendida a conversão da glicose como substrato exógeno à celulose. As reações bioquímicas são reguladas por enzimas e proteínas (DONINI et al., 2010). O consumo de nutrientes deve ser suficiente para a multiplicação celular e paralela produção de celulose (HUANG et al., 2010). A Figura 1 mostra de forma simplificada as etapas envolvidas na produção de CB.

Figura 1. Principais princípios e etapas envolvidas na produção de CB.



Fonte: Criado pelo autor através da ferramenta BioRender.com.

A bactéria *G. hansenii* pode metabolizar pelo ciclo de Krebs, que envolve a oxidação de ácidos orgânicos, ou pelo ciclo das pentoses fosfato, onde ocorre a oxidação de carboidratos (LEE et al., 2014). Nessa via participam algumas enzimas que envolvem várias reações: glucoquinase: responsável pela fosforilação do carbono 6 da glicose; fosfoglucomutase: catalisa a reação de isomerização da glicose-6-fosfato (Glc-6-P) para glicose-1-fosfato (Glc-1-P); UDPG-pirofosforilase (UGPase): sintetiza a uridina-disfosfoglicose (UDPGlc); celulose sintetase (CS): produz, de fato, a celulose a partir da UDP-glicose (UDPGlc).

O filme formado de CB é originado de cadeias que se agregam formando sub-fibrilas que se agrupam originando uma fibrila elementar que juntam-se por meio de pontes de hidrogênio formando as fibras de CB. Como a celulose formada possui diversos grupos hidroxila dispostos em sua superfície, esse fato explica sua biodegradabilidade, hidrofiliabilidade e sua alta capacidade de modificação química para diversas aplicações industriais (CASTRO et al., 2011).

2. PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA (CB)

A produção de CB é influenciada por parâmetros relacionados a indução ou inibição da atividade proteica e mudanças na morfologia celular, destacam-se: pH, composição do meio de cultura, temperatura e oxigênio dissolvido. Sabe-se que esses parâmetros são importantes para determinar as condições ótimas da produção de CB.

2.1 Potencial hidrogeniônico (pH) e Temperatura

O consumo de açúcares do meio de cultivo pode oscilar de acordo com as variações no pH durante a fermentação, devido as mudanças na atividade e síntese enzimática e formação de subprodutos, afetando o transporte de nutrientes para o interior da célula, e, conseqüentemente, inibindo o crescimento celular (PANESAR et al., 2012). O ácido glucônico, formado através da catablização da glicose, é o principal responsável pela redução do pH durante a síntese das microfibrilas de celulose. Diferentes alternativas têm sido propostas para mitigar os efeitos no pH na produção da CB, incluindo a criação de uma rede metabólica para reduzir a produção de ácido glucônico através de alterações genéticas, otimização da estratégia de alimentação de

glicose e/ou utilizar fontes alternativas de carbono que não acionem a produção de subprodutos (JANG et al., 2017).

O pH ótimo para o crescimento da *G. hansenii* e da produção de CB normalmente varia de 4 e 7. Para aplicações na área biomédica a produção industrial de CB varia entre 4 e 4,5, tendo como objetivo evitar a contaminação do meio durante o cultivo (PANESAR et al., 2012). A influência da temperatura no rendimento de CB produzida em meio Hestrin e Schram encontra-se na faixa de 20 a 40 °C (SON et al., 2003). A faixa de temperatura mais utilizada atualmente varia entre 28 e 30 °C. Além do rendimento, a variação da temperatura de fermentação influencia na estrutura morfológica e a formação do cristal, características importantes na produção de CB (ERBAS KIZILTAS; KIZILTAS; GARDNER, 2015; ZENG; SMALL; WAN, 2011).

2.2 Composição do meio de cultura

A composição do meio de cultura está diretamente relacionada a capacidade das bactérias do gênero *Gluconacetobacter* em metabolizar as mais variadas fontes de carbono, o que pode impactar o rendimento na produção de CB, pois a composição e a quantidade de açúcar presente no meio é de suma importância para o metabolismo das bactérias (MIKKELSEN et al., 2009). A glicose pode ser considerada como uma fonte de carbono ideal por ser utilizada tanto como uma fonte de energia quanto como um precursor para a obtenção de células durante o processo de biossíntese.

O meio de ativação e de cultivo utilizados para produção de CB são baseados no meio sugerido por Hestrin e Schramm (1954) (meio HS), tendo a glicose como principal fonte de carbono e o extrato de levedura e peptona como fonte de nitrogênio e fósforo. Além destes componentes, os meios precisam de outros elementos como Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺ entre outros, que desempenham papel importante como cofatores enzimáticos nas vias de produção da celulose. A produção de CB também pode ser aumentada adicionando uma concentração inicial ótima de aditivos, tais como ácidos orgânicos, etanol, nicotinamida, alginato de sódio (JANG et al., 2017).

Os meios de cultura comumente usados para a produção de CB requerem principalmente uma fonte de carbono e nitrogênio e sais para tamponar o pH (SAICHANA et al., 2015). Apesar da sua ampla utilização, diferentes estudos publicados na literatura técnica e científica trazem diferentes adaptações do meio HS ou novas

alternativas de meio de cultivo, buscando o aumento da produtividade durante o processo de produção da celulose, visto que os componentes que formam o meio de cultura são importantes porque influenciam na cinética de produção da CB. Molina-Ramírez et al., (2017) estudou o uso de diferentes fontes de carbono para preparação do meio: glicose, frutose e sacarose. Observou que as fontes de carbono não influenciaram nas características estruturais da CB, e diferentes níveis de produção foram obtidos. Esses resultados são relevantes para melhorar a produção industrial da CB, que poderá implicar na viabilidade em diferentes aplicações. Mohammadkazemi; Azin; Ashori (2015) avaliaram os efeitos de diferentes fontes de carbono e meios de cultura sobre a produção e propriedades estruturais da celulose bacteriana. Os resultados referentes a esse trabalho mostraram que o meio HS foi o que obteve o melhor rendimento quando comparado aos outros dois meios de produção aplicados no processo, o Yamanaka (composto por glicose, extrato de levedura, sulfato de amônio, fosfato de potássio monobásico e sulfato de magnésio) e o meio Zhou (composto por glicose, licor de milho, sulfato de amônio, fosfato de potássio monobásico e sulfato de magnésio).

Dessa forma, determinar um meio ideal e um conjunto adequado de condições de crescimento que permitam altos níveis de produção de celulose agrega características necessárias para ampliação desta tecnologia para uma escala industrial (RUKA; SIMON; DEAN, 2013), tendo em vista principalmente o mercado potencial de aplicação.

2.3 Oxigênio dissolvido e tipo de cultivo

A presença de oxigênio é diretamente relacionada ao metabolismo de respiração que é essencial para o rendimento e as propriedades do biomaterial. A quantidade de oxigênio dissolvido pode estar relacionado ao tipo de cultivo que está sendo aplicado para a produção da CB, que pode ser realizada através do modo estático ou dinâmico. As condições do modo de cultivo são muito importantes e impactam as propriedades da CB.

A cultura em meio estático produz película de celulose na superfície do meio de cultivo que cresce em contato com o ar. Assim sendo, os nutrientes espalham-se pelas camadas de celulose da superfície até as células, o que se apresenta como uma vantagem quando comparado ao cultivo dinâmico (ou agitado) (ERBAS KIZILTAS;

KIZILTAS; GARDNER, 2015). Além disso, as condições estáticas são melhores para manter uma forma regular e para manter uma boa morfologia. O uso de moldes sob condições estáticas, por exemplo, pode produzir um produto liso e uniforme, que é adequado para aplicações na área biomédica, como na produção de curativos e vasos sanguíneos artificiais. Diferentemente do cultivo estático, a CB produzida sob condições dinâmicas (agitadas) pode apresentar formato de polpas, filamentos e esferas multiformes. Para cada modo, o objetivo principal é atingir alta eficiência na produção de CB com uma forma ideal e propriedades apropriadas para sua aplicação. A propriedade de resistência mecânica da CB pode sofrer influência pelo meio a qual foi produzida. No meio agitado possui menor resistência se comparada à produzida em meio estático (HUNGUND; HUNGUND; GUPTA, 2010).

Atualmente, o cultivo estático tem sido bastante utilizado pela simplicidade do método, além de diminuir a propabilidade de mutações genéticas responsáveis pelo o aparecimento de cepas não produtivas, o que é comumente relatado quando se utilizada o cultivo agitado, principalmente com o uso de biorreatores (CHOI; SHIN, 2020; JANG et al., 2017). Além disso, a propriedade de resistência mecânica da CB pode sofrer influência pelo meio a qual foi produzida, onde no meio agitado possui menor resistência se comparada à produzida em meio estático (HUNGUND; HUNGUND; GUPTA, 2010).

3. INCORPORAÇÃO DE COMPOSTOS À CELULOSE BACTERIANA PARA PRODUÇÃO DE BIOMATERIAIS

A combinação da CB com outros polímeros pode melhorar suas características e estrutura, proporcionando novas aplicações industriais. Os biomateriais são novos materiais produzidos para serem utilizados em aplicações diversas, como médicas e de engenharia de tecidos. As características necessárias para essas materias são: biocompatibilidade, biofuncionalidade, ser bioabsorvível, biodegradável, poroso, permeável para passagem de nutrientes e troca de gases, possuir tamanho de poros adequado que possibilite a penetração celular e formação de tecido (HODEL et al., 2020a). Destes, a biocompatibilidade e biofuncionalidade são características essenciais para esses biomateriais desempenharem a função desejada.

Dependendo das concentrações das formulações pode-se verificar influência nas características dos biomateriais, como espessura, gramatura, permeabilidade ao vapor d'água, durabilidade, densidade, solubilidade, opacidade, índice de intumescimento, resistência a tração, elasticidade, entre outras (SAYED et al., 2020).

Dentre os biopolímeros utilizados na produção de materiais, pode-se destacar as proteínas (como colágeno, elastina e fibroína da seda) e os polissacarídeos (como quitosana, alginato, goma xantana, ácido hialurônico e pectina) (SELL et al., 2010; SIONKOWSKA, 2011). Além disso, diversos compostos são empregados como bons formadores de filme biodegradáveis, tais como colágeno, amido e glicerol (BASIAK; LENART; DEBEAUFORT, 2018).

3.1 Exemplos de compostos que contribuem para a melhoria das propriedades da Celulose Bacteriana

Diferentes compostos podem ser aplicados no desenvolvimento de materiais à base de CB. Dentre eles, é possível destacar quatro compostos que possuem importantes características que justificam a escolha deles no desenvolvimento deste estudo. A escolha por estes constituintes se baseou na revisão de suas propriedades, conforme melhor explanado nas seções a seguir. É válido ressaltar que, não apenas uma característica em especial foi tida como critério para escolha, mas um conjunto de propriedades que já são muito bem caracterizadas na literatura.

3.1.1 Colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante em vertebrados, e um produto de alto valor e tem sido fonte de investigação para uso industrial devido à sua abundância no tecido animal, presente principalmente nos ossos, pele e cartilagem (DE MELO et al., 2017). Seu uso industrial é de especial interesse devido à grande disponibilidade desta matéria-prima no Brasil. Como biomaterial, o colágeno apresenta características bastante significativas, tais como baixa irritabilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, interação com plaquetas, ativa o processo de coagulação sanguínea, promove o crescimento celular e ainda são susceptíveis a modificações químicas, essas propriedades conferem a esse biomaterial inúmeras aplicações (ANTON-SALES et al., 2018). Apesar das propriedades do colágeno serem favoráveis

para sua utilização como biomaterial, seu uso é limitado devido a sua baixa resistência mecânica. Dessa forma, se faz necessário o estabelecimento de ligações cruzadas no material, ou na incorporação de um outro polímero (PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010).

O colágeno é o principal componente da matriz extracelular, sendo um substrato natural para as células, orientando e estimulando a formação tecidual. Estas características, somadas a biocompatibilidade e estabilidade do colágeno, o tornam atrativo para a confecção de biomateriais de diferentes formas e aplicações, como membranas e esponjas para revestimento de queimaduras, géis para hemostasia e suporte para o crescimento de células (DE MELO et al., 2017). Além disso, destaca-se ainda que o biomaterial que utiliza como matéria prima proteínas como a elastina, fibrina ou colágeno pode oferecer uma vantagem adicional, uma vez que podem ser capazes de interagir positivamente com as células (SORUSHANOVA et al., 2019). O estudo de Fauzi et al., (2016) demonstrou a capacidade do colágeno bovino de ser utilizado em filme, espuma ou hidrogel, visto que ele apresentou propriedades favoráveis que melhoram a quantidade de fibroblasto dérmico humano e a fixação de queratinócitos epidérmicos, o que o torna interessante para aplicação no processo de regeneração tecidual.

3.1.2 Amido

Os polímeros naturais mais utilizados na produção de biomateriais. Entre esses, o amido e a celulose. Um biomaterial pode ser desenvolvido a fim de melhorar as propriedades mecânicas e térmicas e para redução do custo final de polímeros (ABRAL et al., 2019). Nesse contexto, os polissacarídeos também vêm ganhando apreciável interesse para uso no âmbito médico devido a várias de suas propriedades, tais como renovabilidade, biodegradabilidade e por mimetizar os componentes da matriz extracelular, o que os tornam elementos-chave em processos biológicos. Estes biopolímeros também são muito importantes devido a sua solubilidade e propriedades tecnológicas, como gelificação, emulsificação e efeito hidratante, dentre outras (RINAUDO, 2008). Os polissacarídeos são obtidos a partir de fontes microbianas, animais, vegetais ou de algas e, assim como as proteínas, podem ser processados como géis, filmes, partículas e pós (PEREIRA et al., 1998).

O amido é o carboidrato mais abundante encontrado em plantas, estando presente nos tecidos na forma de grânulo. As principais fonte de amido são o milho, a mandioca, o trigo, a batata e o arroz. O amido é formado por dois tipos de polímeros de glicose: amilose, que representa de 20 a 30% do amido; e a amilopectina, representando de 70 a 80% do amido (LI et al., 2019a). A amilose é constituída por unidades de α -D-glucopiranoses unidas entre si por ligações glicosídicas $\alpha(1 - 4)$ caracterizando a parte linear. A amilopectina é formada de unidades α -D-glucopiranoses unidas por ligações do tipo $\alpha(1 - 4)$, parte linear e $\alpha(1 - 6)$, parte não linear (Y; Q; H, 2019).

Uma propriedade físico-química importante do amido é gelatinização. A gelatinização é o processo de transformação do amido granular em pasta viscoelástica. A geletificação ocorre com a adição de água, na quantidade desejada, e subsequente tratamento térmico, resultando em várias estruturas tais como espumas e filmes. Essa versatilidade traduz a utilização do amido como polímero termoplástico (ASHRAF et al., 2019). Sendo assim, o amido constitui-se como fonte promissora para aplicações biomédicas principalmente com a utilização voltada à obtenção de biomateriais devido as suas características de biodegradabilidade, baixo custo de produção e obtenção a partir de recursos renováveis e versatilidade (DAS; UPPALURI; DAS, 2019).

3.1.3 Glicerol

O glicerol é um tri-álcool com três carbonos em sua estrutura. É um líquido incolor com gosto adocicado, sem cheiro e muito viscoso, derivado de fontes naturais ou petroquímicas. A presença de três grupos hidroxila em sua estrutura é responsável pela solubilidade em água e sua natureza higroscópica. É altamente flexível, formando ligações de hidrogênio tanto intra como intermoleculares (VALERIO et al., 2015). Plastificantes como glicerol são capazes de garantir boa qualidade no plástico biodegradável a ser produzido. O plastificante é uma molécula pequena, de baixa volatilidade e de natureza química similar a do polímero usado na constituição do filme. Quando adicionado à solução filmogênica modifica a organização molecular da rede amilácea aumentando o volume livre na molécula (CAZÓN; VÁZQUEZ; VELAZQUEZ, 2019). Essa ação do plastificante causa alterações no plástico biodegradável como o aumento de flexibilidade, extensibilidade e distensibilidade seguido por diminuição na resistência mecânica, temperatura de transição vítrea e barreira a gases e vapor de

água, isso devido à higroscopicidade do plastificante e sua ação na quebra da rede amilácea, aumentando assim as interações amido-plastificante que diminuem a densidade das interações e consequentemente, a coesão da molécula (CHIAOPRAKOBKIJ et al., 2019).

3.1.4 Montmorillonita (MMT)

A montmorillonita (MMT) é um argilo mineral expansível amplamente utilizado na fabricação de nanocompósitos, pertencente ao grupo das esmectitas, que por sua vez apresentam uma estrutura do tipo 2:1. Esta estrutura engloba duas folhas de tetraedros de sílica ligados por moléculas de oxigênio nos vértices e uma folha de octaedros de alumínio ou magnésio ligados nas laterais (BEE et al., 2018). A camada tetraédrica de silícia e a camada octaédrica estão fortemente ligadas de forma covalente e, portanto, são consideradas bastante estáveis. No ambiente interlamelar, é possível encontrar a presença de água e cátions livres, como Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , os quais são responsáveis pelo empilhamento da estrutura lamelar e são passíveis à troca (UL-ISLAM; KHAN; PARK, 2012).

A fórmula química da estrutura uniária da MMT é composta por $\text{Al}_4\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{OH})_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, onde 66,70 % de SiO_2 ; 28,30 % de Al_2O_3 e 5,0 % de H_2O (BHATTACHARYYA; GUPTA, 2008). As camadas de MMT apresentam espessura inferior ao comprimento de onda de luz visível, com cerca de 1 nm e são transparentes, portanto não desviam a luz, sendo resistentes a solventes e a altas temperaturas (LIU; LUO; NIU, 2010). Além disso, possuem características hidrofílicas da superfície, o que permite que a água e outras moléculas polares se intercalem nas galerias dentro das camadas de argila promovendo o inchamento e expansão da superfície (SAJJAD et al., 2019).

Atualmente, utilização de MMT tem atraído inúmeras pesquisas, devido a sua alta capacidade de troca catiônica, capacidade de inchamento e expansão, alta área de superfície, facilidade de disponibilidade, baixo custo, alto grau de intercalação/exfoliação contribuindo diretamente para a melhoria substancial das propriedades nanocompósitas (BOURAKADI et al., 2019; LIU; CATCHMARK, 2019; SAJJAD et al., 2019). Vale ressaltar que a capacidade de troca catiônica é uma propriedade muito relevante das argilas, pois através da troca de cátions é possível alterar quimicamente a MMT, o que interfere diretamente em suas propriedades físico-

químicas. Ademais, as argilas geralmente possuem propriedades plásticas e coloidais e esta característica pode ser utilizada para diversas aplicações tecnológicas (BEE et al., 2018; HE et al., 2013).

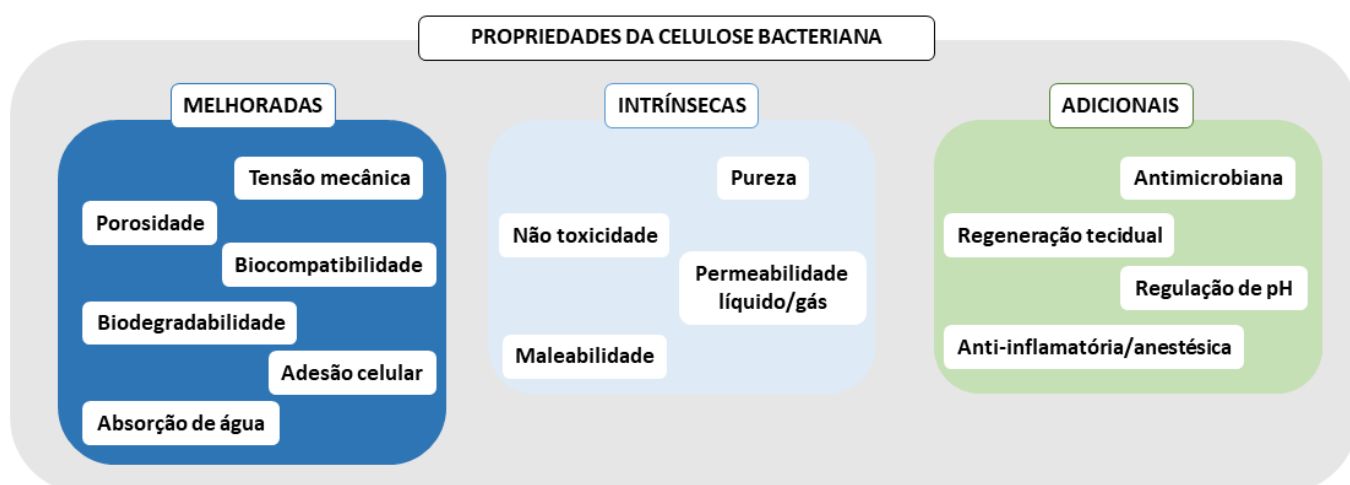
Dentro do contexto de produção de CB, a MMT pode melhorar em até 10 vezes as propriedades mecânicas dos biomateriais produzidos, podendo ser aplicada principalmente para a produção de biocurativos, com propriedades antimicrobianas, de limpeza, proteção da pele, adsorção de bactérias como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, imobilização de toxinas celulares e aprimorar a capacidade de cicatrização de feridas, assim como coagulação do sangue (DE SOUZA et al., 2020; HORUE et al., 2020; MENG et al., 2009). Além disso, associando suas características já citadas às propriedades de regeneração de tecidos da CB, a exploração do desenvolvimento de novos biomateriais para o tratamento de queimaduras, com a utilização destes dois compostos, se faz possível (SAJJAD et al., 2019). Considerando seu potencial, estudos avaliaram a sintetização de compósitos CB-MMT com propriedades antibacterianas e desinfectantes, consolidando a possibilidade de exploração deste argilo mineral para fins terapêuticos, associado à CB (HAYDEL; REMENIH; WILLIAMS, 2007; HODEL et al., 2020b; RUEDA et al., 2011; UL-ISLAM; KHAN; PARK, 2012).

4. POTENCIAIS APLICAÇÕES DA CELULOSE BACTERIANA

Conforme mencionado, a CB é caracterizada como um biopolímero obtido por fermentação a partir de meios ricos em sacarídeos através de rotas de biossíntese realizadas por bactérias de alguns gêneros como: *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, sendo que a forma de obtenção da CB, a torna livre de impurezas (A S KESHK; A RAZEK; SAMESHIMA, 2006; VALERA et al., 2015). A CB é composta por uma membrana gelatinosa extremamente hidratada (WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019b), que é formada na interface ar/meio de cultura, contendo uma pureza maior que a celulose vegetal. Embora sua estrutura molecular seja idêntica à da celulose vegetal, a CB possui maiores graus de pureza, polimerização, cristalinidade, resistência à tração, absorção de água, capacidade de retenção de água e adaptabilidade biológica, oferecendo biocompatibilidade, biodegradabilidade e renovabilidade (WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019b).

A Figura 2 apresenta as propriedades da CB mais relevantes. Mesmo possuindo importantes propriedades, a sua biossíntese e desenvolvimento da produção em grande escala ainda são um grande desafio, e, conforme mencionado anteriormente, apenas uma empresa no Brasil produz em escala industrial ainda incipiente. Contudo, as propriedades da CB conferem a ela e seus derivados um grande potencial e proporcionam um futuro promissor em vários campos, a exemplo do campo biomédico/médico, de alimentos, eletrônico e de cosméticos, estimulando a sua produção em atendimento a estes e a outros setores passíveis de aplicação.

Figura 2. Principais propriedades da celulose bacteriana.



Fonte: Adaptado de Portela et al. (2019b).

4.1 Aplicação na área biomédica

Na área biomédica, o interesse no desenvolvimento de novos biomateriais biodegradáveis e biocompatíveis tem aumentado no campo da engenharia de tecidos, principalmente se tratando da necessidade de promover melhorias aos processos de regeneração tecidual, bem com suas funções. Dentro desse contexto, sistemas de liberação de fármacos e *scaffolds*, por exemplo, tem sido foco de pesquisas científicas com a finalidade de promover melhorias aos processos de regeneração de tecidos e aumento da qualidade de vida das pessoas que necessitam deste tipo de tratamento (BARUD et al., 2016). O desenvolvimento de biocurativos à base de CB permite a sua utilização no processo de cicatrização por conta da sua favorável característica de possibilidade de incorporação de componentes ativos que auxiliam nesse processo,

promovendo o controle de infecções e atuando não apenas como mecanismo de proteção, mas fornecendo um microambiente propício para a cura (NOH et al., 2019).

No processo de bioestimulação, o uso de membranas bioativas (com base biopolimérica impregnada com substâncias ativas) como cobertura para feridas tem mostrado efeitos satisfatórios no auxílio ao processo cicatricial quando produzidas a partir de biomateriais que apresentam características com caráter biodegradável e sustentável (ADUSUMALI et al., 2006). A superfície das membranas de CB pode ser modificada, formando conjugados de CB com biomoléculas distintas para finalidades específicas, com funcionalidades adaptadas para melhorar a regeneração tecidual ou aumentar a adesão celular. Qiu, Qiu, Cui, & Wei (2016), demonstraram em seu trabalho que o tratamento de feridas cutâneas com membranas CB exibiu uma maior eficiência em comparação com a gaze de *petrolatum* convencional. Outros estudos já demonstram a aplicação da CB como substituto temporário da pele no tratamento de queimaduras e feridas de difícil cicatrização (CACICEDO et al., 2016; DUGAN; GOUGH; EICHHORN, 2013; PETERSEN; GATENHOLM, 2011). Além da aplicação como biocurativo, a CB pode ainda ser infundida com células e fatores de crescimento, cultivada e implantada para induzir e direcionar o crescimento de um tecido novo e sadio. Nestes casos, peptídeos incorporados ao biomaterial possuem uma sequência de reconhecimento Ácido argino-glicino-espártico (RGD), motivo peptídico mais comum responsável pela adesão celular à matriz extracelular. Esta sequência será responsável, além do desencadeamento da adesão de células, pelo direcionamento seletivo à respostas celulares específicas, contribuindo para o processo de regeneração (ANDRADE et al., 2010).

As queimaduras se encontram entre as maiores causas de danificação cutânea, ocupando o segundo lugar entre os acidentes que mais comumente ocorrem no mundo (AKKAM et al., 2020; CHU; BEGAJ; PATEL, 2018; LAGUS et al., 2013). As lesões por queimaduras ocorrem em todos os grupos etários e têm extensão, profundidade e etiologias variadas. De acordo com a Sociedade Brasileira de Queimaduras (SBQ), cerca de 1 milhão de pessoas são vítimas de queimaduras, todos os anos, no Brasil (SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUEIMADURAS, [s.d.]). Desses, 200 mil são por substâncias inflamáveis, o que inclui álcool, e 40% das vítimas são crianças de até 10 anos. É previsto ainda, por conta da pandemia da COVID-19 e aumento do uso de álcool pelas pessoas, o aumento de pacientes com lesões de queimaduras em cerca de 25%, nos sistemas

público e privados de saúde (FOLHA VITÓRIA, 2020). De acordo com o Comitê Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC), as queimaduras são consideradas um importante problema de saúde pública. Dados do Ministério da Saúde indicam que a cada ano o Sistema Único de Saúde (SUS) gasta cerca de 55 milhões de reais para o tratamento de vítimas de queimaduras (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2018a). Os pacientes que sofrem lesões por queimadura podem requerer autotratamento ou nenhum, até cuidados mais intensivos, cirúrgicos, dependendo da gravidade. O tratamento das lesões por queimaduras continua sendo um grande desafio aos profissionais da saúde no que se refere ao elevado potencial para desenvolver infecções, bem como pelo difícil controle da dor durante o procedimento de troca dos curativos (MOREIRA et al., 2013).

A Portaria nº 5, publicada no Diário Oficial em 25 de janeiro de 2018 (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2018b), define o curativo de biocelulose como uma tecnologia que pode ser utilizada em casos de queimaduras superficiais e profundas, lesão por pressão, áreas doadoras de enxertos e úlceras arteriais e venosas. É uma película que funciona como um substituto temporário de pele humana, absorvendo o fluido inflamatório, protegendo o ferimento em um tempo menor e com menor custo quando comparada aos outros recursos oferecidos para esse tipo de tratamento na rede pública. A Tabela de Procedimentos do SUS (SIGTAP) já permite que as unidades públicas de saúde comprem essa tecnologia com recursos do governo, a recomendação da CONITEC, responsável pela avaliação desse produto, é de que não é necessário se criar um procedimento específico para o uso do curativo de biocelulose, ou seja, a utilização desse curativo já é possível dentro da gama de procedimentos curativos disponíveis no SUS, o que demonstra a viabilidade desse projeto (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2018b). Dentro desse contexto, pode-se citar a empresa Biofill Produtos Biotecnológicos, Curitiba-PR, que realiza a comercialização de produtos a base de CB para o tratamento de queimaduras por meio de biocurativos.

O tratamento da queimadura inclui cuidados locais e sistêmicos, variando de acordo com a profundidade, localização corporal e extensão (ŻWIEREŁŁO et al., 2020). O uso de curativos contendo substâncias cicatrizantes e anti-infecciosas é a opção para a terapia local. Os curativos têm por função converter uma ferida aberta e

potencialmente contaminada em uma ferida limpa, protegendo do risco de infecção sem destruir os tecidos viáveis adjacentes. Também permitem a drenagem e controle da exsudação, oferecem à superfície lesada repouso, mantêm discreta pressão para ativar as drenagens venosa e linfática. Desta forma, asseguram cicatrização em menor período de tempo com mínima perda da função (KARLSSON et al., 2020; PICCOLO et al., 2020). A insuficiência venosa crônica é a causa mais comum das úlceras de perna, e ocorre devido à incompetência valvular do vaso, associada ou não à obstrução do fluxo venoso, que pode ser de natureza congênita ou adquirida. Outras condições podem levar à ocorrência de úlceras de perna, tais como: doença arterial obstrutiva periférica, neuropatia periférica, doenças infectocontagiosas, doenças reumatológicas, doenças hematológicas e tumores.

