



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014027203-8 A2

(22) Data do Depósito: 30/10/2014

(43) Data da Publicação: 24/05/2016

(RPI 2368)



(54) Título: PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO EM ESCALA DE CELULOSE BACTERIANA OBTIDA PELA POLIMERIZAÇÃO DA GLICOSE A PARTIR DE AÇÚCARES DE FONTES RENOVÁVEIS VIA BIOTECNOLOGIA POR MEIO DA PROPAGAÇÃO DE GLUCONOACETOBACTER HANSENII LMSPE EM REATORES E OBTENÇÃO DA CELULOSE PURIFICADA PARA APLICAÇÃO NAS ÁREAS DE SAÚDE, FARMACOTÉCNICA E COSMIATRIA

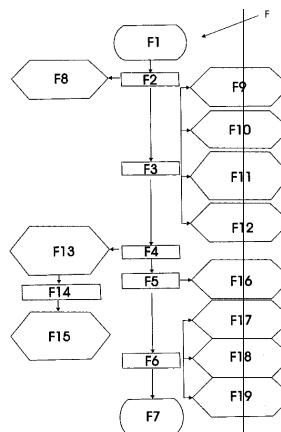
(51) Int. Cl.: C12P 19/04; C12P 1/04; C12N 1/22

(73) Titular(es): POLISA BIOPOLÍMEROS PARA A SAÚDE LTDA - EPP

(72) Inventor(es): FRANCISCO DE ASSIS DUTRA MELO, LARA MOURA AGUIAR

(74) Procurador(es): TINOCO SOARES & FILHO LTDA

(57) Resumo: "PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO EM ESCALA DE CELULOSE BACTERIANA OBTIDA PELA OLIMERIZAÇÃO DA GLICOSE A PARTIR DE AÇÚCARES DE FONTES ENOVÁVEIS VIA BIOTECNOLOGIA POR MEIO DA PROPAGAÇÃO DE GLUCONOACETOBACTER HANSENII LMSPE EM REATORES OBTENÇÃO DA CELULOSE PURIFICADA PARA APLICAÇÃO NAS ÁREAS DE SAÚDE, FARMACOTÉCNICA E COSMIATRIA", o qual prevê as etapas de a) preparação do mosto; mosto; produto b) esterilização do mosto; c) inoculação do mosto; d) propagação; e) clareamento e f) obtenção do produto celulose bacteriana purificada. o processo de produção em escala de celulose bacteriana é obtido em uma unidade selada de esterilização e propagação, biodigestores com a área da superfície de f lo ação quatro vezes a da altura.



"PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO EM ESCALA DE CELULOSE BACTERIANA OBTIDA PELA POLIMERIZAÇÃO DA GLICOSE A PARTIR DE AÇÚCARES DE FONTES RENOVÁVEIS VIA BIOTECNOLOGIA POR MEIO DA PROPAGAÇÃO DE *GLUCONOACETOBACTER HANSENI* LMSPE EM REATORES E OBTENÇÃO DA CELULOSE PURIFICADA PARA APLICAÇÃO NAS ÁREAS DE SAÚDE, FARMACOTÉCNICA E COSMIATRIA".

CAMPO DE APLICAÇÃO

[001] O presente pedido de patente tem como foco a produção e a purificação de celulose bacteriana que é destinada ao desenvolvimento de produtos para aplicação nos ramos de atividade que envolvem: a saúde, a farmacotécnica e a cosmiatria.

PREÂMBULO

[002] O presente relatório descritivo trata de um pedido de patente que propõe um processo para produzir e purificar, em escala, celulose bacteriana obtida através da polimerização de glicose tendo como base açúcares de fontes renováveis através do uso de biotecnologia, mediante a propagação de um microorganismo (*GLUCONOACETOBACTER HANSENI* LMSPE), sendo que tal processo permite que o produto resultante do mesmo tenha particular utilização nos campos da saúde, da farmacotécnica e da cosmiatria.

ESTADO DA TÉCNICA

[003] São conhecidos do estado da técnica processo desenvolvidos para a produção e purificação de celulosas bacterianas voltadas aos ramos da saúde (medicina), da farmacotécnica e da cosmiatria.

[004] Em linhas gerais, os processos para produção de celuloses bacterianas devem atender, no que tange às características do produto obtido, a critérios rígidos em relação ao seu estado de pureza, micro cristalinidade, e em relação à escala de produção.