Ainda de acordo com o relatório emitido pela CONITEC (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2018b) os custos e tempo de cicatrização são menores com o curativo de biocelulose quando comparado ao curativo padrão (sulfadiazina de prata) para a cicatrização completa das úlceras venosas de membros inferiores. Mantendo-se o intervalo de troca estima-se, portanto, uma dominância da intervenção de um curativo a base de biocelulose sobre o tratamento padrão. Dessa forma, o impacto orçamentário foi estimado em uma economia de R\$ 56.640.466,46, ao longo de 5 anos (para um único produto avaliado e sem a presença de agentes ativos), com a incorporação da tecnologia de curativo a base de celulose bacteriana para tratamento de úlceras venosas de perna, com redução no tempo de cicatrização e menor número de trocas.

Dessa forma, é importante destacar que o processo de cicatrização torna o manejo de feridas dérmicas um fator preocupante à saúde uma vez que o tratamento destas perturbações pode gerar altos custos financeiros, resistência a antibióticos, altas taxas de septicemia, incapacidade de restaurar a pele como de início, além do impacto ao bem-estar geral do paciente (LIMA; COLTRO; JÚNIOR, 2017). A cicatrização é um fenômeno complexo caracterizado por uma sequência de eventos biológicos que envolvem a organização de células, sinais químicos e matriz extracelular num processo dinâmico e harmônico com o objetivo de garantir a restauração tissular (LIMA; COLTRO; JÚNIOR, 2017). As lesões dérmicas estão entre os problemas mais decorrente com relação a pele. Para que haja um tratamento adequado, é fundamental que se conheça

a origem da lesão e a fisiologia envolvida no processo de cicatrização (LIMA; COLTRO; JÚNIOR, 2017).

Quando a perda tecidual é extensa, o processo de cicatrização pode não ser suficiente para que ocorra a reestruturação da pele, devendo-se considerar, então, tratamento com enxertos e retalhos. Várias técnicas de substituição tecidual foram introduzidas com o intuito de promover a bioestimulação, reduzindo a formação de cicatrizes e acelerando o tempo de cicatrização (LIMA; COLTRO; JÚNIOR, 2017), por propiciar proliferação celular e recuperação da pele, sem causar efeitos danosos ao organismo (JESCHKE et al., 2018; MELNIKOVA et al., 2020; SHPICHKA et al., 2019). Neste processo de bioestimulação, o uso de membranas bioativas como cobertura para feridas tem mostrado efeitos satisfatórios no auxílio ao processo cicatricial quando produzidas a partir de biomateriais que apresentam características com caráter biodegradável e sustentável (STOJKO et al., 2020).

A Tabela 1 apresenta as pesquisas científicas e/ou produção de CB por empresas para utilização em diferentes aplicações biomédicas.

Tabela 1. Aplicações na área biomédica com uso de CB.

APLICAÇÃO	REFERÊNCIAS
<i>Scaffolds</i> para diagnóstico de câncer de ovário	(UL-ISLAM et al., 2019)
Curativo de ferida de queimadura	(KWAK et al., 2015)
<i>Scaffolds</i> para regeneração tecidual	(KHAN et al., 2018)
Desenvolvimento de pele artificial	(SALARI et al., 2018) (CHAWLA et al., 2009)
Vasos sanguíneos artificiais	(KLEMM et al., 2001)
Tratamento de queimaduras, feridas e úlceras através de curativos ou filmes antibacterianas	(LIN et al., 2013) (YANG et al., 1998) (TORGBO; SUKYAI, 2018)
Matriz para liberação controlada de antibióticos e fármacos	(JIPA; STOICA-GUZUN; STROESCU, 2012)

Tratamento de nervos periféricos danificados	(KOWALSKA-LUDWICKA et al., 2013)
Membrana auxiliar em tratamento ortodôntico	(YOSHINO et al., 2013)
Implante meniscal	(BODIN et al., 2007)
Cartilagem artificial	(LOPES et al., 2011)

4.2 Aplicação na área de alimentos

Em relação a área de alimentos, aplicações sugerem o uso da CB em alimentos processados como aditivos de baixa caloria, para utilização como espessantes, estabilizantes, modificadores de textura ou ainda como embalagens para alimentos (SHI et al., 2014). As embalagens produzidas a partir de CB possuem características potenciais a esse tipo de aplicação. Além de serem resistentes à água e biodegradáveis, podem atribuir propriedades antibacterianas e antioxidantes às embalagens alimentícias (GOTTSCHALK, 2021). Dentro desta linha de pesquisa, em trabalho desenvolvido pela Embrapa Agroindústria de Alimentos, nisina foi incorporada à CB com a presença de um antimicrobiano para o controle de *Lysteria monocytogenes* ATCC 19117 em uma embalagem para queijo minas frescal. Essa formulação reduziu a multiplicação da bactéria avaliada em um ciclo logarítmico no queijo Minas Frescal após sete dias de armazenamento sob refrigeração (IBARRA-SÁNCHEZ et al., 2020).

A CB também já foi utilizada para a produção de embalagens comestíveis com potencial antimicrobiano. Filmes de CB e lactoferrina foram produzidos para serem utilizados em contato direto com alimentos altamente perecíveis, especificamente embutidos frescos como modelo de produtos cárneos. Após caracterização quanto à permeabilidade ao vapor de água, propriedades mecânicas e atividade antimicrobiana com relação à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, foi observado que os filmes apresentaram boas propriedades mecânicas e eficiência bactericida, pois, reduziram significativamente a taxa de multiplicação as bactérias avaliadas. Além disso, os autores avaliaram a citotoxicidade dos filmes produzidos em ensaio que utilizou fibroblastos de embrião de camundongo 3T3, não encontrando citotoxicidade relevante contra as

células antes e depois da digestão simulada (um modelo in vitro do trato gastrointestinal foi utilizado para estudar as alterações que ocorrem nos filmes de CB durante a passagem pelo trato gastrointestinal) (PADRÃO et al., 2016).

Em relação à produção de embalagens que fazem contato externo com o ambiente, filmes termoplásticos a base de amido de milho foram produzidos a fim de promover melhorias às propriedades de barreira da CB. Os autores realizaram a incorporação de *nanowhiskers* (tipo de nanofibra de cristal com diâmetro inferior a 100 nm) de CB em nanocompósitos termoplásticos de amido de milho e observaram que estes *nanowhiskers* promoveram um aumento de até 95% na barreira de oxigênio (FABRA et al., 2016).

Além desta aplicação, nas Filipinas, a CB já é amplamente utilizada como sobremesa, sendo obtido por meio de fermentação estática em água de coco, sendo chamado de “nata de coco”. Em outros países asiáticos, a exemplo do Japão, Taiwan e Indonésia, esta finalidade da CB vem ganhando popularidade entre os consumidores. Em estudo no qual foi avaliada a influência de um gel complexo de nano CB e proteína de soja como substitutos de gordura em modelo de sorvete, foi observado que o sorvete produzido se manteve inalterado em sua forma pelo período de 60 minutos, após a retirada do congelador. Esse dado indica que a utilização deste gel melhorou a resistência do sorvete em relação à redução da gordura ao derretimento (GUO et al., 2018).

Diante das possibilidades, é possível afirmar que a aplicação de CB na área de alimentos se caracteriza como promissora para a produção de biomateriais capazes de atuar na proteção de alimentos ou como parte deles, bem como na produção de embalagens para seus armazenamentos ou transporte, contribuindo para a preservação e/ou aumento da vida de prateleira de produtos, bem como contribuindo para a manutenção de características organolépticas dos alimentos.

Na Tabela 2, são apresentadas pesquisas científicas sobre as principais aplicações de CB na área de alimentos.

Tabela 2. Aplicações na área de alimentos com uso de CB.

APLICAÇÃO	REFERÊNCIAS
-----------	-------------

Sobremesa Nata de Coco: CB produzida a partir de água ou leite de coco	(PHISALAPHONG; CHIAOPRAKOBKIJ, 2012)
Nanocelulose bacteriana/proteína de soja: substituto de gordura em modelo de sorvete	(GUO et al., 2018)
Almôndega contendo celulose bacteriana (Nata)	(LIN; LIN, 2006)
Embalagem alimentícia à base de CB e nisina com propriedade antimicrobiana <i>Listeria monocytogenes ATCC 19117</i>	(IBARRA-SÁNCHEZ et al., 2020)
Bionanocompósitos nanocelulósicos de pectina bacteriana como prebiótico contra condições gastrointestinais	(KHORASANI; SHOJAOSADATI, 2016)
Uso de CB para imobilização de enzimas úteis em aplicações alimentares	(WU; WU; SU, 2017) (CHEN; ZOU; HONG, 2015) (BAYAZIDI; ALMASI; ASL, 2018)
Nanopapel de celulose bacteriana e pós-bióticos de bactérias ácidas lácticas para embalagem de carne	(SHAFIPOUR YORDSHAHI et al., 2020)
CB e goma de guar (BC-GG) à base de polivinil pirrolidona - película de hidrogel de carboximetilcelulose (PVP-CMC) como material alternativo de embalagem de alimentos	(BANDYOPADHYAY et al., 2019)

4.3 Aplicação na área eletrônica

Nesta área de aplicação, a CB tem recebido devida atenção por conta principalmente do esgotamento de recursos não renováveis (DE AMORIM et al., 2020). Devido sua estrutura de rede de nanofibras porosas acarretando em uma matriz flexível, a CB pode ser utilizada no desenvolvimento de biomateriais com propriedades desejadas, podendo ser aplicada na produção de células de combustível, membranas eletricamente condutíveis (ecrãs para utilização em e-newspapers, ebooks, tablets, LCD, telemóveis, e etc.), membranas vibratórias de alto falantes/colunas/microfones e na obtenção de materiais mais suaves e flexíveis, devido às suas distintas características,

tais como: elevada reflexibilidade, flexibilidade, baixo peso, facilidade de transporte e amplos ângulos de visão (FONTANA et al., 2017; MOHITE; PATIL, 2014).

Os materiais a base de BC podem ser desenvolvidos por meio da utilização de polímeros condutores, óxido de grafeno, nanofibras ou nanotubos de carbono (BAI et al., 2019). Além destes, outros materiais como paládio e platina podem ser incorporados à CB para produção de células de combustível e reatores catalíticos (PINEDA; MESA; RIASCOS, 2012). Além disso, a caracterização de biocompósitos à base de CB com a adição de compostos isolantes pode atribuir característica de isolamento elétrico a produtos ou equipamentos, trazendo segurança para seu uso. Dessa forma, a CB pode ser modificada e processada pela utilização de materiais capazes de alterar as suas propriedades em resposta a estímulos externos, tais como pressão, temperatura, e alterações em humidade no ambiente (MICHALAK; KRUCIŃSKA, 2016).

Dentro da área eletrônica, um campo amplamente promissor junto ao uso de CB é a nanotecnologia. Com os avanços na tecnologia eletrônica, a exemplo da produção de equipamentos cada vez menores, conseqüentemente a quantidade de energia necessária para operação destes tipos de dispositivos nanotecnológicos também tende a ser menor. Como resultado, o interesse por fontes de energia de pequena dimensão tem vindo a crescer nas últimas duas décadas. Dessa forma, a associação entre processos biotecnológicos e tecnologia de informação contribuem para os avanços de aplicação da CB na área de produção de equipamentos e dispositivos eletrônicos capazes de atuar nas mais diversas áreas do conhecimento, a exemplo da área médica e energética (ZI et al., 2016).

Na Tabela 3, são apresentadas pesquisas envolvendo a incorporação de compostos para a aplicação da CB na área eletrônica.

Tabela 3. Aplicações na área eletrônica com uso de CB.

APLICAÇÃO	REFERÊNCIAS
Ecrãs electrónicos de papel feitos de CB	(SHAH; MALCOLM BROWN, 2005)
Biomaterial isolantes térmico à base de CB	(COSTA et al., 2019)

Células de combustível e reatores catalíticos à base CB, paládio e platina	(PINEDA; MESA; RIASCOS, 2012)
Redes 3D de nanofibras de carbono expansíveis e condutoras, baseadas em nanotubos de carbono de parede múltipla incorporados em películas de CB	(KLEMM et al., 2018)
CB e óxido de grafeno para produção de eletrodos em estrutura 3D, candidatos promissores para uso em dispositivos eletrônicos viáveis e implantáveis para campos médicos e/ou elétricos	(GUAN et al., 2019)
Nanogerador bio-triboelectrónico baseado em CB	(KIM et al., 2017)
Condutores híbridos eletrônicos-iônicos à base de CB para detecção de sinais eletrofisiológicos	(XIE et al., 2018)

4.4 Aplicação na área de cosméticos

A utilização de CB neste setor vem demonstrando ser muito promissora devido às vantagens já explicitadas deste tipo de biomaterial, frente suas propriedades agregadas. Na área de cosméticos, a aplicação de CB envolve a produção de máscaras faciais, lentes de contato, formulações de limpeza facial e esfoliantes faciais (ULLAH; SANTOS; KHAN, 2016). Estudos sensoriais indicam com sucesso a capacidade de utilização de BC na produção de cosméticos, principalmente pela sua favorável capacidade de incorporação de diferentes ativos cosméticos em sua formulação, mais particularmente voltados para o tratamento da pele (PACHECO et al., 2018).

As fibras de celulose permitem a produção de emulsões estáveis sem a necessidade de utilização de surfactantes, compostos normalmente encontrados em produtos cosméticos. Isso demonstra uma vantagem em relação aos produtos convencionais, principalmente se tratando da aplicação em peles sensíveis, visto que as fibras de CB possuem a vantagem de melhorar a compatibilidade de produtos à este tipo de pele (MOHITE; PATIL, 2014). Além disso, por conta do tamanho nano de suas fibras, CB possui alta capacidade de absorção. Quando úmido, pode manter a presença do líquido cerca de dez vezes mais do que as máscaras não-tecido e 100 vezes mais do que seu peso seco (TROVATTI et al., 2012). Outra vantagem que pode ser destacada é a sua

resistência a alterações de temperatura, adição de sais e pH, resultando em formulações com maior estabilidade. A sua utilização na área cosmética também abrange a possibilidade de sua aplicação como composto em pó, aumentando a capacidade de espalhamento e adesão quando em estado solto ou prensado (ULLAH; SANTOS; KHAN, 2016).

Uma das principais aplicações da CB nesta área é na produção de máscaras faciais. As máscaras faciais são formulações cosméticas muito promissoras, pois são eficazes, fáceis e rápidas de aplicar. Além disso, são acessíveis, sendo formuladas como gel, creme, folha, ou pasta, e mostram efeitos instantâneos na pele (NILFOROUSHZADEH et al., 2018). Apesar da possibilidade de utilização de materiais sintéticos para sua produção, o uso de CB se sobressai por conta da alta capacidade hidratante, baixa toxicidade e biodegradabilidade. Além disso, possui boas propriedades adesivas, facilitando o processo de remoção da máscara, bem como permitindo maior adesão a superfícies irregulares da pele, alcançando todos os contornos devido à sua fina espessura e nanofibras de cerca de 20 nm de diâmetro (LUDWICKA et al., 2016; WEI; YANG; HONG, 2011). Vale ressaltar que, apesar de não possuir características intrínsecas de anti-envelhecimento, branqueamento ou de limpeza, a CB possui alta capacidade de incorporação de ingredientes ativos que maximizam seu potencial na indústria cosmética, em associação à suas propriedades físico-químicas (MBITUYIMANA et al., 2021), na formulação de produtos a exemplo de máscaras faciais de tratamento.

Pesquisas e produtos podem ser destacados em relação à exploração do uso de CB na área de cosméticos, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Aplicações na área cosmética com uso de CB.

APLICAÇÃO	REFERÊNCIAS
Substrato composto por biocelulose e ingredientes cosméticos para produção de máscaras faciais com propriedades anti-rugas, esfoliante e de tratamento	(JEAN-YVES LEGENDRE, 2008)
Máscara facial a base de CB e extratos vegetais para o tratamento de pele	(PACHECO et al., 2018)

Máscara facial a base de CB e extrato de própolis para o tratamento de pele acnéica	(DIDIER PEDROSA DE AMORIM et al., 2020)
Máscara facial a base de CB, pó de arroz, aloe vera, vitamina C e azeite de oliva para esfoliação da pele	(HASAN; BIAK; KAMARUDIN, 2012)
Máscara facial a base de CB e glicerina para hidratação da pele	(ALMEIDA et al., 2014)
Base de maquiagem a base de fragmentos de CB	(LIN et al., 2015)
Lentes de contato de hidrogel a base de CB	(LI; WAN; PANCHAL, 2015)

CAPÍTULO 3: ARTIGO 1

Evaluation of Different Methods for Cultivating *Gluconacetobacter hansenii* for Bacterial Cellulose and Montmorillonite Biocomposite Production: Wound-Dressing Applications

Artigo publicado na Revista *Polymers*, 12(2): 267, 2020





Autores: Katharine Valéria Saraiva Hodel, Larissa Moraes dos Santos Fonseca, Isa Moreira da Silva Santos, Jamile Costa Cerqueira, Raimundo Evangelista dos Santos-Júnior, **Silmar Baptista Nunes**, Josiane Dantas Viana Barbosa e Bruna Aparecida Souza Machado

DOI: <https://doi.org/10.3390/polym12020267>

This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Article

Evaluation of Different Methods for Cultivating *Gluconacetobacter hansenii* for Bacterial Cellulose and Montmorillonite Biocomposite Production: Wound-Dressing Applications

Katharine Valéria Saraiva Hodel¹, Larissa Moraes dos Santos Fonseca¹ ,
Isa Moreira da Silva Santos² , Jamile Costa Cerqueira¹,
Raimundo Evangelista dos Santos-Júnior², Silmar Baptista Nunes²,
Josiane Dantas Viana Barbosa¹  and Bruna Aparecida Souza Machado^{1,*} 

¹ University Center SENAI CIMATEC, National Service of Industrial Learning, Laboratory of Pharmaceutical's Formulations, Health Institute of Technologies (ITS CIMATEC), Salvador 41650-010, Brazil; katharine.hodel@fbter.org.br (K.V.S.H.); larissa.fonseca@fbter.org.br (L.M.d.S.F.); jamicosta@msn.com (J.C.C.); josianedantas@fieb.org.br (J.D.V.B.)

² University Center SENAI CIMATEC, National Service of Industrial Learning, Salvador 41650-010, Brazil; isamoreira@outlook.com.br (I.M.d.S.S.); rjs.evangelista@gmail.com (R.E.d.S.-J.); silmar@fieb.org.br (S.B.N.)

* Correspondence: brunam@fieb.org.br; Tel.: +55-(71)-3879-5624

Received: 1 December 2019; Accepted: 1 January 2020; Published: 26 January 2020



Abstract: Bacterial cellulose (BC) has received considerable attention due to its unique properties, including an ultrafine network structure with high purity, mechanical strength, inherent biodegradability, biocompatibility, high water-holding capacity and high crystallinity. These properties allow BC to be used in biomedical and industrial applications, such as medical product. This research investigated the production of BC by *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 using different carbon sources (glucose, mannitol, sucrose and xylose) at two different concentrations (25 and 50 g·L⁻¹). The BC produced was used to develop a biocomposite with montmorillonite (MMT), a clay mineral that possesses interesting characteristics for enhancing BC physical-chemical properties, at 0.5, 1, 2 and 3% concentrations. The resulting biocomposites were characterized in terms of their physical and barrier properties, morphologies, water-uptake capacities, and thermal stabilities. Our results show that bacteria presented higher BC yields in media with higher glucose concentrations (50 g·L⁻¹) after a 14-day incubation period. Additionally, the incorporation of MMT significantly improved the mechanical and thermal properties of the BC membranes. The degradation temperature of the composites was extended, and a decrease in the water holding capacity (WHC) and an improvement in the water release rate (WRR) were noted. Determining a cost-effective medium for the production of BC and the characterization of the produced composites are extremely important for the biomedical applications of BC, such as in wound dressing materials.

Keywords: bacterial cellulose; biocomposites; montmorillonite; wound dressing; ex situ production; carbon sources; *Gluconacetobacter hansenii*

1. Introduction

Bacterial cellulose (BC) is a natural biopolymer that is achieving worldwide attention because of its simple and feasible production technology. BC has the same chemical formula of plant cellulose (C₆H₁₀O₅)_n with β-D-glucopyranose units interlinked by intermolecular hydrogen bonds [1,2]. However, unlike plant cellulose, BC has an ultrafine network structure with high porosity and thinner

fibrils (nanometers sized). Moreover, BC possesses distinguished features, such as high purity (free of lignin, hemicellulose, and pectin), high degree of polymerization, high crystallinity, high water content, high mechanical stability and great chemical modifying ability [3–6]. These unique characteristics make BC a promising alternative to plant-derived cellulose for several biomedical applications being widely studied, including wound dressing materials [7–9].

Development and application of natural polymer-based wound dressing has been described in various studies and patents in recent years [10–14]. Traditional dressings, such as gauze, lint, plasters, bandages (natural or synthetic) and cotton wool, have limitations in epidermal or skin damage or burns, as they fail to prevent the growth of microbial infections and provide a moist environment for healing [15]. An ideal dressing not only covers and protects the affected area but also optimizes the wound environment to facilitate healing [9,15]. Biomedical applications of BC have received considerable attention, for example, in wound dressing [16,17], scaffold implants [6] skin and bone tissue engineering [18] and delivery systems of drug [19,20].

The moisture retaining property of BC helps to maintain homeostasis, aid healing, reduce pain, minimize scar formation and increase the epithelialization rate; thus, BC represents a great alternative to traditional dressings [9,15]. Additionally, BC constitutes a great matrix for the synthesis of functional composites due to its huge nanoporous area and the presence of oxygen atoms rich in electrons [15,21–23]. Therefore, some researchers have investigated BC-reinforced polymer composites with different materials, including conducting materials [24], graphene oxide [20], carbon nanotubes [25], ceramics [26], and biopolymers [27], for various biotechnological applications.

In the past few years, polymer nanocomposites with numerous clays have been extensively investigated mainly due to their cost effectiveness and possible applicability in various areas, including structural, electronics, and biomedical industries [28–30]. Montmorillonite (MMT) is a surface-reactive hydroxyl-layered aluminum silicate clay mineral that forms microscopic platinum crystals [31]. MMT is one of the most widely used medicinal clays and has interesting properties for wound dressing applications, such as wound healing and antimicrobial properties, cleansing, skin protection, blood clotting and hemorrhage control in trauma patients [21,32,33]. As dressing material, MMT has been demonstrated by previous studies to be able to enhance the BC wound healing properties by adding to its antibacterial properties and improving its physical-mechanical and thermal properties [21,32,34,35].

Among cellulose producing bacteria, the most effective species are from the *Gluconacetobacter* genus (also named as *Acetobacter*) [36,37]. When these species are grown in a laboratory under static conditions, cellulose forms as a swollen membrane in the air-water interface, which increases in thickness if cultivation time increases [37]. There are several reports of the use of different media and carbon sources in the literature [38–41]. However, the low yield of the static production process and the high production cost of BC have restricted the commercial efficacy of BC. Finding an optimal culture medium and appropriate growth conditions that facilitate higher yields of cellulose would aid in the viability of this technology in an industrial situation.

Therefore, in this study, we evaluated BC membrane production by *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 under static conditions using different carbon sources (glucose, sucrose, maltose, and xylitol) at different concentrations. The BC produced was used to synthesize BC-MMT biocomposites with 0.5, 1, and 2% MMT to produce a biomaterial with enhanced physical-mechanical properties for biomedical field applications as a dressing material. The properties of the BC-MMT composites, including mechanical strength, thermal stability, water holding capacity (WHC), and water release rate (WRR), were investigated to determine their suitability for applications in various fields. The results demonstrated that the use of a clay mineral such as MMT improves the physical-mechanical properties of BC, making it able to be used as wound dressing. These findings elucidate BC-MMT composites as a promising alternative for various medical treatments such as wound healing and repair of damaged tissue.

2. Materials and Methods

Figure 1 illustrates the complete methodology used in the production of the BC and BC-MMT biocomposites. BC was produced by inoculating *G. hansenii* ATCC 23769 in modified HS-media until BC membrane production was observed (14 days). The BC membrane was submitted to purification processes and dried for 24 h, then the pure and dried BC membrane was exposed to Cloisite 20A (MMT) to form the BC-MMT biocomposite moisture. The BC-MMT moisture was dried at room temperature for 5 days and characterized in terms of their physical and barrier properties, morphologies, and thermal stabilities.

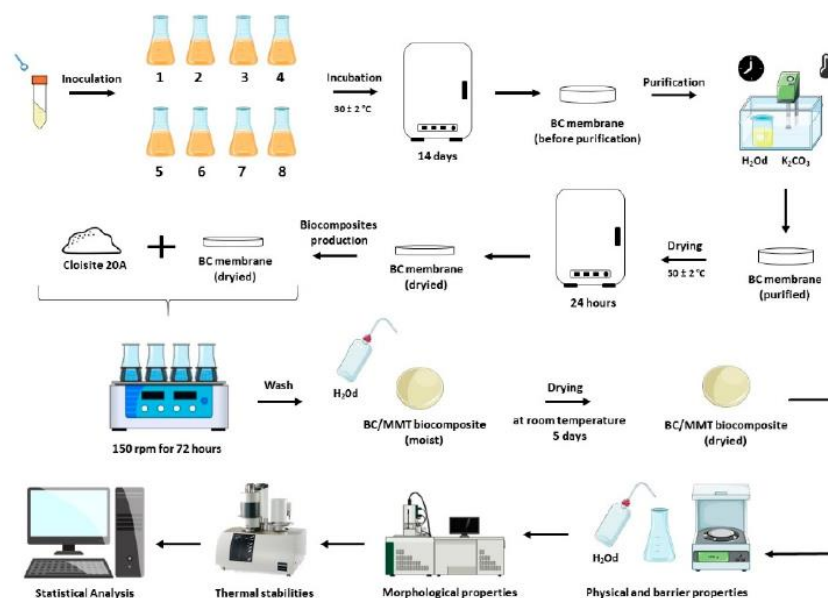


Figure 1. Complete methodology used for BC and BC-MMT biocomposite production and characterization.

2.1. Bacterial Strain, Culture Media and Production Kinetics

The *G. hansenii* strain (ATCC 23769), obtained from the Tropical Culture Collection (CCT)—André Tosello Foundation, was used in the static fermentation process to obtain BC. The culture was grown in modified Hestrin-Schramm (HS) media containing 25 or 50 g·L⁻¹ carbon source (glucose, mannitol, sucrose, and xylose), 5 g·L⁻¹ yeast extract, 3 g·L⁻¹ peptone, and 2 g·L⁻¹ KH₂PO₄ (Table 1). All the culture media were sterilized (121 °C, 15 min) and incubated at 30 °C for 14 days. BC production kinetics were evaluated (OD₆₀₀) until BC production was observed.

2.2. BC Purification, Yield Calculation and Dry Film Formation

BC membranes were purified by alkaline treatment with potassium carbonate (K₂CO₃). The membranes were washed twice with distilled water at 80 °C for 1 h to remove impurities from the culture medium. Then, the membranes were treated with 0.3 mol·L⁻¹ K₂CO₃ aqueous solution at 80 °C for 1 h and washed with distilled water until a neutral pH was obtained. The purified BC membranes were dried at 50 °C for 24 h and weighed before and after drying.

Table 1. Media components and concentration.

Medium Components	Culture Medium (% w/v)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Glucose	25.0	50.0	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	25.0	50.0	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	25.0	50.0	-	-
Xylose	-	-	-	-	-	-	25.0	50.0
Peptone	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Yeast extract	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
KH ₂ PO ₄	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

Legend Table 1: (-) Not added.

2.3. Preparation of the BC-MMT Biocomposites

The BC-MMT biocomposites were produced as previously described by Perotti et al. [19]. MMT (Cloisite 20A) was vigorously crushed in a crusher (Turrattec TE-102) for 10 min to produce a homogeneous suspension with smaller particles. The BC-MMT nanocomposites were prepared by mixing BC and MMT suspensions in a mechanical shaker at 150 rpm for 72 h. The biocomposites were removed from the beakers, washed with deionized water and dried at room temperature for 5 days. The MMT proportions in the BC-MMT composites were 0.5, 1.0 and 2.0%; the samples were labeled as bacterial cellulose BC (sample without MMT), BC-MMT0.5, BC-MMT1, and BC-MMT2, respectively (Table 2).

Table 2. Sample name and montmorillonite (MMT) concentration of biocomposites.

Sample Name	MMT Concentration (%)
BC	0.0
BC-MMT0.5	0.5
BC-MMT1	1.0
BC-MMT2	2.0

2.4. BC and BC-MMT Biocomposite Characterization

2.4.1. Water Activity and Water Absorption Capacity

The measurements of water activity (a_w) were performed using a Decagon (Novasina, Lab Master a_w , Switzerland) at a temperature of 25 °C. The equipment software applied an equation to evaluate the “actual balance” [$a_w = \text{moisture in the balance sheet} = \text{actual balance} (\%)/100$] [42]. The analyses were performed in triplicate.

The water absorption capacity (WAC) of the membranes (biocomposites) was assessed using 1.5-cm-diameter samples. The initial dry mass was obtained after drying at 50 °C ± 2 °C for 2 h. The specimens were immersed in 50 mL of distilled water for 2, 24, 48, 66 and 72 h. After the predetermined intervals, the specimens were removed, and the excess water was absorbed on filter paper for 1 min. The hydrated films were reassessed. The rehydration rate was calculated according to Equation (1):

$$\text{WAC} = (\text{water mass removed along drying (g)})/(\text{dried mass of the sample (g)}) \quad (1)$$

2.4.2. Grammage and Thickness

Grammage was determined according to Almeida et al. [43]. A 2-cm² area of each film was weighed on an analytical balance to determine sample mass. The weight was calculated as the ratio between the mass found and the area. The analyses were performed in triplicate. The thickness of the films was evaluated by analyzing the mean thickness of ten measurements at random positions of

each respective formulation using a flat point digital micrometer (Digimes; Ip40, São Paulo, Brazil; 0.001-mm resolution).

2.4.3. Water Holding Capacity and Water Release Rate

The ability of the films to conserve water was evaluated by the water holding capacity (WHC) according to Schrecker and Gostomski with adaptations [44]. The membranes were cut into circular specimens (2 cm² in diameter), and their initial dry weight (Pd) was measured. Then, the membranes were immersed in deionized water for 48 h. The swollen membranes were then rapidly dried with filter paper to remove excess surface water and placed in open Petri dishes at room temperature. The membranes were removed from the plates every 24 h to be weighed (Pm) with a total analysis time of 96 h. The WHC was defined by Pm divided by Pd. To determine the water release rate (WRR), the wet masses of the samples were measured following continuous weighing of the samples stored under ambient conditions at different time intervals until a constant mass was obtained. The mass obtained at different time intervals was expressed as a function of time [21]. The WHC and WRR analyses were performed in triplicate.

2.4.4. Thermogravimetric Analysis (TGA)

Thermogravimetric analysis (TGA) was carried out on a Q50 thermogravimetric analyzer (TA instruments, Bavaria, Germany). For this analysis, approximately 8 mg of each sample was placed in a platinum crucible at a heating rate of 10 °C min⁻¹ from 25 °C to 1000 °C under a nitrogen flow (30 mL min⁻¹), according to Machado et al. [45]. Differential thermogravimetry (DTG) curves were calculated from the TGA results.

2.4.5. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy (SEM) (BX-51; Olympus, Tokyo, Japan) was used to study the surface morphology and elements of the nanocomposites. The samples were manually fixed using tweezers (PELCO1 Tweezers) with aluminum metal surfaces covered with carbon double-sided tape, called stubs, according to that previously described by Machado et al. [46]. Due to the need for interaction of the electron beam with the samples, the method was performed by coating deposition of metallic gold ions (sputtering). The samples were metalized in gold in a "Sputter oater" from Balzers (SCD 50; BAL-TEC, Grand Island, NY, USA). Then, the stubs containing the metallic samples were stored in plastic boxes (storage boxes) and double sealed with Parafilm (PARAFILM1 M) to prevent moisture absorption. The samples were analyzed at different magnifications (Voltage 12 kV, Working Distance 12 mm, Spot size 44, Vacuum Mode HV).

2.5. Statistical Analysis

The results are expressed as the mean ± standard deviation (n = 3). For the statistical analysis, the program Statistica 6.0 from StatSoft (Tulsa, OK, USA) was used. Analysis of variance and Tukey's test were used to identify significant differences between the means ($p < 0.05$) of the investigated parameters.

2.6. Experimental Program

Table 3 shows the experimental program of the study, with the analyzed specimens, the tests performed and their respective parameters.

Table 3. Experimental program of pure BC and BC-MMT biocomposite analysis.

Specimen	MMT Concentration (%)	Test Types			
		Physical/Barriers		Morphological	Thermal
BC	0.0	Water Activity	Water Absorption Capacity	Scanning Electron Microscopy	Thermogravimetric Analysis
BC-MMT0.5	0.5	Grammage	Thickness		
BC-MMT1	1.0	Water Holding Capacity			
BC-MMT2	2.0	Water Release Rate			

3. Results and Discussion

3.1. Effect of Different Carbon Sources on Cellulose Yields

Due to its unique properties, BC has drawn attention from industries exploring novel strategies for improving BC production. Unfortunately, large-scale production and industrialization of BC are limited due to the low-cost effectiveness of cultivation in traditional synthetic media and static cultures. As a result, numerous efforts have been made to develop new methods for BC production. As described in different studies, BC production can be greatly influenced by a range of variants, such as bacterial strain, reactor type, pH, temperature, aerobic conditions, and nutrient concentration in the culture media [39,40,47–50]. Among these nutrients, the influence of the carbon sources has been the object of continuous studies [49,50]. The present study highlights the ability of *G. hansenii* ATCC 23769 to metabolize several carbon sources in modified HS media and the effects on cellulose production. The bacteria were incubated for 14 days, which is the time until the first BC production was observed, and cellulose was extracted to examine the yields. Figure 2 shows the bacterial growth over time.

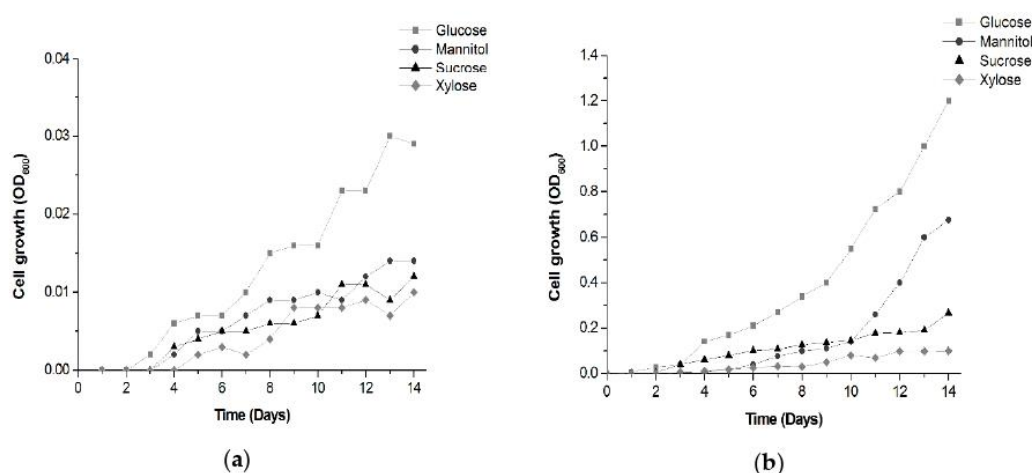


Figure 2. Effect of different carbon sources at 25 g·L⁻¹ (a) and 50 g·L⁻¹ (b) concentrations on bacterial growth over time. BC was fermented by static culture for a 14-day period.

Bacterial growth was observed in all media as expected, since *G. hansenii* is able to assimilate various sugars [37,47,51]. However, better growth (optical density, OD₆₀₀) was observed in media with higher carbon concentrations, especially glucose-containing media (Figure 2b). The results are in agreement with other findings demonstrating that *G. hansenii* exhibits better growth than other *Gluconacetobacter* species in glucose-containing media due to its ability to direct its energy towards cell growth instead of polysaccharide production [52,53].

Regarding BC production, BC yields were observed starting on day 14 only in media with glucose in 50 g·L⁻¹ concentration (14.72 g of purified BC) (Figure 3). Media containing mannitol at the same concentration produced BC yields only after 20 days of incubation. BC yields were not observed in media containing sucrose and xylitol as carbon sources at the pre-established concentrations. BC is a

biopolymer produced from hexose phosphate generated by phosphorylated exogenous hexoses or indirectly via the pentose cycle and gluconeogenic pathway [54].

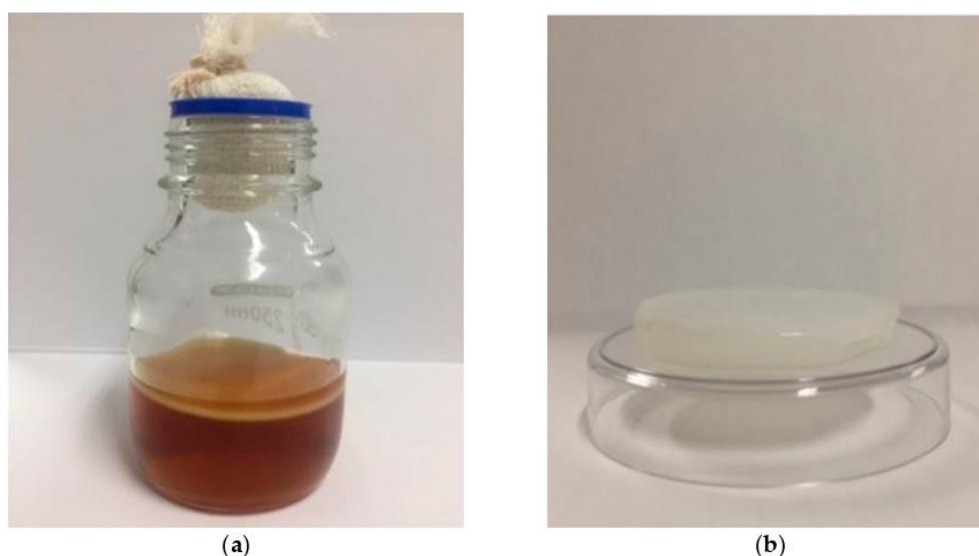


Figure 3. BC produced by *G. hansenii*: (a) BC produced in glucose-containing media after a 14-day incubation period; (b) pure BC membrane after purification process.

Four sugars were used in this study: glucose, mannitol, sucrose, and xylose. Only glucose and mannitol are hexose sugars and produced cellulose yields. The results are consistent with the observations by Rani et al., Molina-Ramírez, and others [41,55,56], who indicated that BC production is affected by carbon source type and concentration (Table 4).

Table 4. Comparison of reports of BC production by *G. hansenii* in various media.

Microorganism	Carbon Source	Supplementary Materials	Culture Time (Days)	Culture Method	Reference
<i>G. hansenii</i> ATCC 23769	Fructose	Glacial acetic acid	7	Static	[57]
<i>G. hansenii</i> ATCC 23769	Glucose	-	10	Static	[58]
<i>G. hansenii</i> ATCC 23769	Glucose	Galactose Cellulose nanofibril	7	-	[59]
<i>G. hansenii</i> ATCC 23769	Glucose	Nanoclay xGnP	9	Static/Agitated	[60]
<i>G. hansenii</i> ATCC 23769	Mannitol	D-(+)-glucose Dextrin	7	Static	[61]
<i>G. hansenii</i> ATCC 23769	Glucose	-	5	Static	[62]
<i>G. hansenii</i> ATCC 23769	Mannitol	-	14	Agitated	[63]
<i>G. hansenii</i> NCIM 2529	Sucrose Glucose	CaCl ₂	5	Agitated	[64]
<i>G. hansenii</i> UCP 1619	Acetylated glucose Molasses	Corn steep liquor	10	Static	[65]
<i>G. hansenii</i> CGMCC 3917	Glucose	Hydrolysate of waste beer yeast	10	Static	[66]

Hutchens et al. [67] evaluated the effects of glucose and mannitol on BC production by *G. hansenii*. In that work, the BC membranes started to appear after 22 days of fermentation. However, these findings show that bacteria produced higher BC yields in mannitol-containing media. Rukka et al. [47] reported similar results comparing media containing glucose, mannitol, and fructose for BC production. In a 7-day *G. xylinus* fermentation period, those findings reveal glucose and mannitol as better carbon sources; however, bacteria produced more BC in mannitol-containing media with 13.5 and 16 mg of cellulose mass production. In a comparative study, Kawano et al. [52] demonstrated that *G. hansenii*

presented a twice the growth of *G. xylinum*, while the cellulose synthesis by *G. xylinum* was higher in glucose-containing media; these findings suggest that *G. hansenii* directs its energy towards cell growth, while *G. xylinum* spends its energy on BC production. The difference in BC production using different carbon sources by *Gluconacetobacter* strains is probably because these species have a major number of glucose metabolic pathways to transform glucose into energy for general activities through oxidative metabolism [54]. It is important to mention that there are other factors in addition to carbon sources that influence BC production, such as media pH, nitrogen source, temperature and static or shaking conditions, which are crucial for process optimization [50,55,68].

Our work demonstrates that in modified HS media, *G. hansenii* ATCC 23769 produces higher BC yields in glucose-containing media. An interesting fact is that sucrose and xylose did not lead to any BC production. Since sucrose is a disaccharide composed of two hexose sugars (glucose and fructose), BC synthesis using this sugar requires an additional metabolic step to catalyze the sucrose into glucose and fructose to achieve cellulose production, but greater than 14 days of incubation are required to start producing BC [68]. Molina-Ramírez et al. and Ruka et al. [47,56] have reported low levels of cellulose after an initial incubation period followed by high levels after some days, indicating an increased lag period for cellulose production. In contrast to hexoses, xylose is a poor carbon source for cellulose production by *Gluconacetobacter* species. Ishihara et al. [69] have reported that *G. xylinum* oxidizes d-xylose to d-xylonic acid, which causes very low pH conditions that are unfavorable for bacterial growth and cellulose production. In this work, xylose would become a utilizable substrate for bacterial strains if xylose-isomerase was added to the medium.

3.2. Effect of Different MMT Concentrations on BC Properties

As previously described, the BC produced was used to develop BC-MMT biocomposites. Flexible membrane formulations of BC-MMT biocomposites were evaluated based on the following features: physical properties (grammage, thickness, a_w , and water absorption), barrier properties (WHC and WRR), TGA, and morphological properties (SEM) (Table 5, Figures 4–6).

Pure BC exhibited an a_w value of 0.479 with significant differences ($p < 0.05$) compared with the BC-MMT formulations, which presented higher values ranging from 0.516 to 0.529 (Figure 4a). Moreover, a slight decrease in the a_w values was noted in the samples with higher MMT concentrations. The interactions formed in the BC-MMT composite caused an increase in the free water content. In this case, the presence of MMT potentially significantly contributed to this finding. This notion can be justified because if clay is lacking in the formulation, the bonds between the polymers are stronger. Therefore, there is less water available. This fact directly influences the mechanical properties of the materials, since the main functional properties (mechanical and barrier properties) of these hydrophilic materials depend on their water content, as previously described in other studies [42,70]. Several studies have demonstrated that MMT influences the a_w in films [71–73]; however, Azevedo et al. [73] reported that the free water in whey protein isolate films decreased when MMT is incorporated, and only one sample presented higher a_w values compared with other samples.

Table 5. Physical and barrier properties of flexible formulations of pure BC and BC-MMT composites. No significant difference between values with the same superscript letter ^(a,b,c) in a column ($p > 0.05$), according to Tukey's test with 95% confidence.

Sample	Water activity	Grammage (g m ⁻²)	Thickness (mm)	Water Holding Capacity (g _{water} g _{sample} ⁻¹)
BC	0.479 ^b ± 0.002	0.047 ^c ± 0.005	81.250 ^c ± 11.242	87.729 ^a ± 4.032
BC-MMT0.5	0.529 ^a ± 0.002	0.113 ^b ± 0.016	133.667 ^b ± 15.462	46.023 ^b ± 3.497
BC-MMT1	0.519 ^a ± 0.006	0.153 ^{ab} ± 0.045	145.667 ^b ± 8.221	34.550 ^b ± 3.930
BC-MMT2	0.516 ^a ± 0.002	0.209 ^a ± 0.054	162.333 ^a ± 2.571	29.514 ^c ± 7.165

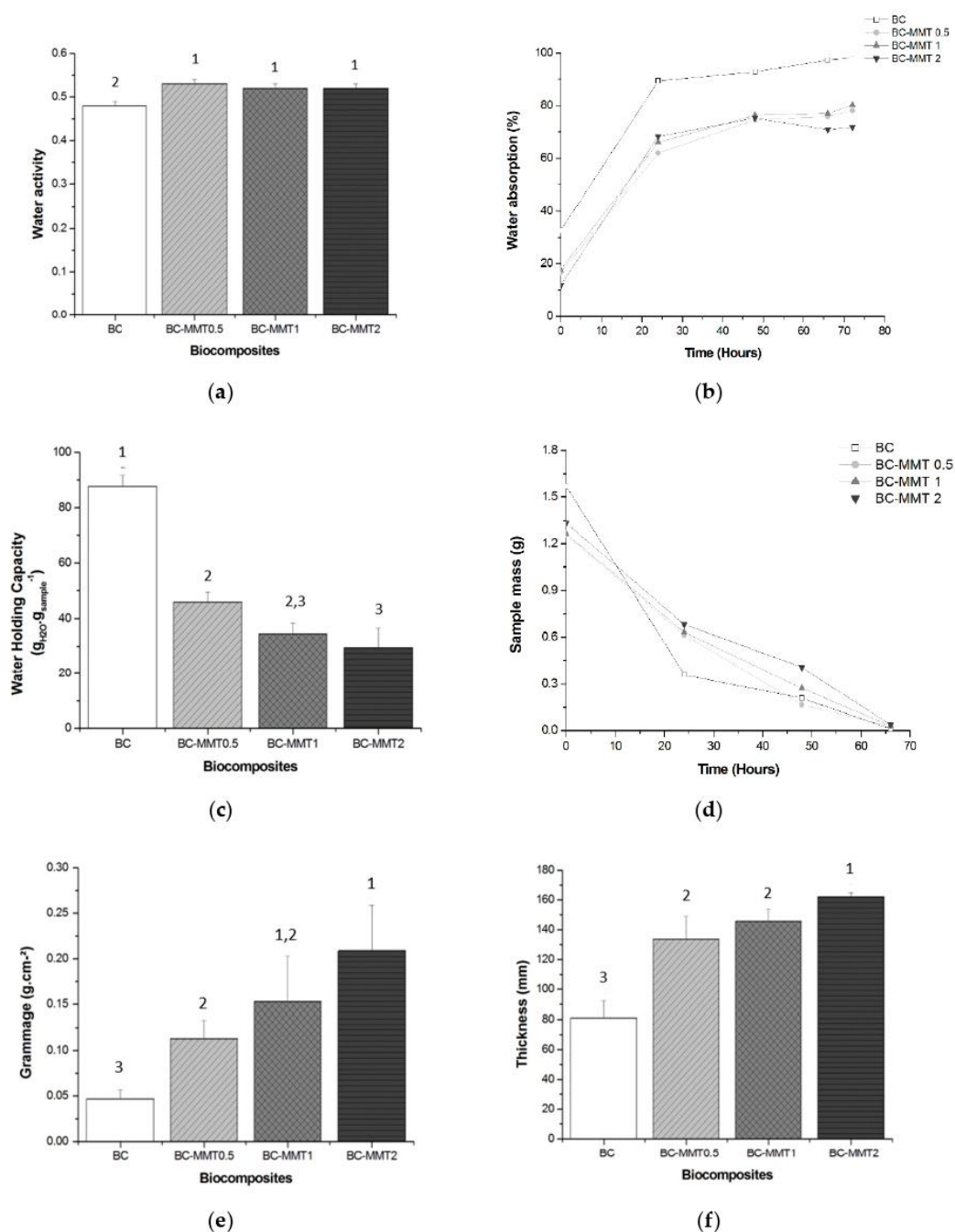


Figure 4. Physical and barrier properties: (a) Water activity (a_w) content; (b) Water absorption; (c) Water holding capacity (WHC); (d) Water release test (WRR); (e) Grammage; and (f) Thickness of pure BC and BC-MMT biocomposites. No significant difference between values with the same superscript numbers (1, 2, 3) in a bar ($p > 0.05$), according to Tukey’s test with 95% confidence.

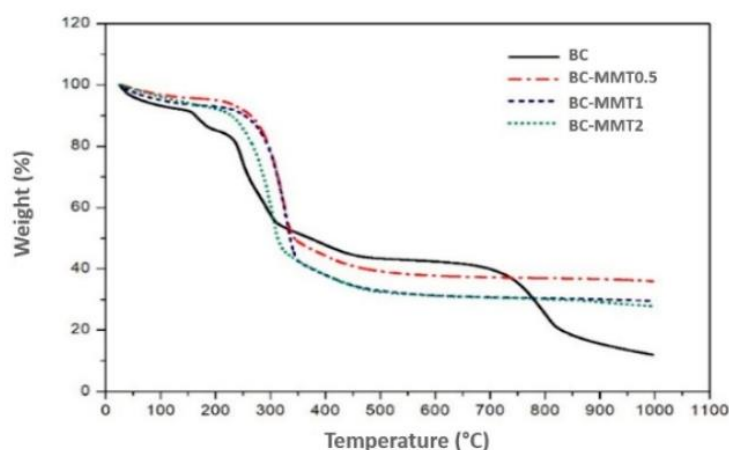


Figure 5. Thermogravimetric analysis (TGA) curves for BC and BC–MMT composites. The composites (BC–MMT1, BC–MMT2 and BC–MMT3) were prepared by impregnation of BC sheets in respective concentrations (0.5, 1 and 2%) of MMT suspensions.

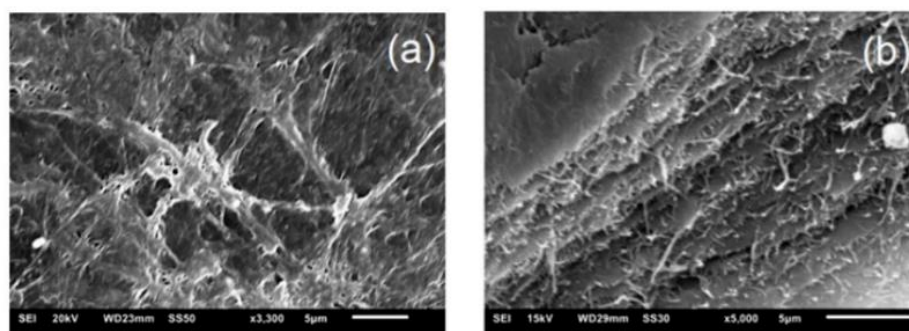


Figure 6. Scanning electron microscopy (SEM) micrographs of the surface and cross-section morphology of pure BC: (a) 3300 \times ; (b) 5000 \times .

Currently, advanced approaches to wound healing have attracted great attention for the use of novel types of dressing that provide a moist environment to the wound area [74]. This property encourages fast and effective healing, which is particularly important when dealing with chronic wounds [8,23]. Moreover, a moist environment facilitates the penetration of active substances and potentially allows for an easy and painless dressing change, protecting the newly formed skin from damage. Due to its physical and barrier properties, such as a high WHC and slow WRR, BC has been extensively studied for use as a wound dressing material [15,21,28]. Therefore, in this study, we investigated the WAC, WHC, and WRR of the pure BC and the BC–MMT composites for use in wound dressing applications.

Our results show that the WAC of pure BC increased compared with that of the BC–MMT composites (Figure 4b). The samples of pure BC recovered approximately 90% of their dry mass in 72 h of water immersion, while the hybrid materials recovered approximately 80%. The deposition of MMT particles on the surface and in the matrix of the BC sheets reduces the empty spaces in the BC–MMT composites, which ultimately results in the lower water absorption and lower WHC of the composites. The MMT absorption and penetration inside the BC matrix increases with the MMT concentration, which subsequently results in decreased WHC in the following order, BC > BC–MMT0.5 > BC–MMT1 > BC–MMT2, as shown in Table 5 and Figure 4c. This finding may be explained by the fact that the clay affects the swelling capacity of the material [31]. Any coefficient that reduces the empty spaces between the layers or pores will directly affect this mechanism. Similar results were

obtained by other authors who observed a diminution in the water absorbed by nanocomposites made with MMT [48,75–78]. Taghizadeh et al. [78] investigated the WAC of sodium montmorillonite clay (MMT-Na) content within cellulose blends. In their work, the blends with MMT-Na content exhibited a significantly reduced WAC rate.

In the present study, the WHC of pure BC was 87.729, which decreased to 46.023, 34.550 and 29.514 for BC–MMT0.5, BC–MMT1, and BC–MMT2, respectively (Table 5). Since the hydroxyl groups of MMT can form strong hydrogen bonds with the hydroxyl groups on cellulose, the interactions between the molecules and the cohesiveness of biopolymer matrix are improved. In addition, the water sensitivity is reduced. The clay produces a tortuous pathway, and the length of the path for water uptake is reduced [78]. The presence of MMT particles in the matrix of the BC sheets reduces the empty spaces in the BC–MMT composites, thus reducing water absorption and the WHC of the composites [21]. Moreover, Majeed et al. and Bakar et al. [79,80] have demonstrated that composites with MMT possesses improved mechanical properties tensile and flexural strength, important indicators to manufacture qualified wound-dressing material.

Figure 4d depicts the WRR values through the variation of sample mass stored under ambient conditions over time. Although the initial content of pure BC is much higher than that found in the BC–MMT biocomposites, there was a drastic reduction, resulting in greater than 80% water loss in 48 h. The water content in the pure BC was insignificant after 60 h. However, while the initial water content in all the BC–MMT biocomposites was inferior, demonstrating a low WHC, the WRR is gradual and uniform compared to that of the pure BC. The presence of the MMT particles helps to protect the absorbed water molecules from evaporation, leading to its retention for a longer period inside the BC sheets. Ul-Islam et al. [81] reported similar results by evaluating the WHC and WRR of BC obtained by ex situ modification. In that report, it took approximately 90 h for the complete evaporation of water from the surfaces of composites made with MMT and chitosan. Since the pore size is smaller in these composites (Figure 6), the penetrated water molecules are more tightly sandwiched between the microfibrils.

Figure 4e shows grammage levels of the pure BC and BC–MMT composites. The pure BC presented grammage of 81.250 g cm^{-2} , while the BC–MMT composites presented levels between 0.113 and 0.209 g cm^{-2} in BC–MMT0.5, BC–MMT1, and BC–MMT2 with increases of 39, 44 and 49%, respectively. The increase in the MMT concentration influenced the grammage property due to increased clay deposits in the polymer matrix. Grammage is directly related to a film's mechanical resistance and barrier properties given that higher grammage levels offer higher mechanical resistance [43]. The mean thickness is another important parameter that must be monitored in films for the maintenance of uniformity, and this parameter allows for the validation of the comparisons of their properties. In this work, the pure BC films presented a thickness of 0.047 mm, while the biocomposites presented higher values of 133.667, 145.667 and 162.333 mm for BC–MMT0.5, BC–MMT1, and BC–MMT2, respectively. The influence of the nanoclay particles impregnated in BC grammage and the thickness properties have also been reported by Tunç et al. [77]. That work shows that an increase in the MMT concentration caused an increase in the film thickness and opacity values of methylcellulose films, whereas the increase in the MMT concentration led to a decrease in water adsorption and water solubility.

TGA is a thermal analysis method in which the mass variation of the sample (loss or gain) is determined as a function of temperature and/or time. TGA allows for monitoring the occurrence of various reactions, such as dehydration, oxidation, and degradation. Figure 5 shows the TGA curves (25–1000 °C) of the pure BC and BC–MMT composites. The graphs show two major weight loss zones. Approximately 9% of the mass loss of the pure BC occurs in temperatures between 80 and 120 °C. This finding is in contrast to the BC–MMT materials that presented a mass reduction of only 5%. The weight loss occurring at 80–120 °C is due to the loss of moisture content and interlayer coordinated water molecules [82]. The relatively higher weight loss for the pure BC at this temperature range may be due to its higher WHC compared with the BC–MMT composites as shown in Table 5. In the second phase, degradation of the main cellulose skeleton is initiated at 225 °C in all samples [82].

The maximum weight loss was recorded for all samples during this phase. The weight loss for the pure BC is approximately 45% during this phase (Figure 5). In this phase, the weight of all the BC-MMT composites was lower than that for pure BC. Additionally, with the increased concentration of MMT, the weight loss decreased by approximately 48, 51 and 53% for BC-MMT0.5, BC-MMT1, and BC-MMT2, respectively. Additionally, Figure 5 shows a difference between the degradation of pure BC and BC-MMT composites along this phase. The first difference is noted at 151 °C and was extended to 177 °C for all the formulations.

3.3. Effect of Different of MMT on Surface Morphology of BC

Figure 6 shows the SEM images of pure BC and BC-MMT biocomposites. Figure 6a presents a proper fibrous structure of the cellulose produced by *G. hansenii* and its high porosity [59]. The alkaline treatment performed for BC purification influenced in the porous membrane as evidenced by Sulava et al. [8]. The membrane sagittal cut (Figure 6b) presents a porous network interconnected via lamellar formation. Porosity is a characteristic that directly influences the adhesion and cellular growth in the dressing material matrix [83].

From the morphological study of the BC samples immersed in the MMT, it was possible to confirm the syntheses of the BC-MMT biocomposites (Figure 7). BC nanofibrils create an expanded superficial area and a high porous matrix that enables the syntheses of a various composites with nanoparticles [60]. The biocomposites SEM micrographs illustrate the three-dimensional arrangement of microfibrils and MMT penetration in BC layers through its porous structure (Figure 7). MMT is impregnated in the BC superficies, and the level of impregnation increases as the MMT concentration increases. The empty spaces between the fibrils in BC-MMT0.5 (Figure 6a) were almost all filled in BC-MMT2 (Figure 7c) due to the increase in particle accumulation. Moreover, the MMT particle size seems to be higher in BC-MMT2. This result could be explained by the particle's agglomeration in the matrix.

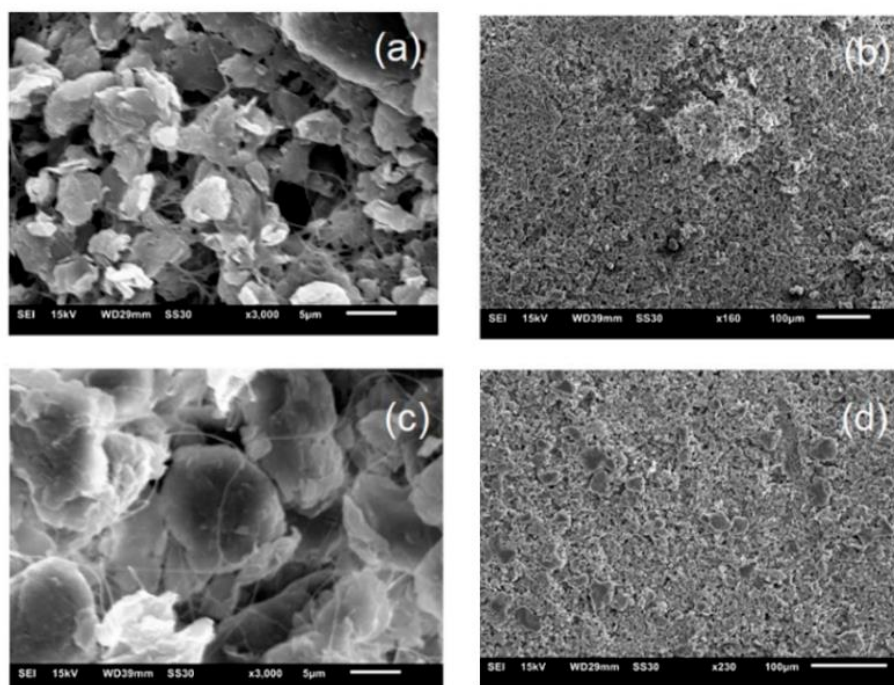


Figure 7. Scanning electron microscopy (SEM) micrographs of the surface and cross section morphology of: (a) $\times 3000$ and (b) $\times 160$ BC-MMT0.5; (c) $\times 3000$ and (d) $\times 230$ BC-MMT2.