PROBLEMAS DO ESTADO DA TÉCNICA

[005] Os processos de produção de celuloses bacterianas disponíveis no presente ainda se encontram em fase de pesquisa e não atingiram um adequado processo de produção e purificação em escala [1-3].

[006] O processo de produção e purificação de celulose bacteriana para atender em escala a demanda de nano celulose às áreas da medicina, farmacotécnica e cosmiatria é uma inovação tecnológica na linha de produção de impacto técnico econômico.

[007] O processo de produção de celulose bacteriana que não atinge escala e alto grau de pureza atende apenas a produção de filmes para curativos de feridas, utilizados como uma barreira mecânica e não atende as exigências para a produção de diferentes produtos para aplicações específicas nas áreas de medicina, farmacotecnia e cosmiatria [4, 5].

[008] Filmes produzidos de celulose oxidada, não bacteriana, apesar de sua alta cristalinidade são utilizados na área biológica como barreira de proteção a ferimentos e como suporte de medicamento, porque não atingem os percentuais de micro

cristalinidade obtidos com as celuloses bacterianas ou nano celulose [6-9].

[009] Esses produtos são biocompatíveis e atóxicos atendendo com muita eficiência a demanda de curativos e como barreira mecânica em lesões epiteliais particularmente para aplicações externas. As celuloses constituídas de micro fibrilas se implantadas no organismo não são biotransformadas e não promovem remodelação, diferindo da nano celulose que facilmente são biotransformadas ocorrendo remodelação no sitio de implantação.

[0010] A via de produção atual mais eficiente de nano celulose é a via biotecnológica por meio de propagação de bactérias produtoras de celulose micro fibrilar e nano celulose.

[0011] Os processos atuais para a produção de nano celulose bacteriana são destinados para produção laboratorial e ainda não se encontra em demanda de escala. No entanto está comprovado e se reconhece a importância da nano celulose pura para aplicação na área biológica [10 -12].

[0012] A produção em escala de celulose bacteriana, ou nano celulose a baixo custo representa uma inovação de impacto tecnológico e econômico.

OBJETIVOS

[0013] Diante do estado da técnica atual e que está sendo proposto o presente pedido de patente de invenção o qual objetiva a obtenção de um processo de produção e purificação em escala das

frações micro e nano fibrilar de celulose bacteriana obtida a partir de fontes renováveis de açúcares derivados da cana de açúcar e de outras fontes também renováveis como derivados lácteos e água de coco por via biotecnológica pelo *Gluconoacetobacter hansenii* LMSPE isolado da biodiversidade regional.

[0014] O processo de produção em escala de celulose bacteriana é obtido em uma unidade selada de esterilização e propagação, biodigestores com a área da superfície de flotação quatro vezes a da altura (FIGURA 2).

[0015] A taxa de conversão máxima de açúcar em massa polimérica, celulose bacteriana, bruta úmida obtida pelo presente processo de produção em escala é semelhante ao obtido com a *Zoogloea* sp, que atinge em condições ótimas uma taxa de conversão máxima de açúcar em massa polimérica bruta de 76,8%. [2].

[0016] A celulose bacteriana é um exopolissacarídeo produzido por diferentes bactérias [1] e a produção em escala está associada ao rendimento de síntese de diferentes espécies bacterianas e condições físicas de propagação.

[0017] O microrganismo *Gluconoacetobacter hansenii* LMSPE isolado da biodiversidade regional utilizado no processo de produção de celulose bacteriana se caracteriza como uma cepa de alta produtividade de nano celulose.

[0018] A produção da massa polimérica bruta coletada é diretamente

proporcional a superfície do mosto nos biodigestores. Assim a sua produção atende as condições físicas de propagação e é diretamente proporcional à área do biodigestor.

[0019] A opção de utilização de biodigestores com menor profundidade e maior superfície tem impacto positivo na produção, resultando em maior escala em tempo real e menor custo proporcional de produção.

[0020] A utilização de uma unidade selada de esterilização e propagação (FIGURA 1) representa maior segurança, controle de qualidade, maior rendimento de produção a menor custo com impacto econômico.