4. Conclusions

In this work, BC production by *G. hansenii* ATCC 23769 was evaluated using four different carbon sources at two different concentrations (25 g·L⁻¹ and 50 g·L⁻¹). The BC produced was used to synthesize BC-MMT biocomposites for wound dressing applications. The only production yield was obtained in medium with glucose as a carbon source at 50 g·L⁻¹ concentrations. The BC–MMT composites were prepared through a simple particle impregnation strategy to enhance the physico-mechanical properties of BC. Various analytical techniques, including a_w , WAC, WHC, WRR, grammage, thickness and TGA, were used to characterize the composites. It was observed a slight increase in the a_w values in the samples with higher MMT concentrations, from 0.529 to 0.516. The WAC of pure BC increased compared with that of the BC-MMT composites while the WHC decreased with higher MMT concentrations from 46.023 to 29.514 g_{water} g_{sample}⁻¹. Regarding grammage, the pure BC presented 81.250 g cm⁻², while the BC-MMT composites presented levels between 0.113 and 0.209 g cm⁻². The pure BC films presented a thickness of 0.047 mm, while the biocomposites presented higher values of 133.667, 145.667, and 162.333 mm in higher MMT concentrations. These results show that the physical-mechanical and thermal properties of the composites were significantly improved compared to those of pure BC. Additionally, the BC-MMT composite exhibited improvements in the WRR compared with that of the pure BC. This is an important feature of BC in wound dressing applications. For industrial applications of BC, it is important to find cost-effectiveness conditions. Additionally, the addition of materials, such as MMT, enhances BC properties for biomedical applications. The results reported in this study support the production of BC with good yield while using glucose as carbon source and the composites produced from this polymer with MMT showed interesting results for further analysis of their properties, aiming at their application as wound dressing.

Author Contributions: Conceptualization, J.D.V.B. and B.A.S.M.; Data curation, K.V.S.H., I.M.d.S.S., J.C.C., R.E.d.S.-J. and B.A.S.M.; Formal analysis, K.V.S.H., L.M.d.S.F., I.M.d.S.S., J.C.C. and R.E.d.S.-J.; Funding acquisition, B.A.S.M.; Investigation, S.B.N. and J.D.V.B.; Methodology, K.V.S.H., I.M.d.S.S., J.C.C., R.E.d.S.-J. and B.A.S.M.; Project administration, S.B.N. and B.A.S.M.; Resources, J.D.V.B.; Software, S.B.N.; Supervision, J.D.V.B. and B.A.S.M.; Validation, B.A.S.M.; Writing—original draft, K.V.S.H., L.M.d.S.F., S.B.N., J.D.V.B. and B.A.S.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) and SENAI CIMATEC (Campus Integrado de Manufatura e Tecnologia).

Acknowledgments: The authors are grateful to CNPq (Bolsa de Produtividade DT—BASM), FAPESB and SENAI CIMATEC.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Shah, N.; Ul-islam, M.; Ahmad, W.; Kon, J. Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *98*, 1585–1598. [[CrossRef](#)]
- Shabalkin, I.; Shabalkin, P. New conceptions about structure formation of biopolymers. In *Biotechnology of Biopolymers*; Elnashar, M., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2011; ISBN 978-953-307-179-4.
- Mondal, S. Preparation, properties and applications of nanocellulosic materials. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *163*, 301–316. [[CrossRef](#)]
- Qiao, N.; Fan, X.; Zhang, X.; Shi, Y.; Wang, L.; Yu, D. Soybean oil refinery effluent treatment and its utilization for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Food Hydrocoll.* **2019**, *97*, 105185. [[CrossRef](#)]
- Cherng, J.; Wang, H.; Wu, S. Bioapplications of bacterial cellulose polymers conjugated with resveratrol for epithelial defect regeneration. *Polymers* **2019**, *11*, 1048.
- Dydak, K.; Junka, A.; Szymczyk, P.; Chodaczek, G.; Toporkiewicz, M.; Fijałkowski, K.; Dudek, B.; Bartoszewicz, M. Development and biological evaluation of Ti6Al7Nb scaffold implants coated with gentamycin-saturated bacterial cellulose biomaterial. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0205205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gopi, S.; Balakrishnan, P.; Chandradhara, D.; Poovathankandy, D.; Thomas, S. General scenarios of cellulose and its use in the biomedical field. *Mater. Today Chem.* **2019**, *13*, 59–78. [[CrossRef](#)]

8. Sulaeva, I.; Henniges, U.; Rosenau, T.; Potthast, A. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications. A review. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1547–1571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Ye, S.; Jiang, L.; Su, C.; Zhu, Z.; Wen, Y.; Shao, W. Development of gelatin/bacterial cellulose composite sponges as potential natural wound dressings. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *133*, 148–155. [[CrossRef](#)]
10. Savitskaya, I.S.; Shokatayeva, D.H.; Kistaubayeva, A.S.; Ignatova, L.V.; Digel, I.E. Antimicrobial and wound healing properties of a bacterial cellulose based material containing *B. subtilis* cells. *Heliyon* **2019**, *5*, e02592. [[CrossRef](#)]
11. Boateng, J.; Catanzano, O. Advanced therapeutic dressings for effective wound healing—A review. *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104*, 3653–3680. [[CrossRef](#)]
12. Chuah, C.; Wang, J.; Tavakoli, J.; Tang, Y. Novel bacterial cellulose-poly (acrylic acid) hybrid hydrogels with controllable antimicrobial ability as dressings for chronic wounds. *Polymers* **2018**, *10*, 1323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Cao, Y.M.; Liu, M.Y.; Xue, Z.W.; Qiu, Y.; Li, J.; Wang, Y.; Wu, Q.K. Surface-structured bacterial cellulose loaded with hUSCs accelerate skin wound healing by promoting angiogenesis in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *516*, 1167–1174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Yu, C.-M.; Lien, C.-C. Biocellulose Dressing and Method for Preparing the Same. U.S. Patent 2013/0149368, 13 June 2013.
15. Portela, R.; Leal, C.R.; Pedro, L. Minireview bacterial cellulose: A versatile biopolymer for wound dressing applications. *Microb. Biotechnol.* **2019**, *12*, 586–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Faisal Aris, F.A.; Mohd Fauzi, F.N.A.; Tong, W.Y.; Syed Abdullah, S.S. Interaction of silver sulfadiazine with bacterial cellulose via ex-situ modification method as an alternative diabetic wound healing. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2019**, *21*, 101332. [[CrossRef](#)]
17. Ostadhosseini, F.; Mahmoudi, N.; Morales-Cid, G.; Tamjid, E.; Navas-Martos, F.J.; Soriano-Cuadrado, B.; Paniza, J.M.L.; Simchi, A. Development of chitosan/bacterial cellulose composite films containing nanodiamonds as a potential flexible platform for wound dressing. *Materials* **2015**, *8*, 6401–6418. [[CrossRef](#)]
18. Pang, M.; Huang, Y.; Meng, F.; Zhuang, Y.; Liu, H. Application of bacterial cellulose in skin and bone tissue engineering. *Eur. Polym. J.* **2019**, *122*, 109365. [[CrossRef](#)]
19. Treesuppharat, W.; Rojanapanthu, P.; Siangsanoh, C.; Manuspiya, H.; Ummartyotin, S. Synthesis and characterization of bacterial cellulose and gelatin-based hydrogel composites for drug-delivery systems. *Biotechnol. Rep.* **2017**, *15*, 84–91. [[CrossRef](#)]
20. Luo, H.; Ao, H.; Li, G.; Li, W.; Xiong, G.; Zhu, Y. Bacterial cellulose/graphene oxide nanocomposite as a novel drug delivery system. *Curr. Appl. Phys.* **2017**, *17*, 249–254. [[CrossRef](#)]
21. Ul-islam, M.; Khan, T.; Kon, J. Nanoreinforced bacterial cellulose—Montmorillonite composites for biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *89*, 1189–1197. [[CrossRef](#)]
22. Liu, K.; Catchmark, M. Bacterial cellulose/hyaluronic acid nanocomposites production through co-culturing *Gluconacetobacter hansenii* and *Lactococcus lactis* in a two-vessel circulating system. *Bioresour. Technol. J.* **2019**, *290*, 121715. [[CrossRef](#)]
23. Fu, L.; Zhang, J.; Yang, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92*, 1432–1442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ye, J.; Guo, L.; Zheng, S.; Feng, Y.; Zhang, T.; Yang, Z. Synthesis of bacterial cellulose based SnO₂-PPy nanocomposites as potential flexible, highly conductive material. *Mater. Lett.* **2019**, *253*, 372–376. [[CrossRef](#)]
25. Hosseini, H.; Kokabi, M.; Mohammad, S. Conductive bacterial cellulose/multiwall carbon nanotubes nanocomposite aerogel as a potentially flexible lightweight strain sensor. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *201*, 228–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Dharmalingam, K.; Padmavathi, G.; Kunnumakkara, A.B.; Anandalakshmi, R. Microwave-assisted synthesis of cellulose/zinc-sulfate-calcium-phosphate (ZSCAP) nanocomposites for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *100*, 535–543. [[CrossRef](#)]
27. Li, K.; Jin, S.; Chen, H.; Li, J. Bioinspired interface engineering of gelatin/cellulose nanofibrils nanocomposites with high mechanical performance and antibacterial properties for active packaging. *Compos. Part B* **2019**, *171*, 222–234. [[CrossRef](#)]
28. Torres, F.G.; Arroyo, J.J.; Troncoso, O.P. Bacterial cellulose nanocomposites: An all-nano type of material. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *98*, 1277–1293. [[CrossRef](#)]

29. Perotti, G.F.; Barud, H.S.; Messaddeq, Y.; Ribeiro, S.J.L.; Constantino, V.R.L. Bacterial cellulose-laponite clay nanocomposites. *Polymer* **2011**, *52*, 157–163. [[CrossRef](#)]
30. Alves, L.; Ferraz, E.; Gamelas, J.A.F. Composites of nanofibrillated cellulose with clay minerals: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2019**, *272*, 101994. [[CrossRef](#)]
31. Uddin, F. Montmorillonite: An introduction to properties and utilization. In *Current Topics in the Utilization of Clay in Industrial and Medical Applications*; Zoveidavianpoor, M., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2018; ISBN 978-1-78923-729-0.
32. Sajjad, W.; Khan, T.; Ul-islam, M.; Khan, R.; Hussain, Z.; Khalid, A. Development of modified montmorillonite-bacterial cellulose nanocomposites as a novel substitute for burn skin and tissue regeneration. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *206*, 548–556. [[CrossRef](#)]
33. El Bourakadi, K.; Merghoub, N.; Fardioui, M.; El, M.; Mekhzoum, M.; Meftah, I.; Mokhtar, E.; Qaiss, K.; Bouhfid, R. Chitosan/polyvinyl alcohol/thiabendazolium-montmorillonite bio-nanocomposite films: Mechanical, morphological and antimicrobial properties. *Compos. Part B* **2019**, *172*, 103–110. [[CrossRef](#)]
34. Ambrogio, V.; Pietrella, D.; Nocchetti, M.; Casagrande, S.; Moretti, V.; De Marco, S.; Ricci, M. Montmorillonite—Chitosan—Chlorhexidine composite films with antibiofilm activity and improved cytotoxicity for wound dressing. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *491*, 265–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kevadiya, B.D.; Rajkumar, S.; Bajaj, H.C.; Shankaran, S.; Gosai, K.; Brahmabhatt, H.; Bhatt, A.S.; Barvaliya, Y.K.; Dave, G.S.; Kothari, R.K. Biodegradable gelatin—Ciprofloxacin—Montmorillonite composite hydrogels for controlled drug release and wound dressing application. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2014**, *122*, 175–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Wajid, M.; Ul-islam, M.; Khan, S.; Kim, Y.; Kon, J. Innovative production of bio-cellulose using a cell-free system derived from a single cell line. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *132*, 286–294.
37. Numata, Y.; Kono, H.; Mori, A.; Kishimoto, R.; Tajima, K. Structural and rheological characterization of bacterial cellulose gels obtained from *Gluconacetobacter* genus. *Food Hydrocoll.* **2019**, *92*, 233–239. [[CrossRef](#)]
38. Dórame-miranda, R.F.; Gámez-meza, N.; Medina-juárez, L.Á.; Ezquerro-brauer, J.M. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter entanii* using pecan nutshell as carbon source and its chemical functionalization. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *207*, 91–99. [[CrossRef](#)]
39. Ho Jin, Y.; Lee, T.; Rae, J.; Choi, Y.; Park, C. Improved production of bacterial cellulose from waste glycerol through investigation of inhibitory effects of crude glycerol-derived compounds by *Gluconacetobacter xylinus*. *J. Ind. Eng. Chem.* **2019**, *75*, 158–163. [[CrossRef](#)]
40. Yassini, F.; Bassil, N.; Flouty, R.; Chokr, A.; El Samarani, A.; Boiteux, G.; El Tahchi, M. Culture medium pH influence on *Gluconacetobacter* physiology: Cellulose production rate and yield enhancement in presence of multiple carbon sources. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *146*, 282–291. [[CrossRef](#)]
41. Mohammadkazemi, F.; Azin, M.; Ashori, A. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *117*, 518–523. [[CrossRef](#)]
42. Leal, I.L.; Carolino, Y.; Penha, S.; Romano, P.; Correia, C.; Melo, S.; Guimaraes, D.H.; Dantas, J.; Barbosa, V.; Druzian, J.I.; et al. Development and application starch films: PBAT with additives for evaluating the shelf life of Tommy Atkins mango in the fresh-cut state. *J. Appl. Polym. Sci.* **2019**, *48150*, 1–19. [[CrossRef](#)]
43. Almeida, D.M.; Woiciechowski, A.L.; Wosiacki, G.; Prestes, R.A.; Pinheiro, L.A. Propriedades físicas, químicas e de barreira em filme formados por blenda de celulose bacteriana e fécula de batata. *Polímeros* **2013**, *23*, 538–546. [[CrossRef](#)]
44. Schrecker, S.T.; Gostomski, P.A. Determining the water holding capacity of microbial cellulose. *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27*, 1435–1438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Machado, B.A.S.; Reis, J.H.O.; da Silva, J.B.; Cruz, L.S.; Nunes, I.L.; Pereira, F.V.; Druzian, J.I. Obtaining nanocellulose from green coconut fibers and incorporation in biodegradable films of starch plasticized with glycerol. *Química Nova* **2014**, *37*, 1275–1282. [[CrossRef](#)]
46. Machado, B.A.S.; Silva, R.P.D.; Barreto, G.D.A.; Costa, S.S.; Da Silva, D.F.; Brandão, H.N.; Da Rocha, J.L.C.; Dellagostin, O.A.; Henriques, J.A.P.; Umsza-Guez, M.A.; et al. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0145954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ruka, D.R.; Simon, G.P.; Dean, K.M. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *89*, 613–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

48. Demoling, F.; Figueroa, D.; Ba, E. Comparison of factors limiting bacterial growth in different soils. *Soil Biol. Biochem.* **2007**, *39*, 2485–2495. [[CrossRef](#)]
49. Wang, J.; Tavakoli, J.; Tang, Y. Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods—A review. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *219*, 63–76. [[CrossRef](#)]
50. Ul-Islam, M.; Wajid, M.; Khan, S.; Shah, N.; Kon, J. Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *102*, 1166–1173. [[CrossRef](#)]
51. Biyik, H.; Coban, E.P. Evaluation of different carbon, nitrogen sources and industrial wastes for bacterial cellulose production. *Eur. J. Biotechnol. Biosci.* **2017**, *5*, 74–80.
52. Kawano, S.; Tajima, K.; Uemori, Y.; Yamashita, H.; Erata, T.; Munekata, M.; Takai, M. Cloning of cellulose synthesis related genes from *Acetobacter xylinum* ATCC23769 and ATCC53582: Comparison of cellulose synthetic ability between strains. *DNA Res.* **2002**, *9*, 149–156. [[CrossRef](#)]
53. Valepyn, E.; Berezina, N.; Paquot, M. Optimization of production and preliminary characterization of new exopolysaccharides from *Gluconacetobacter hansenii* LMG1524. *Sci. Res.* **2014**, *2*, 488–496.
54. Ross, P.; Mayer, R.; Benziman, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev.* **1991**, *55*, 35–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Rani, M.U.; Appaiah, A. Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production from *Gluconacetobacter hansenii* UAC09. *Ann. Microbiol.* **2011**, *61*, 781–787. [[CrossRef](#)]
56. Molina-Ramírez, C.; Castro, M.; Osorio, M.; Torres-Taborda, M.; Gómez, B.; Zuluaga, R.; Gómez, C.; Gañán, P.; Rojas, O.J.; Castro, C. Effect of different carbon sources on bacterial nanocellulose production and structure using the low pH resistant strain *Komagataeibacter medellinensis*. *Materials* **2017**, *10*, 639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Lazarini, S.C.; Yamada, C.; Barud, H.S.; Trovatti, E.; Corbi, P.P.; Lustri, W.R. Influence of chemical and physical conditions in selection of *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 strains with high capacity to produce bacterial cellulose for application as sustained antimicrobial drug-release supports. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *125*, 777–791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. de Oliveira, S.A.; da Silva, B.C.; Riegel-vidotti, I.C.; Urbano, A.; de Sousa Faria-Tischer, P.C.; Tischer, C.A. Production and characterization of bacterial cellulose membranes with hyaluronic acid from chicken comb. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *97*, 642–653. [[CrossRef](#)]
59. Fang, L.; Catchmark, J.M. Characterization of cellulose and other exopolysaccharides produced from *Gluconacetobacter* strains. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *115*, 663–669. [[CrossRef](#)]
60. Erbas Kiziltas, E.; Kiziltas, A.; Blumentritt, M.; Gardner, D.J. Biosynthesis of bacterial cellulose in the presence of different nanoparticles to create novel hybrid materials. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *129*, 148–155. [[CrossRef](#)]
61. Stumpf, T.R.; Pértile, R.A.N.; Rambo, C.R.; Porto, L.M. Enriched glucose and dextrin mannitol-based media modulates fibroblast behavior on bacterial cellulose membranes. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33*, 4739–4745. [[CrossRef](#)]
62. Barud, H.D.S.; De Araújo Júnior, A.M.; Saska, S.; Mestieri, L.B.; Campos, J.A.D.B.; De Freitas, R.M.; Ferreira, N.U.; Nascimento, A.P.; Miguel, F.G.; Vaz, M.M.D.O.L.L.; et al. Antimicrobial Brazilian propolis (EPP-AF) containing biocellulose membranes as promising biomaterial for skin wound healing. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2013**, *2013*, 703024. [[CrossRef](#)]
63. Recouvreur, D.O.S.; Rambo, C.R.; Berti, F.V.; Carminatti, C.A.; Antônio, R.V.; Porto, L.M. Novel three-dimensional cocoon-like hydrogels for soft tissue regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* **2011**, *31*, 151–157. [[CrossRef](#)]
64. Mohite, B.V.; Patil, S.V. Physical, structural, mechanical and thermal characterization of bacterial cellulose by *G. hansenii* NCIM 2529. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *106*, 132–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Costa, A.F.S.; Almeida, F.C.G.; Vinhas, G.M.; Sarubbo, L.A. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using corn steep liquor as nutrient sources. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2027. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Feng, X.; Ullah, N.; Wang, X.; Sun, X.; Li, C.; Bai, Y.; Chen, L.; Li, Z. Characterization of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917. *J. Food Sci.* **2015**, *80*, E2217–E2227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Hutchens, S.A.; León, R.V.; O’Neill, H.M.; Evans, B.R. Statistical analysis of optimal culture conditions for *Gluconacetobacter hansenii* cellulose production. *Lett. Appl. Microbiol.* **2007**, *44*, 175–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Mohite, B.V.; Salunke, B.K.; Patil, S.V. Enhanced production of bacterial cellulose by using *Gluconacetobacter hansenii* NCIM 2529 strain under shaking conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2013**, *169*, 1497–1511. [[CrossRef](#)]

69. Ishihara, M.; Matsunaga, M.; Hayashi, N.; Tišler, V. Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. *Enzym. Microb. Technol.* **2002**, *31*, 986–991. [CrossRef]
70. de Andrade, M.R.; Nery, T.B.R.; de Santana E Santana, T.I.; Leal, I.L.; Rodrigues, L.A.P.; de Oliveira Reis, J.H.; Druzian, J.I.; Machado, B.A.S. Effect of cellulose nanocrystals from different lignocellulosic residues to chitosan/glycerol films. *Polymers* **2019**, *11*, 658. [CrossRef]
71. Cheviron, P.; Gouanvé, F.; Espuche, E. Preparation, characterization and barrier properties of silver/montmorillonite/starch nanocomposite films. *J. Membr. Sci.* **2016**, *497*, 162–171. [CrossRef]
72. Masclaux, C.; Gouanvé, F.; Espuche, E. Experimental and modelling studies of transport in starch nanocomposite films as affected by relative humidity. *J. Membr. Sci.* **2010**, *363*, 221–231. [CrossRef]
73. Azevedo, V.M.; Dias, M.V.; de Siqueira Elias, H.H.; Fukushima, K.L.; Silva, E.K.; de Deus Souza Carneiro, J.; de Fátima Ferreira Soares, N.; Borges, S.V. Effect of whey protein isolate films incorporated with montmorillonite and citric acid on the preservation of fresh-cut apples. *Food Res. Int.* **2018**, *107*, 306–313. [CrossRef]
74. Naseri-Nosar, M.; Ziora, Z.M. Wound dressings from naturally-occurring polymers: A review on homopolysaccharide-based composites. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *189*, 379–398. [CrossRef] [PubMed]
75. Cyras, V.P.; Manfredi, L.B.; Ton-That, M.T.; Vázquez, A. Physical and mechanical properties of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposite films. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *73*, 55–63. [CrossRef]
76. Ma, X.; Yu, J.; Kennedy, F.J. Studies on the properties of natural fibers-reinforced thermoplastic starch composites. *Carbohydr. Polym.* **2005**, *62*, 19–24. [CrossRef]
77. Tunç, S.; Duman, O. Preparation and characterization of biodegradable methyl cellulose/montmorillonite nanocomposite films. *Appl. Clay Sci.* **2010**, *48*, 414–424. [CrossRef]
78. Taghizadeh, M.T.; Sabouri, N. Study of enzymatic degradation and water absorption of nanocomposites polyvinyl alcohol/starch/carboxymethyl cellulose blends containing sodium montmorillonite clay nanoparticle by cellulase and α -amylase. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2013**, *44*, 995–1001. [CrossRef]
79. Majeed, K.; Ahmed, A.; Abu Bakar, M.S.; Mahlia, T.M.I.; Saba, N.; Hassan, A.; Jawaid, M.; Hussain, M.; Iqbal, J.; Ali, Z. Mechanical and thermal properties of montmorillonite-reinforced polypropylene/rice husk hybrid nanocomposites. *Polymers* **2019**, *11*, 1557. [CrossRef]
80. Chee, S.S.; Jawaid, M. The effect of Bi-functionalized MMT on morphology, thermal stability, dynamic mechanical, and tensile properties of epoxy/organoclay nanocomposites. *Polymers* **2019**, *11*, 2012. [CrossRef]
81. Ul-Islam, M.; Khan, T.; Park, J.K. Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *88*, 596–603. [CrossRef]
82. Li, S.; Jia, N.; Zhu, J.; Ma, M.; Sun, R. Synthesis of cellulose—Calcium silicate nanocomposites in ethanol/water mixed solvents and their characterization. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *80*, 270–275. [CrossRef]
83. de Oliveira Barud, H.G.; da Silva, R.R.; da Silva Barud, H.; Terçjak, A.; Gutierrez, J.; Lustri, W.R.; de Oliveira, O.B.; Ribeiro, S.J.L. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *153*, 406–420. [CrossRef]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

CAPÍTULO 4: ARTIGO 2

Development of Bacterial Cellulose Biocomposites Combined with Starch and Collagen and Evaluation of Their Properties

Artigo publicado na Revista *Materials*, 14(2): 458, 2021




Autores: **Silmar Baptista Nunes**, Katharine Valéria Saraiva Hodel, Giulia da Costa Sacramento, Pollyana da Silva Melo, Fernando Luiz Pellegrini Pessoa, Josiane Dantas Viana Barbosa, Roberto Badaró e Bruna Aparecida Souza Machado

DOI: <https://doi.org/10.3390/ma14020458>

This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Article

Development of Bacterial Cellulose Biocomposites Combined with Starch and Collagen and Evaluation of Their Properties

Silmar Baptista Nunes¹, Katharine Valéria Saraiva Hodel² , Giulia da Costa Sacramento², Pollyana da Silva Melo³, Fernando Luiz Pellegrini Pessoa¹, Josiane Dantas Viana Barbosa^{1,2} , Roberto Badaró^{1,2} and Bruna Aparecida Souza Machado^{1,2,*} 

- ¹ PPG GETEC, University Center SENAI CIMATEC, National Service of Industrial Learning, SENAI CIMATEC, Salvador 41650-010, Brazil; silmar@fieb.org.br (S.B.N.); fernando.pessoa@fieb.org.br (F.L.P.P.); josianedantas@fieb.org.br (J.D.V.B.); badaro@fieb.org.br (R.B.)
- ² SENAI Institute of Innovation (ISI) in Health Advanced Systems (CIMATEC ISI SAS), University Center SENAI/CIMATEC, SENAI CIMATEC, Salvador 41650-010, Brazil; katharine.hodel@fbter.org.br (K.V.S.H.); giuliacs@hotmail.com (G.d.C.S.)
- ³ Department of Materials, University Center SENAI CIMATEC, National Service of Industrial Learning, Salvador 41650-010, Brazil; pollyanam@fieb.org.br
- * Correspondence: brunam@fieb.org.br; Tel.: +55-(71)-3879-5624

Abstract: One of the major benefits of biomedicine is the use of biocomposites as wound dressings to help improve the treatment of injuries. Therefore, the main objective of this study was to develop and characterize biocomposites based on bacterial cellulose (BC) with different concentrations of collagen and starch and characterize their thermal, morphological, mechanical, physical, and barrier properties. In total, nine samples were produced with fixed amounts of glycerol and BC and variations in the amount of collagen and starch. The water activity (0.400–0.480), water solubility (12.94–69.7%), moisture (10.75–20.60%), thickness (0.04–0.11 mm), water vapor permeability ($5.59\text{--}14.06 \times 10^{-8} \text{ g}\cdot\text{mm}/\text{m}^2\cdot\text{h}\cdot\text{Pa}$), grammage ($8.91\text{--}39.58 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$), opacity (8.37–36.67 Abs $600 \text{ nm}\cdot\text{mm}^{-1}$), elongation (4.81–169.54%), and tensile strength (0.99–16.32 MPa) were evaluated and defined. In addition, scanning electron microscopy showed that adding biopolymers in the cellulose matrix made the surface compact, which also influenced the visual appearance. Thus, the performance of the biocomposites was directly influenced by their composition. The performance of the different samples obtained resulted in them having different potentials for application considering the injury type. This provides a solution for the ineffectiveness of traditional dressings, which is one of the great problems of the biomedical sector.

Keywords: bacterial cellulose; starch; collagen; biopolymers; wound dressing



Citation: Nunes, S.B.; Hodel, K.V.S.; Sacramento, G.d.C.; Melo, P.d.S.; Pessoa, F.L.P.; Barbosa, J.D.V.; Badaró, R.; Machado, B.A.S. Development of Bacterial Cellulose Biocomposites Combined with Starch and Collagen and Evaluation of Their Properties. *Materials* **2021**, *14*, 458. <https://doi.org/10.3390/ma14020458>

Received: 25 December 2020
Accepted: 15 January 2021
Published: 19 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The last five decades have witnessed tremendous growth in the field of biomaterial science and engineering because of vast investments in the development of new products, including wound dressings [1]. Different materials have been analyzed to replace the traditional dressings for an effective treatment since most of the available dressings are used inappropriately (without considering the needs of each type of lesion), which can impair the wound healing process [2,3], especially in cases where the adhesive dressings damage the skin when removed, generating focal points of contamination [4]. In addition, the dressings directed to the treatment of specific lesions such as bedsores and burns have a high commercial cost [5,6]. Wound healing refers to the intrinsic and complex process because it involves cellular and biochemical phenomena, which is initiated from the rupture of the anatomical structure of the skin as well as the loss of its function, and aims to restore the integrity of skin tissue [2,7]. To recover its integrity, it is important that the place where the injury occurred be covered by a wound dressing to minimize the loss of its functions

and assisting the process of tissue regeneration [8,9]. It is also known that a satisfactory material that covers the wound to prevent microbiological contamination and promotes a suitable environment for tissue regeneration is required for effective wound healing [10]. Hence, biomaterials such as polysaccharides (glycans) [11–14] and proteins [15,16] present an interesting alternative for this application due to their intrinsic properties that are considered essential for a dressing such as biocompatibility, non-toxicity, ability to adsorb bioactive molecules, and biodegradability [17].

As a result of this strong research, several materials have been suggested as potential candidates for biomedical application. Among the materials reported so far, bacterial cellulose (BC) has the possibility of use in different sectors of industry and has been widely studied in the health area because of its biocompatibility [18]. The obtaining of the BC is accomplished through the cultivation of different Gram-negative bacteria such as *Gluconacetobacter*, the most efficient BC producer [19–21], *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Azobacter*, besides other genera less used for this purpose such as *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, and *Enterobacter* [22,23]. These biopolymers consist of linear chains of covalent bonding chains $\beta(1,4)$ between D-glucose subunits (β -1,4-glucan chains), forming bundles in the form of ribbons (microfibrils), which have various sizes and are arranged randomly, creating a porous structure [21,24]. The absence of lignin and hemicellulose (high purity) and organized physical structure provides BC with unique properties such as high crystallinity, thermal stability, and mechanical strength, which results in a performance superior to cellulose of plant origin [25]. In addition, other important properties of the BC are its high water-absorbing capabilities, being able to form hydrogels, biocompatibility (non-genotoxic and non-cytotoxic), besides having a slow degradation [21,26]. Several studies have proposed the use of BC with other polymers or molecules, resulting in the development of a new material with optimized properties aimed at its application as a wound dressing, through the addition of silver nanoparticles [27], chitosan [28], zinc oxide [29], titanium dioxide [30], collagen [31], and starch [32]. Recent studies have shown that the changes in the physical structure of BC using chemical modifiers improve the biological properties of the biomaterial, confirming its potential as an alternative material to develop an environmentally-friendly and biocompatible wound dressing, which promotes tissue regeneration [33,34].

Collagen is the major protein present in the extracellular matrix (ECM) and, as one of its main functions, acts as a support for connective tissues, being then responsible for maintaining the structure of the skin, blood vessels, bones, cartilage, tendons, and ligaments [35,36]. Collagen performs its functions through its interaction with the cells of the connective tissue and, from this interaction, acts to regulate different cellular events such as migration, anchoring, differentiation, proliferation, and survival [36]. Thus, collagen is an ECM component that can promote wound healing by stimulating myofibroblastic differentiation (cells capable of promoting and maintaining the inflammatory response to injury) and fibroblastic proliferation [8]. Collagen-based wound dressings have advantages when compared to other products because they are practical, since their physical structure is simple, homogeneous, and of abundant availability [36]. Considering the area of tissue engineering, BC-collagen composites have been synthesized mainly through in situ production strategies [37]. These composites exhibit better properties than pure BC such as improved mechanical properties and biocompatibility [38,39]. In addition to collagen, adding starch to the cellulose matrix also improves the mechanical properties and biocompatibility of the composite [32]. Starch is the second largest source of biomass worldwide, staying behind only cellulose (vegetal and bacterial), and a very important renewable resource in sustainable societies [40]. The pharmaceutical and biomedical sector has increased the use of starch in the last few decades due to different advantages including its natural and renewable source of obtaining and easy access due to the high abundance of raw material, which impacts the reduction of obtaining costs, besides its biodegradable and biocompatible nature [41].

Wound dressings are an important segment of the wound management market [42]. The global market for wound dressing is estimated to exceed \$11 billion by 2025 from \$7.0 billion in 2020, particularly due to the rising aging population and, consequently, the increased probability of chronic and surgical wound treatment as well as injuries of sudden onset. [43]. Thus, the range of available wound dressings based on biomaterials is expanding rapidly [44]. Different companies around the world produce biopolymer-based dressings in the form of hydrogels, hydrocolloids, alginates, foams, and films [45,46]. For example, a Brazilian company, BioFill Produtos Bioetecnologicos (Curitiba, Brazil) has developed Biofill, a BC-based wound dressing to be used for treating burns and ulcers as temporary artificial skin [47]. Another Brazilian company, Bionext, produces a BC product that regulates water moisture, promotes cell metabolism, and protects wounds from external microorganisms on a large scale. The European companies Coloplast (Humblebaek, Denmark) and Les Laboratoires Brothier (Nanterre, France) have developed alginate-based dressings Biatain and Algosteril, respectively, for the treatment of diabetic foot ulcers [46]. It is important to highlight that one of the great challenges associated with the development of modern wound dressings is the determination of an economic and scalable productive cycle, since the traditional dressings available in the market are inexpensive [48]. Therefore, it is important that inexpensive new products are developed using easily available biopolymers with optimized properties.

Based on the intrinsic properties of BC, collagen, and starch as well as the potential for application of biocomposites resulting from the combination of these biomaterials, this study aimed to develop and characterize biocomposites based on BC with different concentrations of collagen and starch and characterize them with respect to their thermal, mechanical, morphological, and physical and barrier properties, with the aim of their potential application as wound dressings.

2. Materials and Methods

Figure 1 illustrates the main steps of the methodology used to produce and obtain the BC membranes and BC–collagen–starch biocomposites as well as the characterization tests that have been applied.

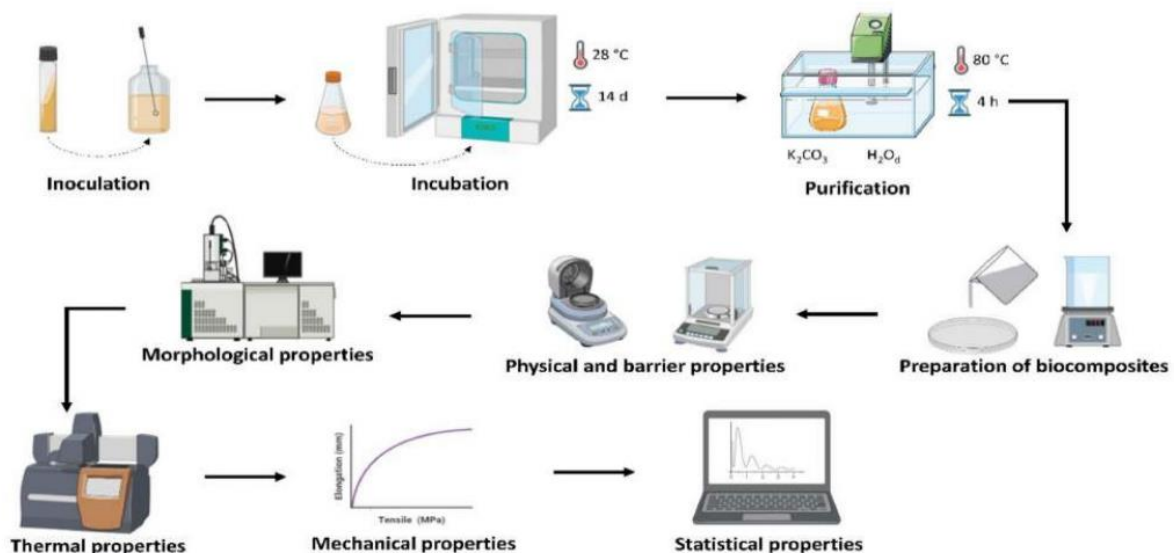


Figure 1. The main steps of the methodology used for bacterial cellulose (BC) and BC–collagen–starch biocomposite production and characterization. Created via [BioRender.com](https://www.biorender.com).

2.1. Bacterial Cellulose (BC) Production and Purification

The *Glucanoacetobacter hansenii* ATCC23769 strain, obtained from the Tropical Cultures Collection (CCT)-André Tosello Foundation (São Paulo, SP, Brazil), was used to obtain BC by static fermentation. The culture medium for inoculum preparation and BC membrane formation had the following composition: 50 g·L⁻¹ glucose, 5 g·L⁻¹ yeast extract, 3 g·L⁻¹ peptone, and 2 g·L⁻¹ potassium phosphate (KH₂PO₄) [49]. The culture media were sterilized (121 °C, 15 min) by steam sterilization and incubated at 30 ± 2 °C. Fourteen days after strain inoculation, the BC membrane produced at the air–medium interface was obtained. Then, the BC membranes underwent the purification process through alkaline treatment with potassium carbonate (K₂CO₃). For this purpose, the membranes were washed twice with distilled water at 80 °C for 1 h to remove impurities from the culture medium and then were treated with 0.3 mol·L⁻¹ K₂CO₃ aqueous solution at 80 °C for 1 h. After alkaline treatment, the BC membranes were washed with distilled water until a neutral pH (between 6.8 and 7) was obtained [49]. The purified membranes were stored at 4 °C in deionized water until further use.

2.2. Preparation of the Biocomposites

The purified BC was crushed in a multiprocessor and homogenized until a gel was obtained, and later used in the production of the biocomposites. Nine formulations (Table 1) were prepared using different cassava starch (16.40% amylose and 83.60% amylopectin; Amafil; Paraná, Brazil) and hydrolyzed collagen (Flora 7 Ervas; São Paulo, Brazil) contents, with a fixed value of BC (50% m·v⁻¹) and glycerol (Synth; São Paulo, Brazil; 0.6% m·v⁻¹). The biocomposites were produced by the casting technique [50] with gradual heating of the formulations up to 70 °C/60 rpm (C-MAG HS7; IKA; Staufen, Germany) for 20 min. Then, 45 g of each mixture was weighed in polystyrene Petri dishes and dehydrated in a drying oven at 40 ± 2 °C under airflow (Q314M222; Quimis; Diadema, Brazil) for 20–24 h. Figure S1 shows the steps involved in obtaining F1–F9 samples with real images. Before their characterization, pure BC and BC–collagen–starch biocomposites were stored in a desiccator containing a saturated solution of sodium chloride under ambient conditions of 23 ± 2 °C and relative humidity of 60% for 10 days.

Table 1. Sample name and composition of biocomposites based on bacterial cellulose and combined with starch and collagen.

Formulation (Sample Name)	Biocomposite Composition (% m·v ⁻¹)			
	Bacterial Cellulose	Collagen	Starch	Glycerol
F1	50.00	–	–	–
F2	50.00	–	2.23	0.60
F3	50.00	–	1.12	0.60
F4	50.00	1.00	2.23	0.60
F5	50.00	1.00	1.12	0.60
F6	50.00	1.00	–	0.60
F7	50.00	2.00	–	0.60
F8	50.00	2.00	2.23	0.60
F9	50.00	2.00	1.12	0.60

2.3. Biocomposite Characterization

2.3.1. Moisture, Total Solids (TS), and Water Activity (a_w)

The total moisture and solid content of the pure BC and BC–collagen–starch biocomposites were determined using an infrared scale (Shimadzu, MOC-120H, Kyoto, Japan), which allowed the sample temperature to reach 105 °C through the emission of radiation. The weight loss (%) was evaluated as a function of the initial weight of the sample using the equipment software equation, determining the moisture and TS contents [51]. The a_w of the pure BC and biocomposites was analyzed in Decagon (Lab Master aw; Novasina; Lachen, Switzerland) at 25 °C using electrolytic cell CM-2. The “actual balance” [a_w = moisture in

the balance sheet = actual balance (%) / 100] was evaluated using the equipment software equation [52]. All analyses were performed in triplicate.

2.3.2. Water Solubility (WS) and Water Vapor Permeability (WVP)

The WS of pure BC and BC–collagen–starch biocomposites was determined according to the assay presented by Moura et al. [53], where circular biocomposite specimens (2-cm in diameter) were weighed and then placed in a flask with 50 mL distilled water. The flask with the specimens were shaken for 24 h in an incubator with orbital shaker (MA420; Marconi; Piracicaba, Brazil) at room temperature (25 °C) and under agitation of 130 rpm. After this period, the specimens were dried at 105 °C for 24 h in a drying oven with forced air circulation (Q314M222; Quimis; Diadema, Brazil) to determine their final mass. The WS was determined in percentage according to Equation (1).

$$WS = ((m_0 - m_1)) / m_1 \times 100 \quad (1)$$

where WS is the solubility in water (%); m_0 is the initial mass (g) of the specimens; and m_1 is the dry mass (g) of the specimens after of contact with distilled water (solubilization).

The WVP was determined by the gravimetric method proposed by ASTM 96-00x with some modifications [54]. Circular specimens of pure BC and biocomposites (5 cm) were placed in permeation capsules containing silica gel (approximately 15 g, 0% relative humidity) and maintained in desiccators containing a saturated sodium chloride solution (75% relative humidity, 25 °C) for seven days. Every 24 h, the capsules containing the specimens were weighed to monitor the weight variation and the values obtained were plotted as a function of time. Thus, WVP was calculated by means of linear regression between the points of mass loss, according to Equation (2). All analyses were performed in triplicate.

$$WVP = (g \times x) / (t \times A \times \Delta P) \quad (2)$$

where WVP is the water vapor permeability ($\text{g} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$); g is the pure BC or BC–collagen–starch biocomposite mass gain; x is the mean pure BC or BC–collagen–starch biocomposite thickness (mm); t is the total time (h); ΔP is the vapor pressure difference of the environment containing the silica gel (kPa at 25 °C) and pure water (3167 kPa at 25 °C) ($\text{g} \cdot \text{t}^{-1}$); and A is the permeation area (m^2).

2.3.3. Opacity and Grammage

The apparent opacity of the pure BC and BC–collagen–starch biocomposites was determined using a UV–Vis spectrophotometer (700 PLUS; FEMTO; São Paulo, Brazil), where the specimens were cut at rectangles and adhered to the internal wall of the quartz bucket, avoiding the trapping of air bubbles. Under these conditions, the opacity was measured at 500 nm [55]. The study by Almeida et al. was also used for grammage determination [56], where the grammage was calculated by the ratio between the mass of pure BC and biocomposites, determined from analytical balance weighing, and the specimen area (2 cm^2). The opacity and grammage analyses were performed in triplicate.

2.3.4. Thickness and Mechanical Properties

A flat-tip digital micrometer (Ip40; Digimess; São Paulo, Brazil) at a resolution of 0.001 mm was used to determine the thickness of the pure BC and BC–collagen–starch biocomposites. Thus, the thickness was evaluated by determining the average thickness of 10 quantifications in random positions of each respective specimen. The mechanical properties were analyzed using a texture analyzer (CT310k; Brookfield; Phoenix, AZ, USA) according to ASTM D-882, with adaptations [57]. Seven specimens ($100 \text{ mm} \times 25 \text{ mm}$) were analyzed and conditioned under 58% relative humidity (RH) for 48 h at 25 °C. The samples were adjusted to the test points of the equipment (TA3/100 and TA/TPB) at an initial distance of 50 mm and pulled at a speed of $0.8 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. The properties determined were maximum tensile strength at break (MPa) and elongation at break (%).

2.3.5. Swelling Rate (SR) and Water Release Rate (WRR)

For determining the swelling rate, three specimens (triplicate) of each biocomposite were made in the form of square membranes (15 mm side), weighed, and immersed separately in deionized water at room temperature (25 °C) for 6 h. Then, the samples were weighed after gently cleaning the surface using paper towels at certain intervals (1, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, and 180 min) until constant weight was achieved. The degree of swelling was measured as the percentage of the initial increase in pure BC and BC–collagen–starch composite weight that occurred after swelling in water [58].

The capacity to release water from pure BC and BC–collagen–starch biocomposites was evaluated according to Ul-Islam et al. [59], with adaptations. The samples F1–F9 were cut into circular specimens (2 cm in diameter) to determine their initial dry weight (W_o). The specimens were then placed in flasks containing deionized water and were maintained for 48 h. After this period, the swollen specimens were then rapidly dried with cellulose filter paper to remove excess water from the surface and placed on open petri dishes at 25 °C. The specimens were removed from the plates every 24 h to be weighed (W_w), totaling four points of analysis or 96 h. The WRR was calculated by Equation (3). The analyses were performed in triplicate.

$$\text{WRR (\%)} = (W_o - W_w) / (W_o) \times 100 \quad (3)$$

where WRR is the water retention rate in percent; W_o is the weight after immersion in deionized water and during the drying period at room temperature; and W_w is the initial weight of the dry membrane.

2.3.6. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy (SEM, BX-51; Olympus; Tokyo, Japan) was used to evaluate the surface morphology and elements of the pure BC and BC–collagen–starch biocomposites. The preparation of the samples for this morphological analysis was performed as proposed in the study of Machado et al. [60], where the samples were manually fixed with tweezers (PELCO1 Tweezers) on an aluminum metallic structure using a carbon double-sided tape, known as stubs. Then, the metallization stage of the sample with gold was performed in a Balzers Sputter coater (SCD 50; BAL-TEC; Grand Island, NE, USA). The stubs containing the metallic samples were stored in storage boxes and double sealed with Parafilm (PARAFILM1 M) for moisture control. The samples were analyzed at 250 magnification (voltage, 15 kV; working distance, 30 mm; point size 50; HV vacuum mode).

2.3.7. Thermogravimetric Analysis (TGA)

Thermogravimetric analysis (TGA) of pure BC and BC–collagen–starch biocomposites was performed on a Q50 thermogravimetric analyzer (TA Instruments; New Castle, DE, USA). TGA analysis was performed using about 6 mg of each sample that was subsequently placed in a platinum crucible. The sample recipient was placed in the thermogravimetric analyzer and subjected at a heating rate of 10 °C·min^{−1} from 25 to 900 °C under a nitrogen flow (30 mL·min^{−1}). [61]. The results of the TGA were expressed as a percentage of mass loss (%)/temperature (°C) and differential thermogravimetry (DTG) curves were prepared from the TGA data.

2.4. Statistical Analysis

The results obtained related to the characterization of biocuratives were analyzed for variance (ANOVA) at 95% significance, and the results that present significant differences between treatments were differentiated by Tukey's test. Assistat software (Version 7.7 beta) was used to analyze the results [62]. Principal component analysis (PCA) was performed using PAST (Paleontological Statistics; Oslo, Norway) version 3.26, developed by Øyvind Hammer, with the means of the characterization analyses [moisture (M), TS, a_w , water solubility (WS), WVP, opacity (O), grammage (G), thickness (T), elongation at break (E),

and tensile strength (MT)] to obtain the correlation between the produced samples and their properties. As they presented different units of measurement, the data concerning the characterization tests cited were normalized in the range of 0 to 1, and after standardization, the PCA was carried out.

3. Results

3.1. Visual Appearance of Pure BC and BC–Collagen–Starch Biocomposites

In total, eight different biocomposites based on BC, collagen, and starch and the control (pure BC–F1 sample) were produced according to Table 1. Figure 2 shows the physical appearance of the control (F1) and biocomposites (F2–F9) after complete evaporation of the solvent (water in this case). The formed biomaterials (pure BC and BC–collagen–starch biocomposites) were easily removed from the surface of the Petri dish, without rupturing its structure. Thus, all nine formulations were easy to handle and removal from the Petri dish did not compromise the specimens for the characterization analyses. The addition of other polymers in the cellulose matrix altered the physical appearance, since F1, which only had cellulose in its composition, was opaque with prominent cellulose fibers (Figure 1a). After adding collagen and starch, regardless of the biocomposite composition, the samples were transparent in appearance (Figure 1b–h).

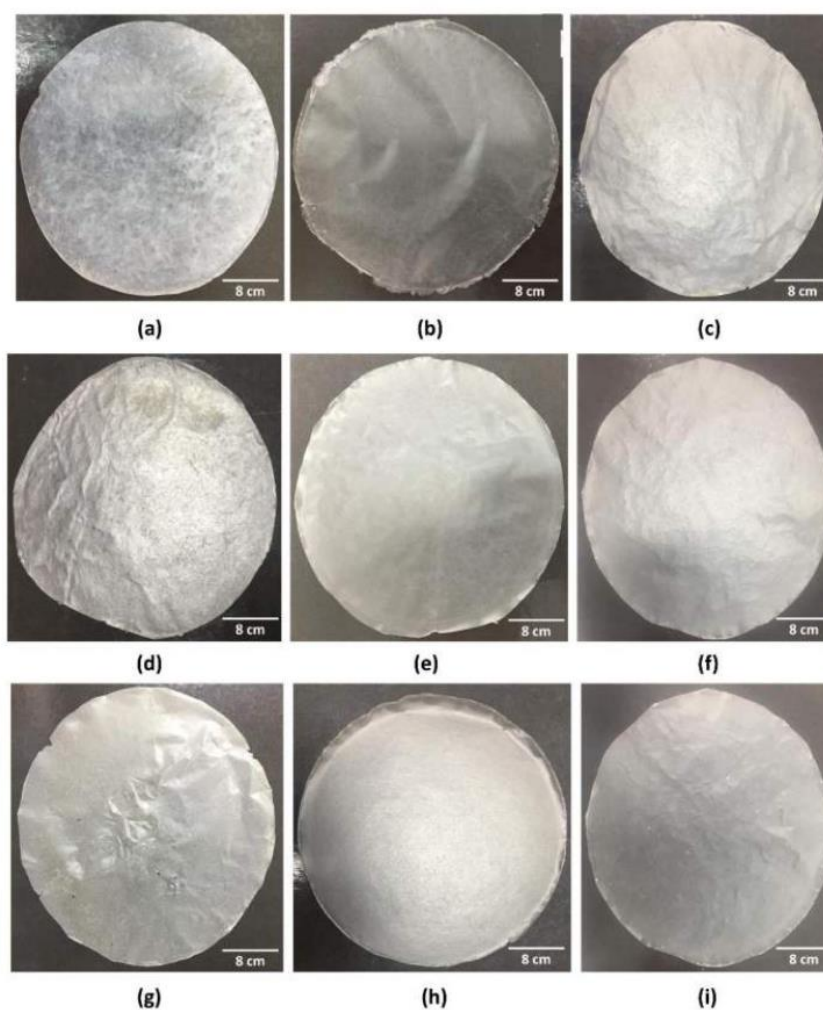


Figure 2. Visual appearance of the pure bacterial cellulose (BC; control) and BC–collagen–starch biocomposites. (a) F1, (b) F2, (c) F3, (d) F4, (e) F5, (f) F6, (g) F7, (h) F8, and (i) F9.

3.2. Physical and Barrier Properties of Pure BC and BC–Collagen–Starch Biocomposites

Figure 3 and Table 2 show the results related to the physical and barrier properties of pure BC and the BC–collagen–starch biocomposites. The a_w of the nine samples varied between 0.400 ± 0.01 (F5) and 0.480 ± 0.01 (F1, F6, and F7), with significant differences between them ($p > 0.05$) (Figure 3a and Table 2). It is important to note that F1, F5, and F6, which had the highest a_w , did not have starch, indicating that starch can influence a_w . After adding collagen and/or starch in the cellulose matrix, the WS increased with significant difference between the samples, with the lowest in F1 ($12.94 \pm 2.58\%$) and the highest in F9 ($69.76 \pm 1.43\%$), which had collagen and starch besides BC (Figure 3b and Table 2). F7, F8, and F9, with the highest collagen content (2.00 g), had the highest WS ($69.67 \pm 12.7\%$, $54.12 \pm 2.21\%$, and $69.76 \pm 1.43\%$, respectively). However, F8, F9, and F1 had the lowest moisture ($11.19 \pm 0.81\%$, $10.75 \pm 0.89\%$, and $10.88 \pm 0.64\%$, respectively), while F6 had the highest moisture ($20.60 \pm 0.69\%$) (Figure 3c and Table 2). The TS content varied between $79.4 \pm 0.69\%$ (F6) and $89.25 \pm 0.89\%$ (F9), with a significant difference ($p > 0.05$) (Figure 3d and Table 2). The TS content was inversely proportional to the moisture content.

The thickness of the pure BC and biocomposites is shown in Figure 3e and Table 2. The results showed that polymer concentration influenced the thickness, since F1 (which has only BC) had the lowest thickness (0.04 ± 0.10 mm), while F8 (which had the highest collagen and starch concentration) had the highest thickness (0.11 ± 0.03 mm). Thickness influenced the WVP, which ranged from $5.59 \pm 0.44 \times 10^{-8}$ g·mm/m²·h·Pa (F1) to $14.06 \pm 0.71 \times 10^{-8}$ g·mm/m²·h·Pa (F9), with a significant difference ($p > 0.05$) (Figure 3f and Table 2). It is important to highlight that the samples with the highest thickness (F7, F8, and F9) had the highest WVP. Moreover, these samples had the highest collagen concentration (2.00%), indicating that the presence of collagen in the biocomposite formulation can increase not only the WS, as previously mentioned, but also the thickness and WVP.

The grammage of BC–collagen–starch biocomposites was 15.03–338.83% more than that of pure BC (Figure 3g and Table 2). F4 and F8, with 2.23% starch concentration and 1% and 2% collagen concentration, respectively, had the highest grammage (39.58 ± 0.87 and 39.10 ± 0.73 g·cm⁻², respectively). In addition, the behavior of the samples in relation to the thickness was similar, indicating a correlation between these two properties. However, unlike these properties, the opacity of pure BC (36.67 ± 0.37 Abs 600 nm·mm⁻¹) was greater than that of BC–collagen–starch biocomposites (31.85 ± 1.98 – 8.37 ± 0.08 Abs 600 nm·mm⁻¹) (Figure 3h and Table 2). These results are similar to those reported by the visual appearance of the samples (Figure 2), where, after the addition of the biopolymers, the samples obtained showed transparency.

The hydrophilic properties of pure BC and the BC–collagen–starch biocomposites over time were analyzed through the swelling assay and WRR, as shown in Figure 4. The swelling rate of the samples ranged between 47.61% and 65.75% after the first minute of analysis (Figure 4a). This increase in the swelling rate was attributed to the effect generated by hydrating the material. In general, the swelling rate was maintained without major oscillations, except for F2 and F7. The swelling rate of F2 (a BC–starch biocomposite) after 1 min was 137.04% (one with the greatest hydrophilic character) and, after 10 min, it decreased to 109.04% until the 180th minute. Similarly, the swelling rate of F7 (a BC–collagen biocomposite) decreased from 51.31% after 1 min to 22.52% after 180 min, a greater loss than that found for the other samples (F1, F3, F4, F5, F6, F8, and F9). The water release capacity reduced in all samples, regardless of the analysis time (Figure 4b). These results indicate that the samples degraded after the period of immersion in water, which can be justified by the biodegradable character of the biopolymers present. In general, the capacity to release water over time was maintained, except in F3, which showed a sharp reduction of approximately 109% compared to the analysis times of 24 and 48 h.

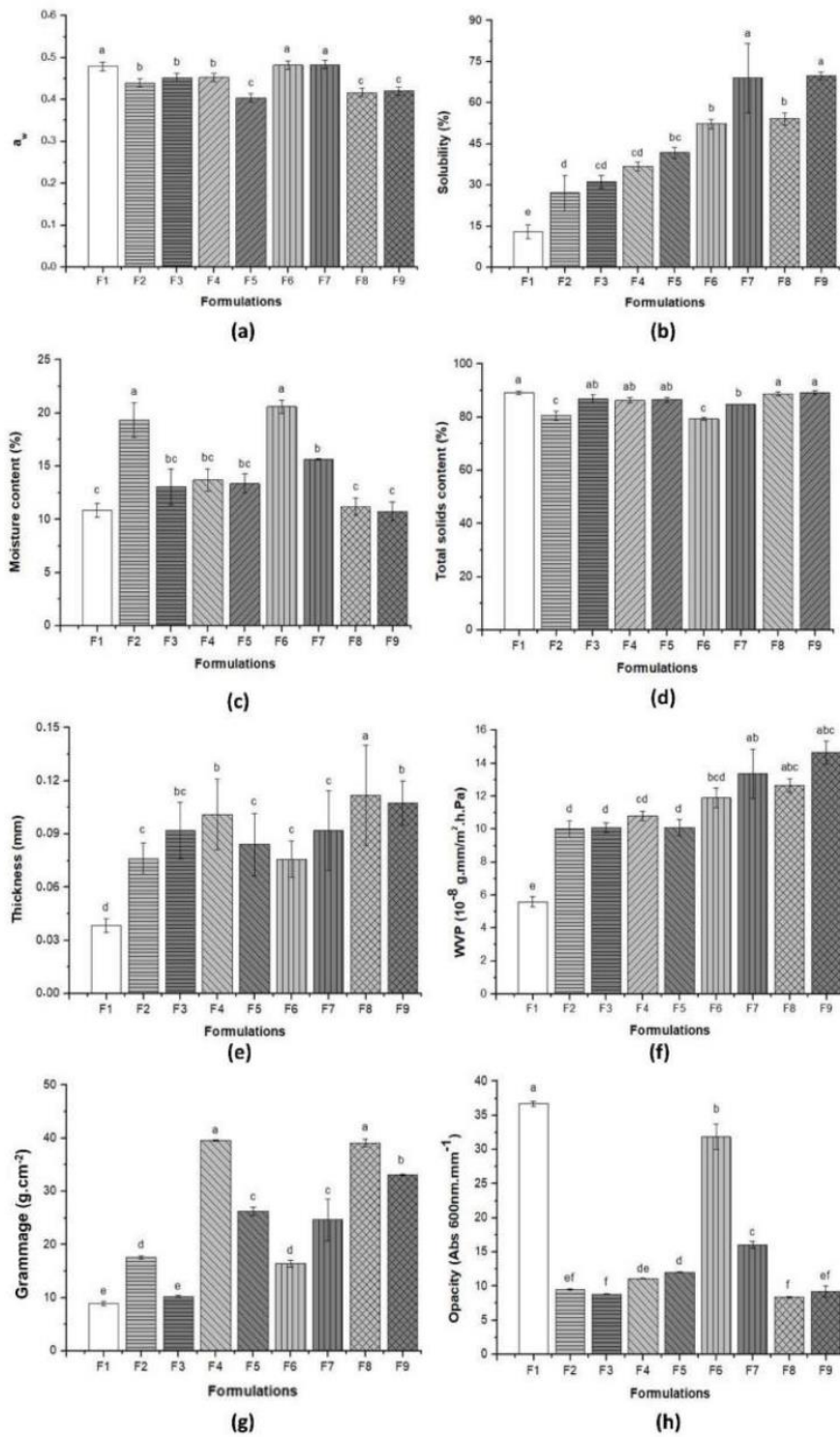


Figure 3. Physical and barrier properties of pure bacterial cellulose (BC, F1) and BC–collagen–starch biocomposites (F2–F9). (a) Water activity (a_w) content; (b) Water solubility; (c) Moisture content; (d) Total solids content; (e) Thickness; (f) Water vapor permeability; (g) Grammage and (h) Opacity. Bars followed by the same letters were not significantly different at $p < 0.05$ according to Tukey’s test with 95% confidence.