[0021] A celulose bacteriana pura é obtida em escala a partir da massa polimérica bruta por meio de uma sequência de tratamento que prevê as etapas de: lavagem da massa polimérica em banhos de água corrente até a referida massa atingir uma coloração marrom claro; redução dos açúcares residuais por meio de clareamento com o tratamento da massa polimérica em uma solução diluída de hipoclorito de sódio até se obter uma massa translúcida de coloração branca perolizada; lavagens em banho de água destilada até completa eliminação de traços de hipoclorito de sódio. O processo permite a produção em escala de celulose bacteriana estável com alta pureza, identificada pela ausência de glicose livre na massa polimérica e pela obtenção de 97,8% de glicose pura obtida por hidrólise

ácida térmica da massa celulósica clarificada |desidratada analisada por HPLC.

[0022] O processo de produção, tratamento e purificação da celulose bacteriana do presente processo resulta em uma celulose com alta concentração de micro e nano fibrilas com um percentual de cristalinidade de 98,8% que atende as especificidades e exigências de pureza e micro cristalinidade adequadas à produção de diferentes produtos para aplicação nas áreas de medicina, farmacotécnica e cosmiatria em demanda de escala.

[0023] A partir da massa polimérica purificada podem-se obter diferentes produtos para aplicações específicas nas áreas de medicina, farmacotécnica e cosmiatria. A produção e purificação de celulose bacteriana que permite a sua utilização em diferentes produtos com potencial de aplicação nas áreas de medicina, farmacotécnica e cosmiatria em demanda de escala é uma inovação de impacto técnico científico e econômico.

DA NOVIDADE E DO EFEITO TÉCNICO ALCANÇADO

[0024] A presente descrição se refere ao processo de produção e purificação em escala de celulose bacteriana obtida a partir de fontes renováveis de açúcares, particularmente derivados da cana de açúcar, além de outras fontes também renováveis como derivados lácteos e água de coco, por via biotecnológica pelo *Gluconoacetobacter hanseii* LMSPE isolado da biodiversidade regional para múltiplas

aplicações, particularmente nas áreas de medicina, farmacotécnica e cosmiatria.

[0025] O processo de produção de celulose bacteriana obtido em escala pela propagação de um microrganismo isolado da biodiversidade regional *Gluconoacetobacter hansenii* LMSPE em uma unidade selada de esterilização e propagação, biodigestores com a área da superfície de flotação quatro vezes a da altura (FIGURA 1) resulta em uma produção em escala atingindo taxa de conversão máxima de açúcar em massa polimérica bruta de 76,8% [1].

[0026] A produção em escala de celulose bacteriana a partir de fontes renováveis de açúcares com alta taxa de conversão é uma inovação com impacto no âmbito industrial e econômico. Para aplicação nas áreas de medicina, farmacotécnica e cosmiatria exige-se a purificação da massa polimérica ou celulose bacteriana bruta.

[0027] O processo de purificação consiste em lavagem em água corrente, clareamento e redução de açúcares residuais pela ação de hipoclorito de sódio e lavagem com água destilada deionizada estéril.

[0028] O produto final, celulose bacteriana purificada, consiste em uma massa translúcida de coloração branca perolizada com alta concentração de nano celulose que pode ser utilizada como matriz para a produção de múltiplos produtos para aplicação nas áreas de medicina, farmacotécnica e cosmiatria [2]. A celulose bacteriana purificada e

desidratada é constituída de 97.8% de glicose polimerizada determinada por HPLC por meio de hidrólise ácida a quente.

[0029] A composição homopolimérica da celulose bacteriana purificada constituída de 97.8% de glicose da celulose bacteriana purificada representa um material com alto grau de pureza. A sua produção em escala de celulose bacteriana a partir de açúcares de fontes renováveis via biotecnológica pelo *Gluconoacetobacter hansenii* LMSPE isolado da biodiversidade regional em uma unidade selada de esterilização e propagação é um processo de produção controlado que representa uma inovação de impacto técnico científico e de interesse de mercado pela multiplicidade e amplitude de suas aplicações na área biológica, particularmente nas áreas de medicina, farmacotécnica e cosmiatria [1].

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[0030] O processo consiste na produção em escala de celulose bacteriana a partir de açúcares de fontes renováveis via biotecnológica pelo *Gluconoacetobacter hansenii* LMSPE isolado da biodiversidade regional em uma unidade selada de esterilização e propagação. Lavagem da massa polimérica bruta em água corrente até a obtenção de um produto de aspecto gelatinoso de coloração marrom claro.