Table 2. Data regarding the physical properties, barrier, and mechanical properties of pure bacterial cellulose (sample F1) and bacterial cellulose–collagen–starch biocomposites (samples F2–F9).

Analysis	Sample Name								
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
Water activity	0.48 ^a ± 0.01	0.44 ^b ± 0.06	0.45 ^b ± 0.01	0.45 ^b ± 0.02	0.40 ^c ± 0.01	0.48 ^a ± 0.01	0.48 ^a ± 0.01	0.42 ^c ± 0.01	0.42 ^c ± 0.01
Moisture (%)	10.88 ^c ± 0.64	19.34 ^a ± 1.64	13.06 ^{bc} ± 1.67	13.69 ^{bc} ± 1.05	13.37 ^{bc} ± 0.88	20.60 ^a ± 0.69	15.66 ^b ± 0.04	11.19 ^c ± 0.81	10.75 ^c ± 0.89
Total solids (%)	89.12 ^a ± 0.64	80.66 ^c ± 1.64	86.94 ^{ab} ± 1.67	86.31 ^{ab} ± 1.05	86.63 ^{ab} ± 0.88	79.4 ^c ± 0.69	84.34 ^b ± 0.04	88.81 ^a ± 0.81	89.25 ^a ± 0.89
Water solubility (%)	12.94 ^e ± 2.58	27.11 ^d ± 6.52	31.12 ^{cd} ± 2.31	36.76 ^{cd} ± 1.62	41.79 ^{bc} ± 2.02	52.33 ^b ± 1.74	69.67 ^a ± 12.7	54.12 ^b ± 2.21	69.76 ^a ± 1.43
Water vapor permeability (10 ^{−8} g·mm/m ² ·h·Pa)	5.59 ^e ± 0.44	10.01 ^d ± 0.51	10.18 ^d ± 0.38	10.89 ^{cd} ± 0.33	10.19 ^d ± 0.57	11.94 ^{bcd} ± 0.61	13.37 ^{ab} ± 1.52	12.66 ^{abc} ± 0.45	14.06 ^a ± 0.71
Opacity (Abs 600 nm·mm ^{−1})	36.67 ^a ± 0.37	9.49 ^{ef} ± 0.12	8.82 ^f ± 0.04	11.12 ^d ± 0.05	12.03 ^d ± 0.64	31.85 ^b ± 1.98	16.02 ^c ± 0.52	8.37 ^f ± 0.08	9.17 ^{ef} ± 0.81
Grammage (g·cm ^{−2})	8.91 ^e ± 0.46	17.57 ^d ± 0.21	10.25 ^e ± 0.19	39.58 ^a ± 0.87	26.25 ^c ± 0.84	16.41 ^d ± 0.69	24.66 ^c ± 3.97	39.10 ^a ± 0.73	33.11 ^b ± 0.52
Thickness (mm)	0.04 ^d ± 0.10	0.08 ^c ± 0.01	0.09 ^{bc} ± 0.01	0.10 ^b ± 0.02	0.08 ^c ± 0.01	0.08 ^c ± 0.01	0.09 ^c ± 0.02	0.11 ^a ± 0.03	0.10 ^b ± 0.01
Elongation (%)	169.54 ^a ± 6.00	20.29 ^{bc} ± 6.35	21.39 ^b ± 5.76	16.07 ^{bcd} ± 5.04	4.81 ^d ± 2.0	14.29 ^{bcd} ± 3.22	8.61 ^{cd} ± 1.67	10.55 ^{bcd} ± 1.75	5.57 ^d ± 1.94
Tensile strength (Mpa)	0.99 ^e ± 0.23	8.7 ^b ± 2.74	4.17 ^{cd} ± 1.23	9.05 ^b ± 0.75	6.72 ^{bc} ± 1.22	1.5 ^{de} ± 0.76	1.8 ^{de} ± 0.15	16.32 ^a ± 1.04	5.21 ^c ± 1.31

Values showing the same letter (a, b, c, d, e or f) in the same column do not show significant difference ($p < 0.05$) through the Tukey test at a 95% confidence level (Statistical analysis).

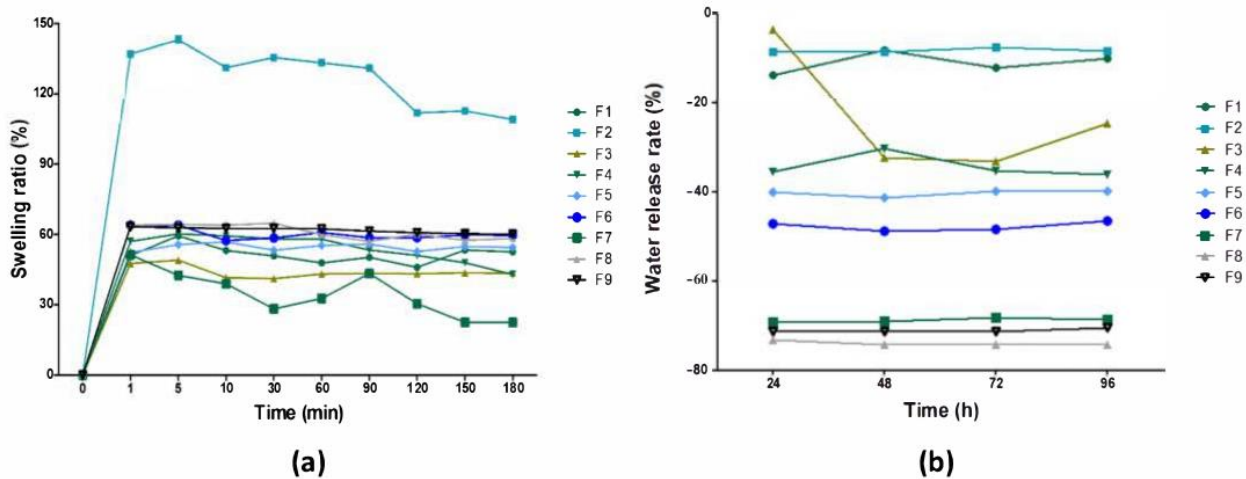


Figure 4. Characterization of pure bacterial cellulose (BC,F1) and BC-collagen-starch biocomposites (F2–F9). (a) Swelling rate and (b) water retention rate.

3.3. Mechanical Properties of Pure BC and BC–Collagen–Starch Biocomposites

Figure 5 and Table 2 show the results concerning the elongation at break (Figure 5a) and tensile strength (Figure 5b) of pure BC and BC-collagen-starch biocomposites. F1 (pure BC) had the highest elongation ($197.94 \pm 82.13\%$), while after the addition of the other biopolymers, these values decreased by up to 40%, varying between 4.81% and 21.39% for F5 and F3, respectively. However, the tensile strength increased more than 189% after the addition of biopolymers in the cellulose matrix, and ranged from 0.98 ± 0.23 to 16.32 ± 1.04 MPa for F1 and F8, respectively. These results indicate that although a plasticizer (glycerol) was used during sample production, the presence of biopolymers, regardless of their concentration, reduced the elasticity of the biocomposites. Therefore, BC-collagen-starch biocomposites, particularly F8, which had the highest concentration of polymers in its constitution, showed greater rigidity than pure BC.

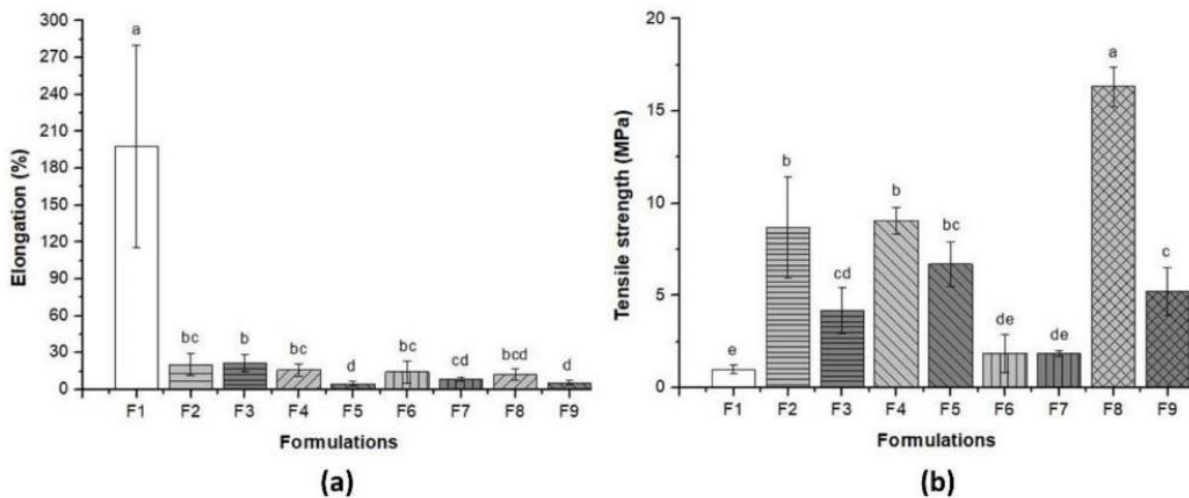


Figure 5. Mechanical properties of pure bacterial cellulose (BC,F1) and BC-collagen-starch biocomposites (F2–F9). (a) Elongation (%) and (b) tensile strength (MPa).

3.4. Morphological Property of Pure BC and BC–Collagen–Starch Biocomposites

Figure 6 shows the micrographs of the nine samples produced, highlighting the structural details. Figure 6a, referring to the pure BC (F1), shows that the porous structure formed by the cellulose fibers, a fundamental characteristics of BC, could be observed on the surface; however, the thickness of individual fibers could not be determined at this magnitude. Due to the addition of the biopolymers, and consequently the formation of biocomposites, the characteristic fibrous network of BC is not apparent (Figure 6b–i). This behavior indicates that there is a structural interaction between the BC matrix, collagen, and starch, which may have changed the visual appearance of the samples from opaque in pure BC to transparent in biocomposites (Figure 1). Thus, the micrographs obtained indicate that the formation of biocomposites may promote surface compaction. Nevertheless, this compaction caused micro-fractures in biocomposites with increased concentrations of polymers, as shown in the micrographs of F8 and F9 (Figure 6h,i, respectively). In addition, it is noted that air microbubbles were present in the biocomposite structure (Figure 6b–g,i), which must have been derived during the casting process.

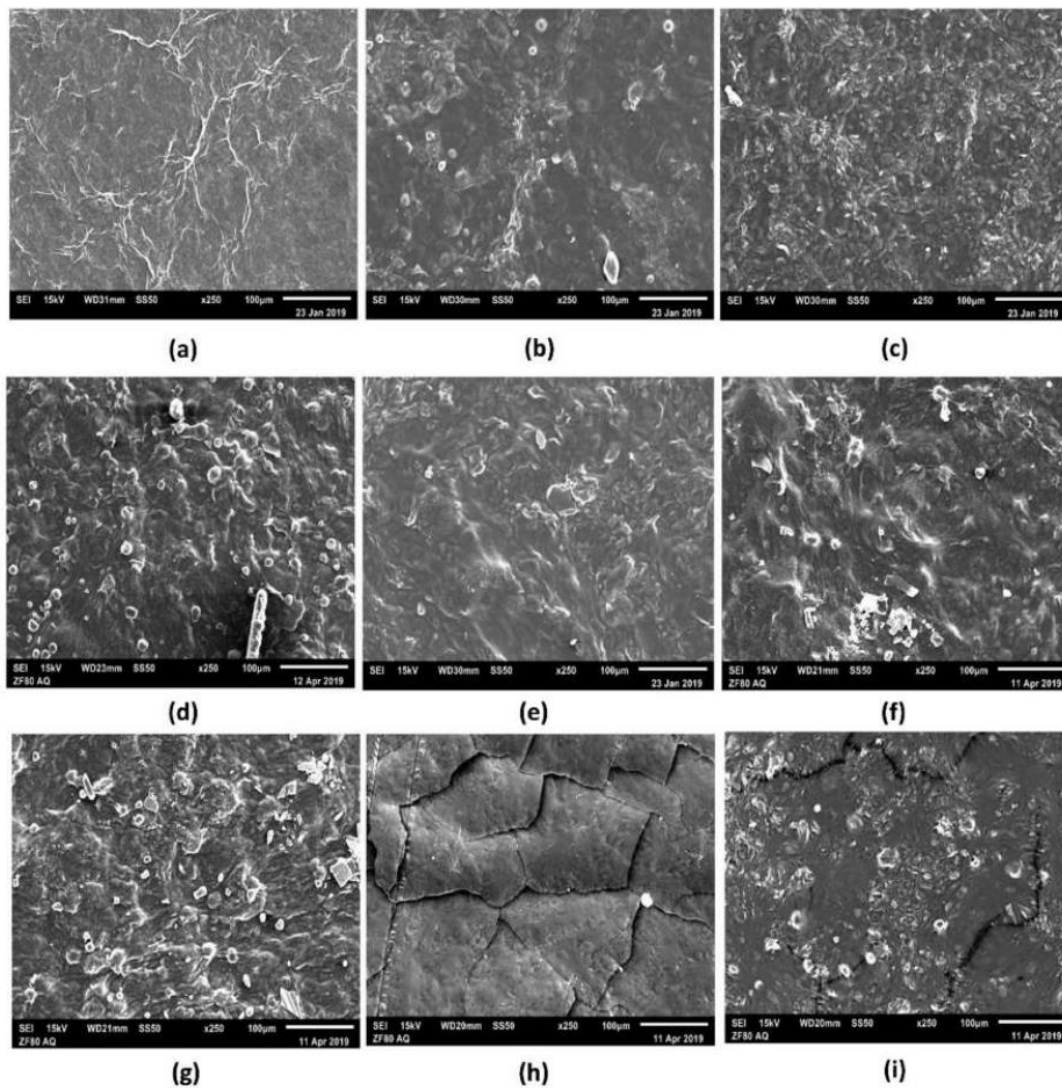


Figure 6. Scanning electron microscopy (SEM) surface micrographs of the surfaces of the pure bacterial cellulose (BC, F1) and BC–collagen–starch biocomposite (F2–F9). (a) F1, (b) F2, (c) F3, (d) F4, (e) F5, (f) F6, (g) F7, (h) F8, and (i) F9.

3.5. Thermal Property of Pure BC and BC–Collagen–Starch Biocomposites

To determine the stability and thermal behavior of pure BC and the BC–collagen–starch biocomposites, the TGA (Table S1) and DTG curves were determined as shown in Figure 7a,b, respectively (Figure 7). In general, the thermal decomposition of the nine samples showed three stages of mass loss. The first stage refers to water evaporation, that is, moisture loss, which occurred between 25 and 250 °C, where the loss in mass varied between 5 and 20% for F1 and F6, respectively. However, pure BC showed a higher temperature range in this stage than the BC–collagen–starch biocomposites. The second stage of thermal degradation occurred between 200 and 350 °C and may be associated with the degradation of proteins and polyhydroxylated compounds (cellulose fibers). The loss in mass of the samples at this stage was approximately 59%, with F8 and F9, which had the highest polymer concentration in their composition, showing the greatest losses of approximately 62%. Therefore, this stage was the one with the highest mass loss rate, since it corresponded to the degradation of BC, collagen, starch, and glycerol. In addition, it is responsible for the peaks observed in the DTG curve between the temperatures of 300 and 350 °C. The third stage initiated between 300 and 350 °C and extended up to 800 °C in association with a loss in mass between 78% for F1 and 84% for F8 and F9. Normally, this stage is associated with the subsequent decomposition of the residua, leading to the formation of inorganic matter and carbonaceous char.

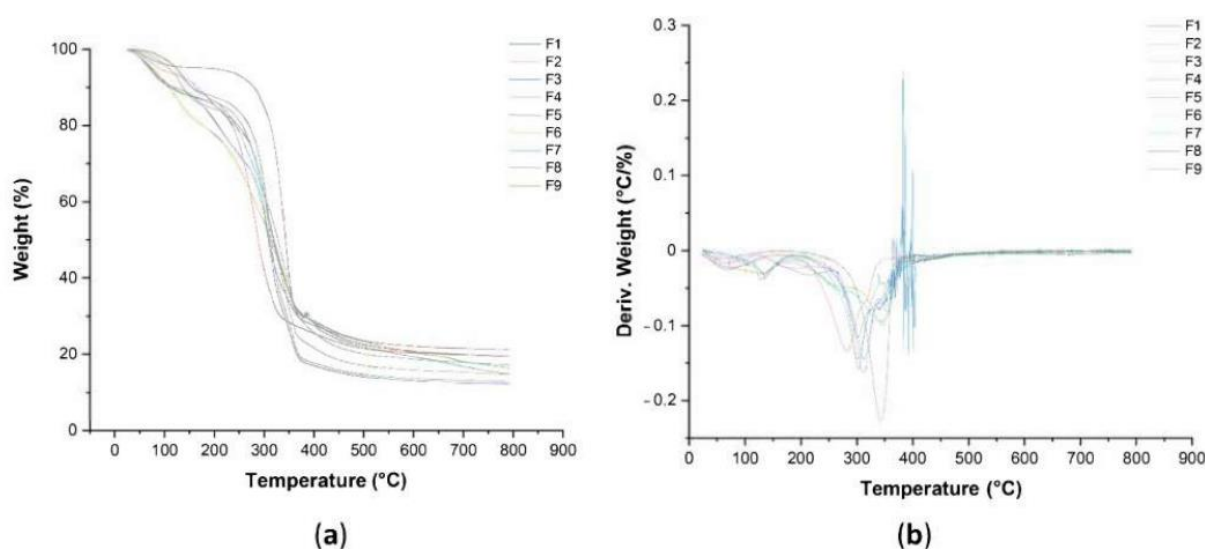


Figure 7. Thermal analysis of pure bacterial cellulose (BC, F1) and BC–collagen–starch biocomposites (F2–F9). (a) Thermogravimetric analysis (TGA) and (b) differential thermogravimetry (DTG).

3.6. Effect of the Presence of Components on the Properties of BC–Collagen–Starch Biocomposites: Principal Component Analysis

To assess the effect of the presence and concentration of biopolymers on the produced biocomposites, PCA was performed with physical and barrier properties data, except SR and WRR, and the elongation and tensile strength assays (Figure 8). PC1 explained 49.54% of the total variance of the data, while PC2 explained 27.07%, thus explaining 76.61% of the cumulative variance. The highest loadings for PC1 were grammage and tensile strength, while those for PC2 were moisture and WVP. In general, Figure 8 shows that the BC–collagen–starch biocomposites showed a tendency to group according to the presence and concentration of their constituents, whereas pure BC (F1) did not form a cluster with any other sample analyzed. However, it is important to highlight that the BC–starch (F2 and F3) and BC–collagen (F6 and F7) biocomposites were allocated in different

quadrants, indicating that the biopolymer concentration results in a biocomposite with different properties. In addition, it was noted that some variables such as moisture content and TS content were negatively correlated to each other. The graph of scores obtained through PCA analysis also showed that the presence and concentration of the biopolymers analyzed in the BC matrix influenced their properties.

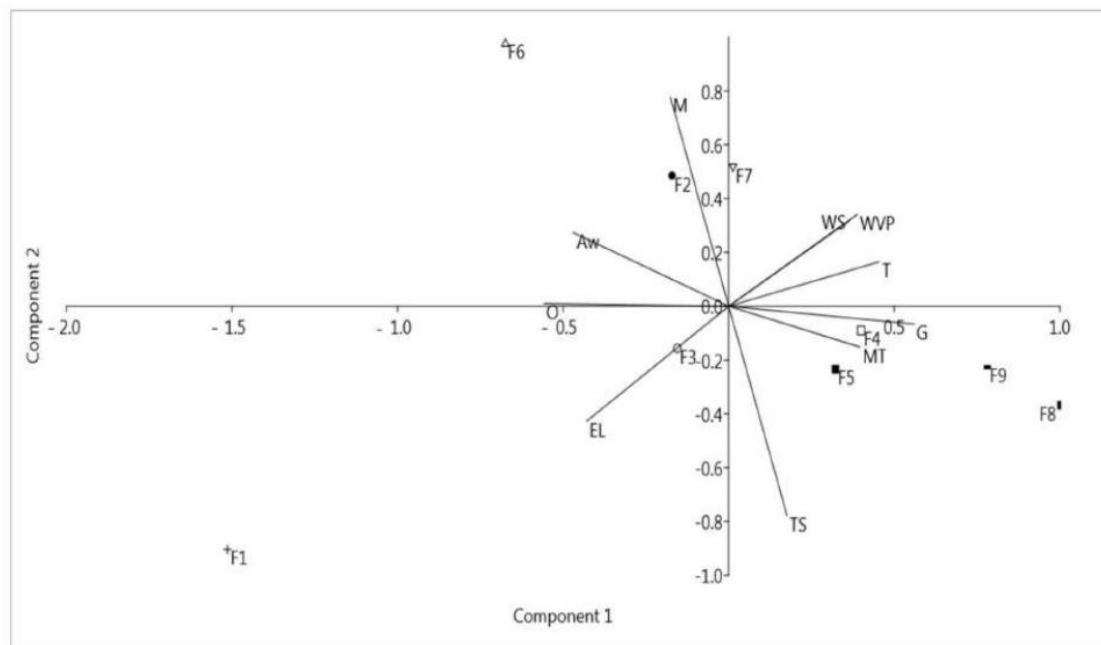


Figure 8. Scores scatter plot by principal component analysis of pure bacterial cellulose (BC,F1) and BC–collagen–starch biocomposites (F2–F9).

4. Discussion

Wound care has historically been one of the most basic and essential practices of human civilization [4]. Currently, an increasing amount of information about the effectiveness of traditional and technologically advanced practices is available [63–65]. Many strategies are being developed to increase the efficiency of the healing process by considering the different phases of the tissue repair process and the particularities of each injury type [66–69]. The nine samples analyzed showed different behaviors in relation to the type of test performed, and this variation occurred according to their polymeric constitution.

One of the differences observed was in relation to the visual appearance, where F1 (pure BC) was primarily opaque, while the BC–collagen–starch biocomposites (F2–F9) were comparatively more transparent. The opacity of F1 was 22.85% higher than that of F8, which had the lowest opacity. The opacity of BC has already been demonstrated to be related to the presence of an ultrafine nanofibrous network [56,70], which forms a dense crosslinked structure stabilized by hydrogen bonds and is highly crystalline (between 60 and 90%) [71,72]. Within this context, BC nanofibers have low transparency and reflect light. Furthermore, the high crystallinity of BC may have influenced opacity, since the crystalline regions may act by reflecting or diverting the incident light beam, which may compromise its transmission, resulting in increased opacity [56]. Thus, the addition of collagen and/or starch and the interaction between these biomaterials and cellulose nanofibers may have altered the crystallinity, resulting in a less opaque and more transparent biocomposite. Abiral et al. [73] showed that the opacity of biocomposites formed by cassava starch, polyvinyl alcohol (PVA), and BC increased according to the BC fiber concentration in the polymeric blend. Wilpiszewska et al. [74] observed that films based on carboxymethylated

derivatives of starch and cellulose were transparent and elastic; however, Santos et al. [75] demonstrated that biocomposites of thermoplastic corn starch and BC showed a lower transparency than pure BC, different results from those found in our study. It is important to highlight that using a transparent wound dressing allows the patient to assess the wound healing process continuously without stimulating the injured area, thus reducing the probability of secondary injuries, particularly in cases of dermal lesions [76]. Thus, the application of samples F2–F9 in clinical practice is highly relevant.

Aiming at the application as a wound dressing, it is fundamental to understand whether the material formed has a hydrophobic or hydrophilic character as well as to know the a_w in its structure. The a_w of the nine samples analyzed ranged from 0.400 to 0.480, which is within the ideal range (0.2–0.6) proposed by Cázon et al. [77], since the results of their study showed that biocomposites of BC, PVA, and chitosan did not decrease the WPV, one of the main properties that an ideal wound dressing should exhibit. In addition, the study demonstrated that a_w varied according to the composition of the biocomposite, similar to the results found in that study [77]. Based on the results, it was also observed that starch and collagen incorporation in BC altered the properties related to WS as well as to moisture and TS. WS is directly related to the increase in the hydroxyl group in polar polymeric matrices, which enhances hydrogen bond formation with water, thus forming soluble materials that facilitates its biodegradability [78]. The use of biodegradable materials in biomedicine is necessary, as it traditionally uses non-biodegradable polymer-based materials such as petrolatum gauze as wound dressings, which can affect the environment. Thus, the use of biocomposites based on BC, collagen, and starch can be considered as an environment friendly alternative. With regard to moisture, F6 (BC–collagen biocomposite) had the highest moisture, which differed from the results reported by Pasaribu et al. [79], which pointed to the decrease in moisture content in BC after collagen incorporation.

Saska et al. [80] showed that although the incorporation of collagen in the BC membrane slightly increased the swelling rate compared to that of pure BC, the study by Noh et al. [81] showed that increasing the concentration of BC in biocomposites of BC–collagen enhanced the water uptake capacity. Priya et al. [82] observed that the incorporation of cellulose fibers in the starch–PVA matrix decreased the swelling rate. The results reported in the studies by Saska et al. [80] and Priya et al. [82] were similar to those found in our study, where the presence of collagen did not significantly alter the swelling rate, while F2 (with the highest starch concentration without collagen) had the highest swelling rate. The swelling rate assesses the absorption of water or aqueous fluids by the analyzed material without dissolving, and this swelling continues until there is a balance between the water and the material [83]. Due to its swelling rate, F2 has the potential to be applied to lesions caused by burns, since the main consequences of its healing physiology are the high release of exudates [84]. The stability of the water release capacity of pure BC and the biocomposites based on collagen and starch, with the exception of F3, indicates that they can contribute to the maintenance of adequate moisture in the lesion microenvironment, favoring tissue regeneration and preventing bacterial proliferation [18,85].

Vapor exchange through a material is a critical property directly related to the effectiveness of wound dressing. Our results showed that increasing collagen concentration (2.00%) increased the WPV; however, it is important to note that the presence of starch also contributed to the high permeability of F8 and F9. This behavior was similar to that reported by Zhuang et al. [86], who observed that starch composites and tilapia skin collagen had a higher WPV than that in the film composed only of collagen. Nevertheless, the study by Tibolla et al. [87] showed that the starch–cellulose nanocomposites with a higher concentration of cellulose fibers had lower values for WPV. High WVP promotes wound dehydration and helps in inducing scar formation, while low WVP can slow down the wound healing process due to the deposition of the high amount of exudates. Therefore, a suitable dressing should display an optimal WVP value [88].

Grammage is a property that is directly related to the mechanical resistance and barrier properties of the material, since they are influenced by the thickness and mechanical properties [56]. F8, with the highest polymer concentration in its constitution, had the highest grammage, thickness, and consequently, tensile strength, while F1, with only BC in its composition, had the lowest grammage, thickness, and consequently, the highest elongation at break. It is important to note that the SEM micrographs of F1 and F8 (Figure 6a,h) did not show air microbubbles, which may have impacted their mechanical performance. The thickness found in this study was similar to those of films based on BC, glycerol, and PVA as reported by Cazón et al. [89]. The authors also reported that the thickness varied between 0.02 and 0.105 mm, being directly proportional to the amount of polymer present in the film produced. Cazón et al. [89] further reported that the tensile strength increased according to the increase in thickness, as reported in this study. Another study showed that tensile strength as well as the Young's modulus of nanocomposites based on starch and cellulose from banana increased, according to the concentration of cellulose nanofibers in the composition [87]. Qin et al. [90] demonstrated that the tensile strength of collagen-cellulose nanocrystals films increased as the cellulose content increased, where films with 7% and 10% of cellulose nanocrystals presented 1.22 ± 0.36 MPa and 1.57 ± 0.19 MPa, respectively, while the tensile strength of the control sample (only with collagen in its composition) was 0.45 ± 0.19 MPa. The results reported by Antosik et al. [91] showed a different behavior from those found in our study, where the increase in starch concentration resulted in a greater elongation at break and, consequently, a lower tensile strength. The difference between the two studies may be associated with the type of cellulose used, since the study by Antosik et al. [91] used carboxymethyl cellulose of plant origin. An ideal material for wound dressing should preferably have a high elongation at break, since the mechanical stretching of the material may induce tissue regeneration [92,93]. This study showed that F1 (pure BC) had a high elongation (169.54%), while F2 and F3 (BC–starch biocomposite) had the highest elongation (20.29 and 21.39%, respectively) among the biocomposites produced. It should also be noted that F1 was the only biocomposite without a plasticizer (glycerol) in its constitution, which could have resulted in less elongation. However, this result indicates that the compatibility between the biopolymers present in the biocomposite was high, which facilitated their interaction and, consequently, the formation of strong chemical bonds. The elongation of the BC membrane was also superior in the study of Lee et al. [94] compared to that of the membrane consisting only of collagen.

As shown in Figure 7, the thermal stability of the samples also varied according to their constitution. The results showed that F1 had the highest thermal stability. The thermal stability of BC is mainly associated with high crystallinity, high water content, and high purity [95]. Martins et al. [96] reported an increased thermal stability in starch films with the addition of BC, and attributed this increase to not only the high thermal stability of cellulose, but also the excellent polymeric compatibility between starch and cellulose. However, Zhijiang and Guang [38] reported that the thermal stability of the composite improved and the temperature of thermal degradation increased with the incorporation of collagen compared to that of pure BC. Moraes et al. [97] observed that the thermal stability of the BC in the presence of collagen decreased by 30 °C. Nevertheless, the authors considered that BC–collagen hydrogels showed excellent thermal stability. This difference between the studies may be related to the acetylation effect reported by the authors [38], since acetic acid was used as a solvent for collagen, which may have resulted in cellulose acetylation, a process that may increase thermal stability.

5. Conclusions

In the present study, nine different samples were produced based on BC, collagen, starch, and glycerol as the plasticizing agents, with fixed masses of BC and glycerol. All samples were characterized based on their physical, barrier, morphological, mechanical, and thermal properties. The results obtained showed that the performance of a sample was directly related to the presence and the concentration of its constituent components.

The different performances indicate that pure cellulose as well as biocomposites may have different application potentials, mainly depending on the injury type and stage of healing. Thus, the results of this study can contribute to a new perspective in biomedicine (i.e., the treatment of injuries with high-performance biomaterials) positively impacting the quality of life of patients.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/1996-1944/14/2/458/s1>, Figure S1: Real images of bacterial cellulose production and biocomposites, Table S1: Main values related to the thermogravimetric analysis of pure bacterial cellulose (sample F1) and bacterial cellulose–collagen–starch biocomposites (samples F2–F9).

Author Contributions: Conceptualization, S.B.N., K.V.S.H., F.L.P.P., J.D.V.B., R.B. and B.A.S.M.; Data curation, K.V.S.H., F.L.P.P. and B.A.S.M.; Formal analysis, S.B.N., K.V.S.H., G.d.C.S., P.d.S.M. and B.A.S.M.; Methodology, S.B.N., K.V.S.H., G.d.C.S., P.d.S.M. and B.A.S.M.; Project administration, J.D.V.B., R.B. and B.A.S.M.; Software, K.V.S.H., G.d.C.S. and B.A.S.M.; Supervision, J.D.V.B., R.B. and B.A.S.M.; Validation, S.B.N. and B.A.S.M.; Visualization, S.B.N., F.L.P.P. and B.A.S.M.; Writing—original draft, S.B.N., K.V.S.H., F.L.P.P., R.B. and B.A.S.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article or supplementary materials.

Acknowledgments: The authors thank the Integrated Campus of Manufacturing and Technology—SENAI CIMATEC (Bahia), Bahia Research Support Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia—FAPESB); the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq) as well as Davidson M. Moreira (SENAI CIMATEC) and Erick G. S. Nascimento (SENAI CIMATEC).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Xu, Y.; Chen, C.; Hellwarth, P.B.; Bao, X. Biomaterials for stem cell engineering and biomanufacturing. *Bioact. Mater.* **2019**, *4*, 366–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ibrahim, N.; Wong, S.; Mohamed, I.; Mohamed, N.; Chin, K.-Y.; Ima-Nirwana, S.; Shuid, A. Wound Healing Properties of Selected Natural Products. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2018**, *15*, 2360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tavakoli, S.; Klar, A.S. Advanced Hydrogels as Wound Dressings. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Aljghami, M.E.; Saboor, S.; Amini-Nik, S. Emerging Innovative Wound Dressings. *Ann. Biomed. Eng.* **2019**, *47*, 659–675. [[CrossRef](#)]
- Tricco, A.C.; Cogo, E.; Isaranuwachai, W.; Khan, P.A.; Sanmugalingham, G.; Antony, J.; Hoch, J.S.; Straus, S.E. A systematic review of cost-effectiveness analyses of complex wound interventions reveals optimal treatments for specific wound types. *BMC Med.* **2015**, *13*, 90. [[CrossRef](#)]
- Cheng, Q.; Gibb, M.; Graves, N.; Finlayson, K.; Pacella, R.E. Cost-effectiveness analysis of guideline-based optimal care for venous leg ulcers in Australia. *BMC Health Serv. Res.* **2018**, *18*, 421. [[CrossRef](#)]
- Hajjalayani, M.; Tewari, D.; Sobarzo-Sánchez, E.; Nabavi, S.M.; Farzaei, M.H.; Abdollahi, M. Natural product-based nanomedicines for wound healing purposes: Therapeutic targets and drug delivery systems. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 5023–5043. [[CrossRef](#)]
- Naseri-Nosar, M.; Ziora, Z.M. Wound dressings from naturally-occurring polymers: A review on homopolysaccharide-based composites. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *189*, 379–398. [[CrossRef](#)]
- Rezaie, F.; Momeni-Moghaddam, M.; Naderi-Meshkin, H. Regeneration and Repair of Skin Wounds: Various Strategies for Treatment. *Int. J. Low. Extrem. Wounds* **2019**, *18*, 247–261. [[CrossRef](#)]
- Mir, M.; Murtaza, N.A.; Barakullah, A.; Gulzar, A.; Arshad, M.; Fatima, S.; Asad, M. Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: A review. *Prog. Biomater.* **2018**, *7*, 1–21. [[CrossRef](#)]
- Bacakova, M.; Pajorova, J.; Sopuch, T.; Bacakova, L. Fibrin-Modified Cellulose as a Promising Dressing for Accelerated Wound Healing. *Materials* **2018**, *11*, 2314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zhong, Z.; Huang, Y.; Hu, Q.; He, W.; Duan, B.; Yan, X.; Yang, Z.; Liang, W.; Liu, Z.; Peng, Z.; et al. Elucidation of molecular pathways responsible for the accelerated wound healing induced by a novel fibrous chitin dressing. *Biomater. Sci.* **2019**, *7*, 5247–5257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Graça, M.F.P.; Miguel, S.P.; Cabral, C.S.D.; Correia, I.J. Hyaluronic acid—Based wound dressings: A review. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *241*, 116364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Eulálio, H.Y.C.; Vieira, M.; Fideles, T.B.; Tomás, H.; Silva, S.M.L.; Peniche, C.A.; Fook, M.V.L. Physicochemical Properties and Cell Viability of Shrimp Chitosan Films as Affected by Film Casting Solvents. I-Potential Use as Wound Dressing. *Materials* **2020**, *13*, 5005. [[CrossRef](#)]
15. Zhang, W.; Chen, L.; Chen, J.; Wang, L.; Gui, X.; Ran, J.; Xu, G.; Zhao, H.; Zeng, M.; Ji, J.; et al. Silk Fibroin Biomaterial Shows Safe and Effective Wound Healing in Animal Models and a Randomized Controlled Clinical Trial. *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6*, 1–16. [[CrossRef](#)]
16. İnal, M.; Mülazimoğlu, G. Production and characterization of bactericidal wound dressing material based on gelatin nanofiber. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *137*, 392–404. [[CrossRef](#)]
17. Park, S.B.; Lih, E.; Park, K.S.; Joung, Y.K.; Han, D.K. Biopolymer-based functional composites for medical applications. *Prog. Polym. Sci.* **2017**, *68*, 77–105. [[CrossRef](#)]
18. Carvalho, T.; Guedes, G.; Sousa, F.L.; Freire, C.S.R.; Santos, H.A. Latest Advances on Bacterial Cellulose-Based Materials for Wound Healing, Delivery Systems, and Tissue Engineering. *Biotechnol. J.* **2019**, *14*, 1–19. [[CrossRef](#)]
19. Islam, M.U.; Ullah, M.W.; Khan, S.; Shah, N.; Park, J.K. Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *102*, 1166–1173. [[CrossRef](#)]
20. Fang, L.; Catchmark, J.M. Characterization of cellulose and other exopolysaccharides produced from *Gluconacetobacter* strains. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *115*, 663–669. [[CrossRef](#)]
21. Gorgieva, S.; Trček, J. Bacterial Cellulose: Production, Modification and Perspectives in Biomedical Applications. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Shoda, M.; Sugano, Y. Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2005**, *10*, 1–8. [[CrossRef](#)]
23. Sharma, C.; Bhardwaj, N.K. Bacterial nanocellulose: Present status, biomedical applications and future perspectives. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *104*, 109963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. de Fernandes, I.A.A.; Pedro, A.C.; Ribeiro, V.R.; Bortolini, D.G.; Ozaki, M.S.C.; Maciel, G.M.; Haminiuk, C.W.I. Bacterial cellulose: From production optimization to new applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *164*, 2598–2611. [[CrossRef](#)]
25. Naomi, R.; Bt Hj Idrus, R.; Fauzi, M.B. Plant- vs. Bacterial-Derived Cellulose for Wound Healing: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 6803. [[CrossRef](#)]
26. Gao, X.; Shi, Z.; Kuśmierczyk, P.; Liu, C.; Yang, G.; Sevostianov, I.; Silberschmidt, V.V. Time-dependent rheological behaviour of bacterial cellulose hydrogel. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *58*, 153–159. [[CrossRef](#)]
27. Aboelnaga, A.; Elmasry, M.; Adly, O.A.; Elbadawy, M.A.; Abbas, A.H.; Abdelrahman, I.; Salah, O.; Steinvall, I. Microbial cellulose dressing compared with silver sulphadiazine for the treatment of partial thickness burns: A prospective, randomised, clinical trial. *Burns* **2018**, *44*, 1982–1988. [[CrossRef](#)]
28. Liang, J.; Wang, R.; Chen, R. The Impact of Cross-linking Mode on the Physical and Antimicrobial Properties of a Chitosan/Bacterial Cellulose Composite. *Polymer* **2019**, *11*, 491. [[CrossRef](#)]
29. Khalid, A.; Khan, R.; Ul-Islam, M.; Khan, T.; Wahid, F. Bacterial cellulose-zinc oxide nanocomposites as a novel dressing system for burn wounds. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *164*, 214–221. [[CrossRef](#)]
30. Malmir, S.; Karbalaeei, A.; Pourmadadi, M.; Hamed, J.; Yazdian, F.; Navaee, M. Antibacterial properties of a bacterial cellulose CQD-TiO₂ nanocomposite. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *234*, 115835. [[CrossRef](#)]
31. Ul-Islam, M.; Khan, S.; Ullah, M.W.; Park, J.K. Bacterial cellulose composites: Synthetic strategies and multiple applications in bio-medical and electro-conductive fields. *Biotechnol. J.* **2015**, *10*, 1847–1861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Yang, J.; Lv, X.; Chen, S.; Li, Z.; Feng, C.; Wang, H.; Xu, Y. In situ fabrication of a microporous bacterial cellulose/potato starch composite scaffold with enhanced cell compatibility. *Cellulose* **2014**, *21*, 1823–1835. [[CrossRef](#)]
33. Orlando, I.; Basnett, P.; Nigmatullin, R.; Wang, W.; Knowles, J.C.; Roy, I. Chemical Modification of Bacterial Cellulose for the Development of an Antibacterial Wound Dressing. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 557885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ciecholewska-Juśko, D.; Żywicka, A.; Junka, A.; Drozd, R.; Sobolewski, P.; Migdał, P.; Kowalska, U.; Toporkiewicz, M.; Fijałkowski, K. Superabsorbent crosslinked bacterial cellulose biomaterials for chronic wound dressings. *Carbohydr. Polym.* **2021**, 253. [[CrossRef](#)]
35. Malafaya, P.B.; Silva, G.A.; Reis, R.L. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 207–233. [[CrossRef](#)]
36. Chattopadhyay, S.; Raines, R.T. Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers* **2014**, *101*, 821–833. [[CrossRef](#)]
37. de Barud, H.G.O.; da Silva, R.R.; da Silva Barud, H.; Tercjak, A.; Gutierrez, J.; Lustrri, W.R.; de Oliveira, O.B.; Ribeiro, S.J.L. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *153*, 406–420. [[CrossRef](#)]
38. Zhijiang, C.; Guang, Y. Bacterial cellulose/collagen composite: Characterization and first evaluation of cytocompatibility. *J. Appl. Polym. Sci.* **2011**, *120*, 2938–2944. [[CrossRef](#)]
39. Albu, M.G.; Vuluga, Z.; Panaitescu, D.M.; Vuluga, D.M.; Cășărică, A.; Ghiurea, M. Morphology and thermal stability of bacterial cellulose/collagen composites. *Cent. Eur. J. Chem.* **2014**, *12*, 968–975. [[CrossRef](#)]
40. Combrzyński, M.; Matwijczuk, A.; Wójtowicz, A.; Oniszczuk, T.; Karcz, D.; Szponar, J.; Niemczynowicz, A.; Bober, D.; Mitrus, M.; Kupryaniuk, K.; et al. Potato Starch Utilization in Ecological Loose-Fill Packaging Materials—Sustainability and Characterization. *Materials* **2020**, *13*, 1390. [[CrossRef](#)]

41. Liu, G.; Gu, Z.; Hong, Y.; Cheng, L.; Li, C. Electrospun starch nanofibers: Recent advances, challenges, and strategies for potential pharmaceutical applications. *J. Control. Release* **2017**, *252*, 95–107. [CrossRef] [PubMed]
42. Moura, L.I.F.; Dias, A.M.A.; Carvalho, E.; De Sousa, H.C. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—A review. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 7093–7114. [CrossRef] [PubMed]
43. Wound Dressings Market—Global Forecast to 2025 | MarketsandMarkets. Available online: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/wound-dressings-market-123903496.html> (accessed on 28 November 2020).
44. Pruijm, L.; Wind, A.; van Harten, W.H. Assessing and comparing the quality of wound centres: A literature review and benchmarking pilot. *Int. Wound J.* **2017**, *14*, 1120–1136. [CrossRef] [PubMed]
45. Weller, C.D.; Team, V.; Sussman, G. First-Line Interactive Wound Dressing Update: A Comprehensive Review of the Evidence. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 1–13. [CrossRef]
46. Shi, C.; Wang, C.; Liu, H.; Li, Q.; Li, R.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Shao, Y.; Wang, J. Selection of Appropriate Wound Dressing for Various Wounds. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 1–17. [CrossRef]
47. Huang, Y.; Zhu, C.; Yang, J.; Nie, Y.; Chen, C.; Sun, D. Recent advances in bacterial cellulose. *Cellulose* **2014**, *21*, 1–30. [CrossRef]
48. Homaeigozar, S.; Boccaccini, A.R. Antibacterial biohybrid nanofibers for wound dressings. *Acta Biomater.* **2020**, *107*, 25–49. [CrossRef]
49. Hodel, K.V.S.; dos Fonseca, L.M.S.; da Santos, I.M.S.; Cerqueira, J.C.; dos Santos-Júnior, R.E.; Nunes, S.B.; Barbosa, J.D.V.; Machado, B.A.S. Evaluation of Different Methods for Cultivating *Gluconacetobacter hansenii* for Bacterial Cellulose and Montmorillonite Biocomposite Production: Wound-Dressing Applications. *Polymer* **2020**, *12*, 267. [CrossRef]
50. Yang, L.; Paulson, A.T. Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan films. *Food Res. Int.* **2000**, *33*, 563–570. [CrossRef]
51. Cerqueira, J.C.; da Penha, J.S.; Oliveira, R.S.; Guarieiro, L.L.N.; da Melo, P.S.; Viana, J.D.; Machado, B.A.S. Production of biodegradable starch nanocomposites using cellulose nanocrystals extracted from coconut fibers. *Polímeros* **2017**, *27*, 320–329. [CrossRef]
52. Leal, I.L.; da Rosa, Y.C.S.; da Penha, J.S.; Correia, P.R.C.; da Melo, P.S.; Guimarães, D.H.; Barbosa, J.D.V.; Druzian, J.I.; Machado, B.A.S. Development and application starch films:PBAT with additives for evaluating the shelf life of Tommy Atkins mango in the fresh-cut state. *J. Appl. Polym. Sci.* **2019**, 48150–48169. [CrossRef]
53. De Moura, M.R.; Aouada, F.A.; Souza, J.R.; Mattoso, L.H.C. Preparação de novos nanobiocompósitos comestíveis ativos contendo nanoemulsão de canela e pectina. *Polímeros* **2014**, *24*, 486–490. [CrossRef]
54. ASTM. *Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials ASTM 69-00x*; ASTM: West Conshohocken, PA, USA, 2000.
55. Cazón, P.; Velázquez, G.; Vázquez, M. Characterization of bacterial cellulose films combined with chitosan and polyvinyl alcohol: Evaluation of mechanical and barrier properties. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *216*, 72–85. [CrossRef] [PubMed]
56. Almeida, D.M.; Prestes, R.A.; Pinheiro, L.A.; Woiciechowski, A.L.; Wosiacki, G. Propriedades Físicas, Químicas e de Barreira em Filme Formados por Blenda de Celulose Bacteriana e Fécula de Batata. *Polímeros Ciência e Tecnol.* **2013**, *23*, 538–546. [CrossRef]
57. ASTM Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. *ASTM Int.* **2018**, *14*, 1–12. [CrossRef]
58. Rahmi, D.; Paramadina, S.; Anjelika, M.; Widjajanti, R. Optimized swelling properties of hydrogels based on poly(vinyl alcohol)-carrageenan. *AIP Conf. Proc.* **2020**, 2243, 0300191–0300196. [CrossRef]
59. Ul-Islam, M.; Khan, T.; Park, J.K. Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *88*, 596–603. [CrossRef]
60. Machado, B.A.S.; Silva, R.P.D.; de Barreto, G.A.; Costa, S.S.; da Silva, D.F.; Brandão, H.N.; da Rocha, J.L.C.; Dellagostin, O.A.; Henriques, J.A.P.; Umsza-Guez, M.A.; et al. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0145954. [CrossRef]
61. Machado, B.A.S.; Reis, J.H.O.; Da Silva, J.B.; Cruz, L.S.; Nunes, I.L.; Pereira, F.V.; Druzian, J.I. Obtenção de nanocelulose da fibra de coco verde e incorporação em filmes biodegradáveis de amido plastificados com glicerol. *Quim. Nov.* **2014**, *37*, 1275–1282. [CrossRef]
62. de Francisco, A.S.e.S.; de Carlos, A.V.A. The Assisat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *Afr. J. Agric. Res.* **2016**, *11*, 3733–3740. [CrossRef]
63. Stoica, A.E.; Chircov, C.; Grumezescu, A.M. Nanomaterials for Wound Dressings: An Up-to-Date Overview. *Molecules* **2020**, *25*, 2699. [CrossRef] [PubMed]
64. Girard, D.; Laverdet, B.; Buhé, V.; Trouillas, M.; Ghazi, K.; Alexaline, M.M.; Egles, C.; Misery, L.; Coulomb, B.; Lataillade, J.J.; et al. Biotechnological Management of Skin Burn Injuries: Challenges and Perspectives in Wound Healing and Sensory Recovery. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2017**, *23*, 59–82. [CrossRef] [PubMed]
65. Kim, H.S.; Sun, X.; Lee, J.H.; Kim, H.W.; Fu, X.; Leong, K.W. Advanced drug delivery systems and artificial skin grafts for skin wound healing. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *146*, 209–239. [CrossRef] [PubMed]
66. Khang, G.; Martino, M.M.; Balmayor, E.R.; Pandit, A.; Browne, S. Biomaterial-mediated modification of the local inflammatory environment. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2015**, *3*, 67. [CrossRef]
67. Singla, R.; Soni, S.; Patial, V.; Markand Kulurkar, P.; Kumari, A.; Padwad, Y.S.; Kumar Yadav, S.; SPadwad, Y. In vivo diabetic wound healing potential of nanobiocomposites containing bamboo cellulose nanocrystals impregnated with silver nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol. Int. J. Biol.* **2017**, *6*, 45–55. [CrossRef]

68. Wu, C.N.; Fuh, S.C.; Lin, S.P.; Lin, Y.Y.; Chen, H.Y.; Liu, J.M.; Cheng, K.C. TEMPO-Oxidized Bacterial Cellulose Pellicle with Silver Nanoparticles for Wound Dressing. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 544–554. [[CrossRef](#)]
69. Cacicedo, M.L.; Pacheco, G.; Islan, G.A.; Alvarez, V.A.; Barud, H.S.; Castro, G.R. Chitosan-bacterial cellulose patch of ciprofloxacin for wound dressing: Preparation and characterization studies. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *147*, 1136–1145. [[CrossRef](#)]
70. Phomrak, S.; Phisalaphong, M. Reinforcement of Natural Rubber with Bacterial Cellulose via a Latex Aqueous Microdispersion Process. *J. Nanomater.* **2017**, *2017*. [[CrossRef](#)]
71. Yamanaka, S.; Watanabe, K.; Kitamura, N.; Iguchi, M.; Mitsuhashi, S.; Nishi, Y.; Uryu, M. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *J. Mater. Sci.* **1989**, *24*, 3141–3145. [[CrossRef](#)]
72. Cacicedo, M.L.; Castro, M.C.; Servetas, I.; Bosnea, L.; Boura, K.; Tsafraquidou, P.; Dima, A.; Terpou, A.; Koutinas, A.; Castro, G.R. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. *Bioresour. Technol.* **2016**, *213*, 172–180. [[CrossRef](#)]
73. Abral, H.; Hartono, A.; Hafizulhaq, F.; Handayani, D.; Sugiarti, E.; Pradipta, O. Characterization of PVA/cassava starch biocomposites fabricated with and without sonication using bacterial cellulose fiber loadings. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *206*, 593–601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Wilpiszewska, K.; Antosik, A.K.; Schmidt, B.; Janik, J.; Rokicka, J. Hydrophilic Films Based on Carboxymethylated Derivatives of Starch and Cellulose. *Polymer* **2020**, *12*, 2447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Santos, T.A.; Spinacé, M.A.S. Sandwich panel biocomposite of thermoplastic corn starch and bacterial cellulose. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *167*, 358–368. [[CrossRef](#)]
76. von Cramon, L.; Markowicz, M.; Nebendahl, J.; Buchinger-Kähler, V.C.; Noah, E.M.; Narwan, M.; Behrendt, A.; Pallua, N.; Steinhoff, A. A clinical evaluation of a transparent, absorbent, adhesive wound dressing. *Br. J. Nurs.* **2017**, *26*, S46–S53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Cazón, P.; Vázquez, M.; Velazquez, G. Environmentally Friendly Films Combining Bacterial Cellulose, Chitosan, and Polyvinyl Alcohol: Effect of Water Activity on Barrier, Mechanical, and Optical Properties. *Biomacromolecules* **2020**, *21*, 753–760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Siracusa, V.; Rocculi, P.; Romani, S.; Rosa, M.D. Biodegradable polymers for food packaging: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2008**, *19*, 634–643. [[CrossRef](#)]
79. Pasaribu, K.M.; Gea, S.; Ilyas, S.; Tamrin, T.; Radecka, I. Characterization of Bacterial Cellulose-Based Wound Dressing in Different Order Impregnation of Chitosan and Collagen. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1511. [[CrossRef](#)]
80. Saska, S.; Teixeira, L.N.; Tambasco de Oliveira, P.; Minarelli Gaspar, A.M.; Lima Ribeiro, S.J.; Messaddeq, Y.; Marchetto, R. Bacterial cellulose-collagen nanocomposite for bone tissue engineering. *J. Mater. Chem.* **2012**. [[CrossRef](#)]
81. Noh, Y.K.; Dos Santos Da Costa, A.; Park, Y.S.; Du, P.; Kim, I.-H.; Park, K. Fabrication of bacterial cellulose-collagen composite scaffolds and their osteogenic effect on human mesenchymal stem cells. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *219*, 210–218. [[CrossRef](#)]
82. Priya, B.; Gupta, V.K.; Pathania, D.; Singha, A.S. Synthesis, characterization and antibacterial activity of biodegradable starch/PVA composite films reinforced with cellulosic fibre. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *109*, 171–179. [[CrossRef](#)]
83. Dutta, S.D.; Patel, D.K.; Lim, K.-T. Functional cellulose-based hydrogels as extracellular matrices for tissue engineering. *J. Biol. Eng.* **2019**, *13*, 1–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Oryan, A.; Alemzadeh, E.; Moshiri, A. Burn wound healing: Present concepts, treatment strategies and future directions. *J. Wound Care* **2017**, *26*, 5–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Zarrintaj, P.; Moghaddam, A.S.; Manouchehri, S.; Atoufi, Z.; Amiri, A.; Amirkhani, M.A.; Nilforoushzadeh, M.A.; Saeb, M.R.; Hamblin, M.R.; Mozafari, M. Can regenerative medicine and nanotechnology combine to heal wounds? The search for the ideal wound dressing. *Nanomedicine* **2017**, *12*, 2403–2422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Zhuang, Y.; Ruan, S.; Yao, H.; Sun, Y. Physical properties of composite films from tilapia skin collagen with Pachyrhizus starch and rambutan peel phenolics. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 662. [[CrossRef](#)]
87. Tibolla, H.; Czaikoski, A.; Pelissari, F.M.; Menegalli, F.C.; Cunha, R.L. Starch-based nanocomposites with cellulose nanofibers obtained from chemical and mechanical treatments. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *161*, 132–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Samadian, H.; Zamiri, S.; Ehterami, A.; Farzamfar, S.; Vaez, A.; Khastar, H.; Alam, M.; Ai, A.; Derakhshankhah, H.; Allahyari, Z.; et al. Electrospun cellulose acetate/gelatin nanofibrous wound dressing containing berberine for diabetic foot ulcer healing: In Vitro and in vivo studies. *Sci. Rep.* **2020**, *10*. [[CrossRef](#)]
89. Cazón, P.; Vázquez, M.; Velazquez, G. Composite Films with UV-Barrier Properties of Bacterial Cellulose with Glycerol and Poly(vinyl alcohol): Puncture Properties, Solubility, and Swelling Degree. *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 3115–3125. [[CrossRef](#)]
90. Qin, L.; Gao, H.; Xiong, S.; Jia, Y.; Ren, L. Preparation of collagen/cellulose nanocrystals composite films and their potential applications in corneal repair. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2020**, *31*, 1–11. [[CrossRef](#)]
91. Antosik, A.K.; Piątek, A.; Wilpiszewska, K. Carboxymethylated starch and cellulose derivatives-based film as human skin equivalent for adhesive properties testing. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *222*, 115014. [[CrossRef](#)]
92. Mirza, A.M.J.; Parham, S.Z.; Seyed, M.M.B.; Keyvan, S.Z.; Ameneh, G.; Aref, A.R.; Karimi, M.; Hamblin, M.R. Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *123*, 33–64. [[CrossRef](#)]
93. Zaman, H.U.; Islam, J.M.M.; Khan, M.A.; Khan, R.A. Physico-mechanical properties of wound dressing material and its biomedical application. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2011**, *4*, 1369–1375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

94. Lee, Y.-J.; An, S.-J.; Bae, E.-B.; Gwon, H.-J.; Park, J.-S.; Jeong, S.; Jeon, Y.-C.; Lee, S.-H.; Lim, Y.-M.; Huh, J.-B. The Effect of Thickness of Resorbable Bacterial Cellulose Membrane on Guided Bone Regeneration. *Materials* **2017**, *10*, 320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Qiu, K.; Netravali, A.N. A review of fabrication and applications of bacterial cellulose based nanocomposites. *Polym. Rev.* **2014**, *54*, 598–626. [[CrossRef](#)]
96. Martins, I.M.G.; Magina, S.P.; Oliveira, L.; Freire, C.S.R.; Silvestre, A.J.D.; Neto, C.P.; Gandini, A. New biocomposites based on thermoplastic starch and bacterial cellulose. *Compos. Sci. Technol.* **2009**, *69*, 2163–2168. [[CrossRef](#)]
97. de Moraes, P.R.F.S.; Saska, S.; Barud, H.; de Lima, L.R.; da Martins, V.C.A.; de Plepis, A.M.G.; Ribeiro, S.J.L.; Gaspar, A.M.M. Bacterial Cellulose/Collagen Hydrogel for Wound Healing. *Mater. Res.* **2016**, *19*, 106–116. [[CrossRef](#)]

CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO GERAL

Diante dos resultados encontrados neste estudo e em atendimento aos objetivos propostos, as seguintes conclusões podem ser observadas:

- Para a avaliação das melhores condições de cultivo do microrganismo (*G. hansenii* ATCC 23769), dentre as fontes de carbono testadas, a glicose em sua maior concentração (50 g·L⁻¹) foi a que melhor contribuiu para o processo fermentativo, melhorando o rendimento e produção da CB;
- Quanto à produção de biocompósitos CB-MMT, foi possível observar que a presença da argila mineral modificou significativamente as propriedades físicas e de barreiras, assim como as propriedades térmicas e morfológicas em relação à amostra controle, até mesmo em sua menor concentração (0,5%, encontrado na amostra F2);
- Quanto à utilização de colágeno e amido na matriz celulósica para formação das blendas poliméricas, os resultados indicaram a possibilidade de aplicação das diferentes amostras produzidas de acordo com o tipo de lesão, bem como em diferentes estágios de processos de cicatrização. Destaca-se a possibilidade de aplicação da amostra F2 para o tratamento de lesões que liberem uma maior quantidade de exsudatos, bem como das amostras F2-F9 como curativos transparentes, uma das principais necessidades desse setor. Além disso, os resultados indicaram melhorias à performance da CB associada às principais características das amostras, dentre elas a ação plastificante do colágeno e a ação gelificante do amido.

Sendo assim, esses resultados contribuem para uma nova perspectiva a esta área com a produção de biomateriais de alta performance, não restringindo, a aplicação dos destes em outras áreas do conhecimento.

ANEXOS

ANEXO I: Produção Científica

Total de Publicações: 2 artigos em revistas (Quali Capes A1) / 06 trabalhos em congressos

Artigos publicados em periódicos

HODEL, K. V. S.; FONSECA, L. M. S.; SANTOS, I. M. S.; CERQUEIRA, J. C.; SANTOS JUNIOR, R. E.; NUNES, S. B.; BARBOSA, J. D. V.; MACHADO, B. A. S. Evaluation of Different Methods for Cultivating *Gluconacetobacter hansenii* for Bacterial Cellulose and Montmorillonite Biocomposite Production: Wound-Dressing Applications. *Polymers*, v. 12, n. 2, p. 267, 2020.

NUNES, S. B.; HODEL, K. V. S.; SACRAMENTO, G. C.; MELO, P. S.; PESSOA, F. L. P.; BARBOSA, J. D. V.; BADARÓ, R.; MACHADO, B. A. S. Development of Bacterial Cellulose Biocomposites Combined with Starch and Collagen and Evaluation of Their Properties. *Materials*, v.14, n. 2, p. 458, 2021.

Trabalhos publicados em congressos

HODEL, K. V. S.; LEAL, I. L.; CERQUEIRA, J. C.; SANTOS, I. M. S.; SANTOS JUNIOR, R. E.; NUNES, S. B.; BARBOSA, J. D. V.; MACHADO, B. A. S. Celulose bacteriana como curativos: uma prospecção tecnológica fundamentada em documentos de patentes. In: 15º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2019, Bento Gonçalves. 15º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2019.