[0031] Após a lavagem a massa polimérica passa por um processo de clareamento que consiste na redução de açúcares residuais por meio da ação de hipoclorito de sódio a uma concentração que pode

variar de 0,3 % a 3,0% em um volume de 5 a 10 vezes o volume da massa de celulose bacteriana garantindo qualidade ao produto final.

[0032] O processo é concluído em um período de 6 a 36 horas quando o produto atinge uma coloração perolizada e translúcida.

[0033] A purificação é finalizada com lavagem em água destilada para remover traços de hipoclorito de sódio que é facilmente identificado quando o potencial de hidrogênio iônico da água de lavagem atinge o valor de pH 6,2. Após o processo de purificação a celulose bacteriana purificada pode ser utilizada para a produção de diferentes produtos para aplicação nas áreas de medicina, farmacotécnica e cosmiatria como: hidrogel, filmes, esponjas e compósitos.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0034] O processo objeto deste pedido de patente de invenção será plenamente entendido através da descrição pormenorizada que será feita com base nas figuras abaixo relacionadas, nas quais:

[0035] A figura 1 ilustra um fluxograma do processo propriamente dito.

[0036] A figura 2 ilustra, em uma representação esquemática, a unidade selada de esterilização e propagação utilizada no processo ora tratado.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

[0037] O processo ora proposto está retratado na figura 1, onde o fluxograma F

apresenta os blocos referente às diversas etapas do processo com as seguintes legendas:

- F1 - Início - Matéria Prima Melaço de Cana de Açúcar;
- F2 - Preparação do Mosto;
- F3 - Esterilização;
- F4 - Inoculação;
- F5 - Propagação;
- F6 - Clareamento;
- F7 - Fim - Obtenção do produto: Celulose Bacteriana Purificada.

[0038] No mesmo fluxograma F retratado na figura 1, têm-se ainda os seguintes blocos:

- F8 - Diluição com água para "Brix 10";
- F9 - "Bombeamento do Mosto para unidade selada de esterilização";
- F10 - "Esterilização a vapor";
- F11 - "Resfriamento do Mosto entre 38 a 35°C na unidade de esterilização por troca de calor natural com o ambiente ou por troca ativa a partir de uma fonte de água fria";
- F12 - "Bombeamento do Mosto estéril para os biodigestores";
- F13 - "Coleta de massa celular por uma unidade móvel acoplada por tubos aos biodigestores e transferência ao biodigestor de propagação. Retirada de alíquota para controle de qualidade";
- F14 - "Controle de Qualidade";

F15 - "Controle de qualidade. Coleta de alíquotas para inoculação em Erlenmeyers, medir o pH e avaliação microscópica da viabilidade celular".

F16 - "Processo de propagação nos biodigestores com temperatura controlada do ambiente entre 28°C a 32°C";

F17 - "Coleta e transferência da massa polimérica para o tanque de lavagem em água corrente, volume de 10 a 20 vezes ao da massa de celulose bacteriana por um período de 6 a 24 horas até atingir coloração marrom";

F18 - "Clareamento definitivo - lavagens sucessivas em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 0,3% até 3% na proporção de 5 a 10 vezes o volume da massa polimérica até se obter uma coloração branca perolizada e translúcida - período entre 6 horas a 36 horas"

F19 - "Após clareamento transferência para tanques com água destilada na proporção de 5 a 10 vezes o volume da massa polimérica. Trocar a cada 6 horas para retirar o resíduo de hipoclorito, que é identificado quando o pH do efluente atinge 6,2- período de 12 a 36 horas".

[0039] A figura 2 ilustra um diagrama dos equipamentos utilizados no presente processo e que configuram a unidade selada de esterilização e propagação, que é indicada, de modo geral, pela referência numérica 1, onde pode ser vista a representação da unidade selada para produção de água quente, vapor e esterilização do mosto 2.

[0040] A unidade selada para produção de água quente, vapor e esterilização do mosto 2 está ligada, pela sua região superior, a um tubo

de recepção de água e de mosto 3 e pela sua lateral, a uma linha de lavagem, esterilização e alimentação 4.

[0041] Na mesma linha de lavagem, esterilização e alimentação 4 está disposta uma bomba premente para água e mosto 5 e, na sua sequência, está o biodigestor 6.

[0042] O biodigestor 6 está conectado a uma unidade móvel de transferência de massa celular 7, a qual está conectada, por outro lado a um segundo biodigestor 6, sendo que ambos os biodigestores 6 estão conectados, pelas suas respectivas porções superiores, à linha de lavagem, esterilização e alimentação 4 e pelas suas respectivas porções de fundo a uma linha 8 para escape de rejeitos para coleta de resíduos líquidos. O fluxo do material ao longo da unidade 1, retratada na figura 2, é comandado mediante operação de registros 9.

[0043] O processo de purificação utilizado para obtenção de celulose bacteriana a partir da massa polimérica bruta é seguro, simples e rápido, garantindo sustentabilidade em todos os ciclos do processo.

[0044] O processo de produção de celulose bacteriana em escala em uma unidade selada de esterilização e propagação e o processo de purificação da massa polimérica obtida pelo referido processo permite a obtenção controlada de celulose bacteriana com alto grau de pureza para aplicação na produção de diferentes produtos a partir da celulose

purificada para aplicação nas áreas de medicina, farmacotécnica e cosmiatria.

[0045] O ciclo de processos utilizando derivados da cana de açúcar como o caldo, o melado ou o melaço até a celulose bacteriana purificada é uma inovação técnica científica de impacto econômico.

[0046] A celulose é obtida pela polimerização da glicose via microbiológica a partir de açúcares de fontes renováveis derivados da cana de açúcar, como melaço, xarope concentrado, açúcar, caldo de cana e de outros açúcares como a frutose, derivada de frutos e água de coco, e lactose proveniente dos produtos lácteos via microrganismo *Gluconoacetobacter hansenii* LMSPE isolado da biodiversidade regional e propagado em biodigestores (reatores).

[0047] No presente processo, o mosto, fonte de propagação, é preparado a partir de derivados como melaço da cana de açúcar, xarope de cana de açúcar concentrado, caldo natural obtido pelo esmagamento da cana de açúcar, preferencialmente pela facilidade de oferta entre outros derivados de frutos como água de coco ou soro derivado do leite obtido no processo de produtos lácteos.

[0048] A concentração de açúcar do mosto é definida por meio da escala de Brix e ajustado para um valor mínimo de 7,5 e máximo de 15,0, preferencialmente na faixa ótima de Brix 10, mensurado por meio de um refratômetro.

[0049] O ajuste do Brix à faixa determinada é obtido por diluição do mosto com água ou por concentração a partir de uma fonte de açúcar como sacarose, glicose, frutose ou lactose.

[0050] Preparação do mosto a partir do melaço da cana de açúcar fluxograma, FIGURA 1. Uma alíquota do mosto com Brix ajustado à escala determinada é transferida para Erlenmeyers e esterilizada em autoclave e utilizados para controle microbiológico e de produção.

[0051] Para a produção em escala, o mosto preparado com o Brix ajustado é transferido por meio de bombeamento para uma unidade selada de esterilização com fonte térmica a vapor ou resistência elétrica.

[0052] Após esterilização, o mosto é resfriado, ainda na unidade de esterilização por troca natural de calor com o ambiente ou por troca ativa a partir de uma fonte de água fria.

[0053] O mosto estéril atingindo a temperatura entre 38°C a 35° é bombeado para os biodigestores previamente esterilizados por vapor de água a partir da unidade selada de produção de vapor e esterilização.

[0054] Aos biodigestores carregados com o mosto esterilizado e com temperatura ajustada para 28°C a 32°C é adicionado a massa celular fonte de propagação, cepa específica do microrganismo *Gluconoacetobacter hansenii* LMSPE, proveniente de um

biodigestor cujo processo fermentativo já esteja concluído, fase de coleta da celulose bacteriana.

[0055] Para controle externo das características biológicas e potencial de propagação da massa celular alíquotas são inculadas em Erlenmeyers com mosto esterilizado.

[0056] Nesse mesmo tempo, alíquotas da massa celular são semeadas em frascos com meio de cultura líquida e em placas com meio sólido para avaliar a estabilidade e pureza das colônias.

[0057] Em uma das alíquotas a viabilidade celular é avaliada por meio da observação microscópica da mobilidade das células que não deve ser inferior a 25%.

[0058] A transferência da massa celular entre os biodigestores é feita por meio de um recipiente coletor estéril conectado aos dois biodigestores por dois tubos flexíveis com torneiras previamente estéreis por meio de fluxo de vapor d'água proveniente da unidade de esterilização.

[0059] Um dos tubos conectado ao recipiente coletor é acoplado ao biodigestor doador, com o processo fermentativo concluído, e o outro tubo é conectado ao biodigestor receptor com o mosto recém-esterilizado.