HODEL, K. V. S.; SACRAMENTO, G. C.; NUNES, S. B.; BARBOSA, J. D. V.; MACHADO, B. A. S. Propriedades de barreira de biocurativos a base de celulose bacteriana, colágeno e amido. In: 15º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2019, Bento Gonçalves. 15º Congresso Brasileiro de Polímeros.

SACRAMENTO, G. C.; HODEL, K. V. S.; NUNES, S. B.; BARBOSA, J. D. V.; MACHADO, B. A. S. Biossíntese de celulose bacteriana utilizando *Gluconacetobacter hansenii* para utilização como polímero base para membranas ativas. In: IV Seminário de Avaliação de Pesquisa Científica e Tecnológica (SAPCT) e III Workshop de Integração e Capacitação em Processamento de Alto Desempenho (ICPAD), 2019, Salvador.

HODEL, K. V. S.; SACRAMENTO, G. C.; NUNES, S. B.; BARBOSA, J. D. V.; MACHADO, B. A. S. Produção e caracterização de biocurativos a base de celulose bacteriana, amido e colágeno como material potencial para tratamento de lesões dérmicas. In: IV Seminário de Avaliação de Pesquisa Científica e Tecnológica (SAPCT) e III Workshop de Integração e Capacitação em Processamento de Alto Desempenho (ICPAD), 2019, Salvador.

HODEL, K. V. S.; CERQUEIRA, J. C.; SANTOS, I. M. S.; SANTOS JUNIOR, R. E.; NUNES, S. B.; BARBOSA, J. D. V.; MACHADO, B. A. S. Produção e caracterização de celulose bacteriana como material potencial para curativo de feridas dérmicas. In: 4º Encontro Nordeste de Ciência e Tecnologia de Polímeros, 2018, Aracaju.

REFERÊNCIAS

A S KESHK, S. M.; A RAZEK, T. M.; SAMESHIMA, K. Bacterial Cellulose Production from Beet Molasses. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 17, p. 1519–1523, 2006.

ABITBOL, T. et al. **Nanocellulose, a tiny fiber with huge applications** *Current Opinion in Biotechnology* Elsevier Ltd, , jun. 2016.

ABRAL, H. et al. Characterization of PVA/cassava starch biocomposites fabricated with and without sonication using bacterial cellulose fiber loadings. **Carbohydrate Polymers**, v. 206, p. 593–601, fev. 2019.

ADUSUMALI, R.-B. et al. Mechanical Properties of Regenerated Cellulose Fibres for Composites. **Macromolecular Symposia**, v. 244, n. 1, p. 119–125, dez. 2006.

AKKAM, A. Y. et al. Epidemiology of pediatric patients admitted to a Burns ICU in Saudi Arabia. **Burns Open**, v. 4, n. 3, p. 90–93, jun. 2020.

ALMEIDA, I. F. et al. Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: An in vivo skin compatibility study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 3, p. 332–336, abr. 2014.

ANDERSON, I. Key principles involved in applying and removing wound dressings. **Nursing Standard**, v. 25, n. 10, p. 51–57, nov. 2010.

ANDRADE, F. K. et al. Improving the affinity of fibroblasts for bacterial cellulose using carbohydrate-binding modules fused to RGD. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 92, n. 1, p. 9–17, 2010.

ANTON-SALES, I. et al. Opportunities of Bacterial Cellulose to Treat Epithelial Tissues. **Current Drug Targets**, v. 20, n. 8, p. 808–822, nov. 2018.

ASHRAF, R. et al. **Recent Trends in the Fabrication of Starch Nanofibers: Electrospinning and Non-electrospinning Routes and Their Applications in Biotechnology** *Applied Biochemistry and Biotechnology* Humana Press Inc., , jan. 2019.

BAI, Y. et al. Graphene/Carbon Nanotube/Bacterial Cellulose assisted supporting for polypyrrole towards flexible supercapacitor applications. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 777, p. 524–530, mar. 2019.

BANDYOPADHYAY, S. et al. Bacterial cellulose and guar gum based modified PVP-CMC hydrogel films: Characterized for packaging fresh berries. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 22, p. 100402, dez. 2019.

BARUD, H. G. DE O. et al. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 406–420, 2016.

BASIAK, E.; LENART, A.; DEBEAUFORT, F. How glycerol and water contents affect the structural and functional properties of starch-based edible films. **Polymers**, v. 10, n.

4, abr. 2018.

BAYAZIDI, P.; ALMASI, H.; ASL, A. K. Immobilization of lysozyme on bacterial cellulose nanofibers: Characteristics, antimicrobial activity and morphological properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 2544–2551, fev. 2018.

BEE, S.-L. et al. Polymer nanocomposites based on silylated-montmorillonite: A review. **Progress in Polymer Science**, v. 85, p. 57–82, out. 2018.

BHATTACHARYYA, K. G.; GUPTA, S. SEN. Adsorption of a few heavy metals on natural and modified kaolinite and montmorillonite: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 140, n. 2, p. 114–131, ago. 2008.

BODIN, A. et al. Bacterial cellulose as a potential meniscus implant. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 1, n. 5, p. 406–408, 2007.

BOURAKADI, K. EL et al. Chitosan/polyvinyl alcohol/thiabendazolium-montmorillonite bio-nanocomposite films: Mechanical, morphological and antimicrobial properties. **Composites Part B: Engineering**, v. 172, p. 103–110, set. 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, T. E I. E. Membrana de Biocelulose no tratamento de: lesões cutâneas com perda de pele, úlceras venosas e arteriais, lesões por pressão, queimaduras de segundo grau e áreas doadoras de enxerto TT - Biocelulose membrane, non-treatment of: lesions cutaneous lesion, v. 2018a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, T. E I. E. Membrana de Biocelulose no tratamento de: lesões cutâneas com perda de pele, úlceras venosas e arteriais, lesões por pressão, queimaduras de segundo grau e áreas doadoras de enxerto TT - Biocelulose membrane, non-treatment of: lesions cutaneous lesion, v. 2018b.

CACICEDO, M. L. et al. **Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications** *Bioresource Technology* Elsevier Ltd, , 2016.

CASTRO, C. et al. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 96–102, fev. 2011.

CAZÓN, P.; VÁZQUEZ, M.; VELAZQUEZ, G. Composite Films with UV-Barrier Properties of Bacterial Cellulose with Glycerol and Poly(vinyl alcohol): Puncture Properties, Solubility, and Swelling Degree. **Biomacromolecules**, v. 20, n. 8, p. 3115–3125, ago. 2019.

CHAWLA, P. R. et al. Microbial cellulose: Fermentative production and applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107–124, 2009.

CHEN, L.; ZOU, M.; HONG, F. F. Evaluation of Fungal Laccase Immobilized on Natural Nanostructured Bacterial Cellulose. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 10 nov. 2015.

CHIAOPRAKOBKIJ, N. et al. Fabrication and characterization of novel bacterial cellulose/alginate/gelatin biocomposite film. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 30, n. 11, p. 961–982, jul. 2019.

CHOI, S. M.; SHIN, E. J. **The nanofication and functionalization of bacterial cellulose and its applications** *Nanomaterials* MDPI AG, , mar. 2020.

CHU, V.; BEGAJ, A.; PATEL, L. Burns challenges – A social media dictated phenomena in the younger generation. **Burns Open**, v. 2, n. 2, p. 94–97, abr. 2018.

COSTA, A. et al. Bacterial Cellulose Applied to the Production of an Electrical Insulating Biomaterial. **Chemical Engineering Transactions**, v. 74, p. 1123–1128, 2019.

CZAJA, W. et al. Microbial cellulose - The natural power to heal wounds. **Biomaterials**, 2006.

DAS, A.; UPPALURI, R.; DAS, C. Feasibility of poly-vinyl alcohol/starch/glycerol/citric acid composite films for wound dressing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 998–1007, jun. 2019.

DAYAL, M. S. et al. Effect of media components on cell growth and bacterial cellulose production from *Acetobacter acetii* MTCC 2623. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 12–16, abr. 2013.

DE AMORIM, J. D. P. et al. Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 3, p. 851–869, 23 maio 2020.

DE MELO, V. et al. Colágeno: características generales y producción de péptidos bioactivos: una revisión con énfasis en los subproductos de pescado. **Acta de Pesca y Recursos Acuáticos**, v. 5, n. 2, p. 56–68, 2017.

DE SOUZA, A. G. et al. Synergic antimicrobial properties of Carvacrol essential oil and montmorillonite in biodegradable starch films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 1737–1747, dez. 2020.

DHARMALINGAM, K. et al. Microwave-assisted synthesis of cellulose/zinc-sulfate-calcium-phosphate (ZSCAP) nanocomposites for biomedical applications. 2019.

DIDIER PEDROSA DE AMORIM, J. et al. Biomask, a Polymer Blend for Treatment and Healing of Skin Prone to Acne. **Chemical Engineering Transactions**, v. 79, n. in press, 2020.

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

DÓRAME-MIRANDA, R. F. et al. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter entanii* using pecan nutshell as carbon source and its chemical functionalization. **Carbohydrate Polymers**, 2019.

DUGAN, J. M.; GOUGH, J. E.; EICHHORN, S. J. **Bacterial cellulose scaffolds and cellulose nanowhiskers for tissue engineering** *Nanomedicine* Future Medicine Ltd., , 2013.

DYDAK, K. et al. Development and biological evaluation of Ti6Al7Nb scaffold implants coated with gentamycin-saturated bacterial cellulose biomaterial. 2018.

ERBAS KIZILTAS, E.; KIZILTAS, A.; GARDNER, D. J. Synthesis of bacterial cellulose using hot water extracted wood sugars. **Carbohydrate Polymers**, v. 124, p. 131–138, jul. 2015.

FABRA, M. J. et al. Improving the barrier properties of thermoplastic corn starch-based films containing bacterial cellulose nanowhiskers by means of PHA electrospun coatings of interest in food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 261–268, dez. 2016.

FAUZI, M. B. et al. Ovine tendon collagen: Extraction, characterisation and fabrication of thin films for tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 68, p. 163–171, nov. 2016.

FOLHA VITÓRIA. **Brasil registra aumento de 25% em queimaduras desde o início da pandemia.** Disponível em: <<https://www.folhavoria.com.br/saude/noticia/06/2020/brasil-registra-aumento-de-25-em-queimaduras-desde-o-inicio-da-pandemia>>. Acesso em: 3 nov. 2021.

FONTANA, J. D. et al. New Insights on Bacterial Cellulose. In: **Food Biosynthesis**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 213–249.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1432–1442, 2013.

GOPI, S. et al. **General scenarios of cellulose and its use in the biomedical field** *Materials Today Chemistry* Elsevier Ltd, , set. 2019.

GOTTSCHALK, L. M. F. ET AL. Produção de Celulose Bacteriana e suas Aplicações. **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, 2021.

GUAN, F. et al. Mechanically robust reduced graphene oxide/bacterial cellulose film obtained via biosynthesis for flexible supercapacitor. **Chemical Engineering Journal**, v. 360, p. 829–837, mar. 2019.

GUO, Y. et al. Nano-bacterial cellulose/soy protein isolate complex gel as fat substitutes in ice cream model. **Carbohydrate Polymers**, v. 198, p. 620–630, out. 2018.

HAIGLER, C. H. et al. Alteration of in vivo cellulose ribbon assembly by carboxymethylcellulose and other cellulose derivatives. **Journal of Cell Biology**, v. 94, n. 1, p. 64–69, 1982.

HASAN, N.; BIAK, D.; KAMARUDIN, S. Application of Bacterial Cellulose (BC) in Natural Facial Scrub. **International Journal on Advanced Science Engineering**

Information Technology, v. 2, n. 4, p. 1–4, 2012.

HAYDEL, S. E.; REMENIH, C. M.; WILLIAMS, L. B. Broad-spectrum in vitro antibacterial activities of clay minerals against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant bacterial pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 2, p. 353–361, 19 dez. 2007.

HE, H. et al. Silylation of clay mineral surfaces. **Applied Clay Science**, v. 71, p. 15–20, jan. 2013.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum* . 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochemical Journal**, v. 58, n. 2, p. 345–352, 1954.

HODEL, K. V. S. et al. Evaluation of different methods for cultivating gluconacetobacter hansenii for bacterial cellulose and montmorillonite biocomposite production: Wound-dressing applications. **Polymers**, v. 12, n. 2, 2020a.

HODEL, K. V. S. et al. Evaluation of Different Methods for Cultivating Gluconacetobacter hansenii for Bacterial Cellulose and Montmorillonite Biocomposite Production: Wound-Dressing Applications. **Polymers**, v. 12, n. 2, p. 267, 26 jan. 2020b.

HORUE, M. et al. Antimicrobial activities of bacterial cellulose – Silver montmorillonite nanocomposites for wound healing. **Materials Science and Engineering: C**, v. 116, p. 111152, nov. 2020.

HOSSEINI, H.; KOKABI, M.; MOUSAVI, S. M. Conductive bacterial cellulose/multiwall carbon nanotubes nanocomposite aerogel as a potentially flexible lightweight strain sensor. 2018.

HUANG, H. C. et al. In situ modification of bacterial cellulose network structure by adding interfering substances during fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6084–6091, ago. 2010.

HUNGUND, B.; HUNGUND, B. S.; GUPTA, S. G. Improved Production of Bacterial Cellulose From Gluconacetobacter Persimmonis GH-2. **Article in Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 2, n. 5, p. 127, 2010.

IBARRA-SÁNCHEZ, L. A. et al. Invited review: Advances in nisin use for preservation of dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 3, p. 2041–2052, mar. 2020.

JANG, W. D. et al. **Bacterial cellulose as an example product for sustainable production and consumption** *Microbial Biotechnology* John Wiley and Sons Ltd, , set. 2017.

JEAN-YVES LEGENDRE. **Assembly comprising a substrate comprising biocellulose, and a powdered cosmetic composition to be brought into contact with the substrate** United States, 2008. Disponível em:

<<https://patents.google.com/patent/US20090041815>>

JESCHKE, M. G. et al. **Wound Coverage Technologies in Burn Care: Established Techniques***Journal of Burn Care and Research*Oxford University Press, , abr. 2018.

JIPA, I. M.; STOICA-GUZUN, A.; STROESCU, M. Controlled release of sorbic acid from bacterial cellulose based mono and multilayer antimicrobial films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 400–406, jul. 2012.

KARLSSON, M. et al. Burn scar outcome at six and 12 months after injury in children with partial thickness scalds: Effects of dressing treatment. **Burns**, v. 46, n. 3, p. 546–551, maio 2020.

KHAN, S. et al. Preparation and structural characterization of surface modified microporous bacterial cellulose scaffolds: A potential material for skin regeneration applications in vitro and in vivo. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 1200–1210, 2018.

KHORASANI, A. C.; SHOJAOSADATI, S. A. Bacterial nanocellulose-pectin bionanocomposites as prebiotics against drying and gastrointestinal condition. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 83, p. 9–18, fev. 2016.

KIM, H.-J. et al. Bacterial Nano-Cellulose Triboelectric Nanogenerator. **Nano Energy**, v. 33, p. 130–137, mar. 2017.

KLEMM, D. et al. **Bacterial synthesized cellulose - Artificial blood vessels for microsurgery***Progress in Polymer Science (Oxford)*Elsevier Ltd, , nov. 2001.

KLEMM, D. et al. **Nanocelluloses as innovative polymers in research and application***Advances in Polymer Science*Springer, Berlin, Heidelberg , , 2006.

KLEMM, D. et al. Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science: Today's state. **Materials Today**, v. 21, n. 7, p. 720–748, set. 2018.

KOWALSKA-LUDWICKA, K. et al. Modified bacterial cellulose tubes for regeneration of damaged peripheral nerves. **Archives of Medical Science**, v. 9, n. 3, p. 527–534, jun. 2013.

KWAK, M. H. et al. Bacterial cellulose membrane produced by *Acetobacter* sp. A10 for burn wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 387–398, 2015.

LAGUS, H. et al. Prospective study on burns treated with Integra[®], a cellulose sponge and split thickness skin graft: Comparative clinical and histological study - Randomized controlled trial. **Burns**, v. 39, n. 8, p. 1577–1587, dez. 2013.

LEE, K. Y. et al. More than meets the eye in bacterial cellulose: Biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, n. 1, p. 10–32, jan. 2014.

LI, H. et al. Starch branching enzymes contributing to amylose and amylopectin fine structure in wheat. **Carbohydrate Polymers**, v. 224, nov. 2019a.

LI, K. et al. Bioinspired interface engineering of gelatin/cellulose nanofibrils nanocomposites with high mechanical performance and antibacterial properties for active packaging. **Composites Part B**, v. 171, p. 222–234, 2019b.

LI, X.; WAN, W.; PANCHAL, C. J. **TRANSPARENT BACTERIAL CELLULOSE NANOCOMPOSITE HYDROGELS** United States, 2015.

LIMA, R. V. K. S.; COLTRO, P. S.; JÚNIOR, J. A. F. **Terapia por pressão negativa no tratamento de feridas complexas** *Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes* Colegio Brasileiro de Cirurgioes, , jan. 2017.

LIN, K. W.; LIN, H. Y. Quality Characteristics of Chinese-style Meatball Containing Bacterial Cellulose (Nata). **Journal of Food Science**, v. 69, n. 3, p. SNQ107–SNQ111, 31 maio 2006.

LIN, W. C. et al. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 603–611, abr. 2013.

LIN, Y.-C. et al. **Cosmetic composition containing fragments of bacterial cellulose film and method for manufacturing thereof** United States, 2015. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US20150216784A1/en>>

LIU, K.; CATCHMARK, J. M. Bacterial cellulose/hyaluronic acid nanocomposites production through co-culturing *Gluconacetobacter hansenii* and *Lactococcus lactis* in a two-vessel circulating system. **Bioresource Technology**, v. 290, n. May, 2019.

LIU, L.; LUO, X.; NIU, T. Creditability analysis of grounding grid corrosion diagnosis. **International Journal of Applied Electromagnetics and Mechanics**, v. 33, n. 3–4, p. 1591–1597, 8 out. 2010.

LOPES, J. L. et al. Friction and wear behaviour of bacterial cellulose against articular cartilage. **Wear**, v. 271, n. 9–10, p. 2328–2333, jul. 2011.

LUDWICKA, K. et al. Medical and Cosmetic Applications of Bacterial NanoCellulose. In: **Bacterial Nanocellulose**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 145–165.

LUO, H. et al. Bacterial cellulose/graphene oxide nanocomposite as a novel drug delivery system. 2016.

MBITUYIMANA, B. et al. Bacterial cellulose-based composites for biomedical and cosmetic applications: Research progress and existing products. **Carbohydrate Polymers**, v. 273, p. 118565, 1 dez. 2021.

MELNIKOVA, N. et al. The New Pharmaceutical Compositions of Zinc Oxide Nanoparticles and Triterpenoids for the Burn Treatment. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 9, p. 207, ago. 2020.

MENG, N. et al. Synthesis and antimicrobial activities of polymer/montmorillonite–chlorhexidine acetate nanocomposite films. **Applied Clay Science**, v. 42, n. 3–4, p. 667–670, jan. 2009.

MICHALAK, M.; KRUCIŃSKA, I. A smart fabric with increased insulating properties. **Textile Research Journal**, v. 86, n. 1, p. 97–111, 13 jan. 2016.

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

MOHAMMADKAZEMI, F.; AZIN, M.; ASHORI, A. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 518–523, mar. 2015.

MOHITE, B. V.; PATIL, S. V. A novel biomaterial: bacterial cellulose and its new era applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 101–110, mar. 2014.

MOLINA-RAMÍREZ, C. et al. Effect of different carbon sources on bacterial nanocellulose production and structure using the low pH resistant strain *Komagataeibacter medellinensis*. **Materials**, 2017.

MOREIRA, S. S. et al. Implantação de nova tecnologia para otimização do atendimento em ambulatório de queimados, sem adição de custos. **Rev Bras Queimaduras**, v. 12, n. 2, p. 87–102, 2013.

NAKAGAITO, A. N.; IWAMOTO, S.; YANO, H. Bacterial cellulose: The ultimate nano-scalar cellulose morphology for the production of high-strength composites. **Applied Physics A: Materials Science and Processing**, v. 80, n. 1, p. 93–97, jan. 2005.

NILFOROUSHZADEH, M. A. et al. Skin care and rejuvenation by cosmeceutical facial mask. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 17, n. 5, p. 693–702, out. 2018.

NÓBREGA, V. et al. From a Basic Microalga and an Acetic Acid Bacterium Cellulose Producer to a Living Symbiotic Biofilm. **Materials**, v. 12, n. 14, p. 2275, jul. 2019.

NOH, Y. K. et al. Fabrication of bacterial cellulose-collagen composite scaffolds and their osteogenic effect on human mesenchymal stem cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 219, p. 210–218, 1 set. 2019.

NUMATA, Y. et al. Structural and rheological characterization of bacterial cellulose gels obtained from *Gluconacetobacter* genus. 2019a.

NUMATA, Y. et al. Structural and rheological characterization of bacterial cellulose gels obtained from *Gluconacetobacter* genus. **Food Hydrocolloids**, v. 92, p. 233–239, jul. 2019b.

OGAWA, R.; TOKURA, S. Preparation of bacterial cellulose containing N-

acetylglucosamine residues. **Carbohydrate Polymers**, v. 19, n. 3, p. 171–178, jan. 1992.

ORLANDO, I. et al. Chemical Modification of Bacterial Cellulose for the Development of an Antibacterial Wound Dressing. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 557885, 24 set. 2020.

PACHECO, G. et al. Bacterial cellulose skin masks-Properties and sensory tests. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 17, n. 5, p. 840–847, out. 2018.

PADRÃO, J. et al. Bacterial cellulose-lactoferrin as an antimicrobial edible packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 126–140, jul. 2016.

PANESAR, P. S. et al. Production of microbial cellulose: Response surface methodology approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 930–934, jan. 2012.

PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. **Materials**, v. 3, n. 3, p. 1863–1887, 2010.

PEREIRA, C. S. et al. New starch-based thermoplastic hydrogels for use as bone cements or drug-delivery carriers. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 9, n. 12, p. 825–833, 1998.

PETERSEN, N.; GATENHOLM, P. **Bacterial cellulose-based materials and medical devices: Current state and perspectives** **Applied Microbiology and Biotechnology** Appl Microbiol Biotechnol, , set. 2011.

PHISALAPHONG, M.; CHIAOPRAKOBKIJ, N. Applications and Products—Nata de Coco. In: **Bacterial NanoCellulose**. 1st Editio ed. [s.l.] CRC Press, 2012. p. 144–154.

PICCOLO, N. S. et al. **Fat Grafting for Treatment of Facial Burns and Burn Scars** **Clinics in Plastic Surgery** W.B. Saunders, , jan. 2020.

PINEDA, L. D. C.; MESA, L. A. C.; RIASCOS, C. A. M. Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. **Ingeniería y Ciencia**, v. 8, n. 16, p. 307–335, 2012.

PORTELA, R. et al. Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 586–610, jul. 2019.

POTIVARA, K.; PHISALAPHONG, M. Development and Characterization of Bacterial Cellulose Reinforced with Natural Rubber. **Materials**, v. 12, n. 14, p. 2323, jul. 2019.

QIU, Y. et al. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-vaccarin membranes for wound healing. **Materials Science and Engineering C**, v. 59, p. 303–309, fev. 2016.

REVIN, V. et al. Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2018.

RINAUDO, M. **Main properties and current applications of some**

polysaccharides as biomaterials*Polymer International* John Wiley & Sons, Ltd, , mar. 2008.

RUEDA, L. et al. The role of reactive silicates on the structure/property relationships and cell response evaluation in polyurethane nanocomposites. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 97A, n. 4, p. 480–489, 15 jun. 2011.

RUKA, D. R.; SIMON, G. P.; DEAN, K. M. In situ modifications to bacterial cellulose with the water insoluble polymer poly-3-hydroxybutyrate. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1717–1723, fev. 2013.

SAICHANA, N. et al. **Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications***Biotechnology Advances*, 2015.

SAJJAD, W. et al. Development of modified montmorillonite-bacterial cellulose nanocomposites as a novel substitute for burn skin and tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 206, p. 548–556, fev. 2019.

SALARI, M. et al. Development and evaluation of chitosan based active nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals and silver nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 84, p. 414–423, nov. 2018.

SAYED, M. et al. Influence of the thermal treatment on the characteristics of porous geopolymers as potential biomaterials. **Materials Science and Engineering C**, v. 116, nov. 2020.

SELL, S. A. et al. The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogues. **Polymers**, v. 2, n. 4, p. 522–553, nov. 2010.

SHAFIPOUR YORDSHAHI, A. et al. Design and preparation of antimicrobial meat wrapping nanopaper with bacterial cellulose and postbiotics of lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 321, p. 108561, maio 2020.

SHAH, J.; MALCOLM BROWN, R. Towards electronic paper displays made from microbial cellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 4, p. 352–355, 5 jan. 2005.

SHI, Z. et al. Utilization of bacterial cellulose in food. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 539–545, 2014.

SHPICHKA, A. et al. **Skin tissue regeneration for burn injury***Stem Cell Research and Therapy*BioMed Central Ltd., , mar. 2019.

SIONKOWSKA, A. **Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review***Progress in Polymer Science (Oxford)*Pergamon, , set. 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUEIMADURAS. **Vítimas de Queimaduras**. Disponível em: <De acordo com a Sociedade Brasileira de Queimaduras (SBQ), cerca de 1 milhão de pessoas são vítimas de queimaduras, todos os anos, no Brasil>. Acesso em: 3 nov.

2021.

SON, H. J. et al. Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions. **Bioresource Technology**, v. 86, n. 3, p. 215–219, fev. 2003.

SORUSHANOVA, A. et al. **The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development** *Advanced Materials* Wiley-VCH Verlag, , jan. 2019.

STOJKO, M. et al. Biodegradable electrospun nonwovens releasing propolis as a promising dressing material for burn wound treatment. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 9, p. 1–18, 2020.

TOON, C. D. et al. **Early versus delayed dressing removal after primary closure of clean and clean-contaminated surgical wounds** *Cochrane Database of Systematic Reviews* John Wiley and Sons Ltd, , set. 2015.

TORGBO, S.; SUKYAI, P. **Bacterial cellulose-based scaffold materials for bone tissue engineering** *Applied Materials Today* Elsevier Ltd, , jun. 2018.

TROVATTI, E. et al. Bacterial cellulose membranes applied in topical and transdermal delivery of lidocaine hydrochloride and ibuprofen: In vitro diffusion studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 435, n. 1, p. 83–87, out. 2012.

UL-ISLAM, M. et al. Development of three-dimensional bacterial cellulose/chitosan scaffolds: Analysis of cell-scaffold interaction for potential application in the diagnosis of ovarian cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 137, p. 1050–1059, set. 2019.

UL-ISLAM, M.; KHAN, T.; PARK, J. K. Nanoreinforced bacterial cellulose-montmorillonite composites for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1189–1197, 2012.

ULLAH, H.; SANTOS, H. A.; KHAN, T. Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery. **Cellulose**, v. 23, n. 4, p. 2291–2314, 18 ago. 2016.

ULLAH, M. W. et al. Innovative production of bio-cellulose using a cell-free system derived from a single cell line. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 286–294, 2015.

UZYOL, H. K.; SAÇAN, M. T. Bacterial cellulose production by *Komagataeibacter hansenii* using algae-based glucose. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 12, p. 10907–11165, 2017.

VALERA, M. J. et al. Cellulose production and cellulose synthase gene detection in acetic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1349–1361, 2015.

VALERIO, O. et al. Improved utilization of crude glycerol from biodiesel industries: Synthesis and characterization of sustainable biobased polyesters. **Industrial Crops and Products**, v. 78, p. 141–147, dez. 2015.

WANG, J.; TAVAKOLI, J.; TANG, Y. Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 219, n. April, p. 63–76, 2019a.

WANG, J.; TAVAKOLI, J.; TANG, Y. **Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review** *Carbohydrate Polymers* Elsevier Ltd, , set. 2019b.

WEI, B.; YANG, G.; HONG, F. Preparation and evaluation of a kind of bacterial cellulose dry films with antibacterial properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 533–538, fev. 2011.

WU, S.-C.; WU, S.-M.; SU, F.-M. Novel process for immobilizing an enzyme on a bacterial cellulose membrane through repeated absorption. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 92, n. 1, p. 109–114, jan. 2017.

XIE, Y. et al. Novel Electronic–Ionic Hybrid Conductive Composites for Multifunctional Flexible Bioelectrode Based on in Situ Synthesis of Poly(dopamine) on Bacterial Cellulose. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 10, n. 26, p. 22692–22702, 5 jul. 2018.

Y, P.; Q, X.; H, X. Cationic Polymers with Tailored Structures for Rendering Polysaccharide-Based Materials Antimicrobial: An Overview. **Polymers**, v. 11, n. 8, 2019.

YANG, Y. K. et al. Cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 under agitated condition. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 3, p. 312–317, jan. 1998.

YE, J. et al. Synthesis of bacterial cellulose based SnO₂-PPy nanocomposites as potential flexible, highly conductive material. 2019a.

YE, S. et al. Development of gelatin/bacterial cellulose composite sponges as potential natural wound dressings. 2019b.

YE, S. et al. Development of gelatin/bacterial cellulose composite sponges as potential natural wound dressings. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 148–155, jul. 2019c.

YOSHINO, A. et al. Applicability of bacterial cellulose as an alternative to paper points in endodontic treatment. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 4, p. 6116–6122, abr. 2013.

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**, v. 85, n. 3, p. 506–513, jun. 2011.

ZI, Y. et al. Effective energy storage from a triboelectric nanogenerator. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 10987, 11 abr. 2016.

ŻWIEREŁŁO, W. et al. **Bioelements in the treatment of burn injuries – The complex review of metabolism and supplementation (copper, selenium, zinc, iron,**

**manganese, chromium and magnesium)Journal of Trace Elements in Medicine and
Biology**Elsevier GmbH, , dez. 2020.