[0060] O recipiente coletor de transferência estéril é posicionado em desnível com a linha do biodigestor receptor fechada, carregando-o de massa celular do biodigestor de descarga por fluxo aspirativo.

[0061] Após a carga do coletor, a torneira do tubo de transferência é fechada e eleva-se o recipiente coletor a um nível superior ao do biodigestor receptor, biodigestor de propagação e a torneira do tubo de transferência é aberta.

[0062] Após a transferência da massa celular, a torneira do tubo de transferência é fechada e o sistema desconectado.

[0063] Os biodigestores instalados na sala de propagação fazem troca externa de calor direta com temperatura controlada do ambiente entre 28°C a 32°C. O rotor de agitação é ligado 24 horas após a inoculação e ajustado a um ciclo evolução por hora.

[0064] O biodigestor é descarregado quando uma alíquota do mosto de propagação chegar a Brix inferior a 2 ou o pH inferior a 4. O processo é contínuo, transferindo-se a massa celular de um biodigestor de descarga ou doador para outro biodigestor receptor, de propagação.

[0065] A massa polimérica acumulada por flotação natural, na superfície do mosto, é coletada e transferida para o tanque de lavagem, em um volume de água corrente de 10 a 20 vezes ao da massa de celulose bacteriana por um período de 6 a 24 horas para retirada de resíduos do mosto e de açúcares até a massa polimérica apresentar uma coloração marrom claro.

[0066] O clareamento definitivo é obtido por meio de lavagens sucessivas até o completo clareamento em solução de hipoclorito de sódio

na concentração de 0,3% até 3%, na proporção de 5 a 10 vezes o volume da massa polimérica, até se obter uma coloração branca perolizada e translúcida que ocorre entre 6 horas a 36 horas.

[0067] Após o clareamento, a massa de celulose bacteriana é transferida para um tanque de água destilada, também na proporção de 5 a 10 vezes o volume da massa polimérica que é trocada a cada 6 horas, para retirar todo o resíduo de hipoclorito de sódio utilizado no processo de clareamento identificado quando o pH do efluente atinge 6,2. O ciclo ocorre em um período de 12 a 36 horas.

[0068] O processo resulta na obtenção em escala, de uma massa polimérica, de celulose bacteriana pura e clarificada com alto teor de nano celulose. O processo de produção de celulose bacteriana em escala com alto teor de micro e nano fibrilas em biodigestores de alta produtividade é de impacto inovador e de interesse econômico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Francisco de Assis Dutra Melo, Contribuição ao estudo cinético da produção de polissacarídeos extracelulares por *Zoogloea sp* em melaço de cana de açúcar. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003. Orientador: Mohamed Benacour
2. Lee KY1, Buldum G, Mantalaris A, Bismarck A. More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber

composites. *Macromol Biosci.* 2014 Jan;14(1):10-32. doi: 10.1002/mabi.201300298. Epub 2013 Jul 30.

3. Koutinas AA¹, Vlysidis A, Pleissner D, Kopsahelis N, Lopez Garcia I, Kookos IK, Papanikolaou S, Kwan TH, Lin CS. Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chem Soc Rev.* 2014 Apr 21;43(8):2587-627. doi: 10.1039/c3cs60293a. Epub 2014 Jan 3.

4. Paula R. F. de S. Moraes¹, Sybele Saska² Ana Maria M. Gaspar. Análise de curativo a base de membrana de celulose bacteriana com colágeno em dorso de ratos. COLAOB Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais. 22 a 25 de agosto de 2012, Natal RN

5. Oscar M. Alvarez, PhD, Mayank Patel, MD, Juanita Booker, RN, BSN, Lee Markowitz, DPM. Effectiveness of a Biocellulose Wound Dressing for the Treatment of Chronic Venous Leg Ulcers: Results of a Single Center Randomized Study Involving 24 Patients. *Wounds.* 2004;16(7). <http://www.medscape.com/viewarticle/484360>

6. Casas A¹, Alonso MV, Oliet M, Santos TM, Rodriguez F. Characterization of Cellulose regenerated from solutions of pine and eucalyptus woods in 1-allyl-3-methylimidazolium chloride. *Carbohydr Polym.* 2013 Feb 15;92(2):1946-52. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.11.057. Epub 2012 Nov 28.

7. Uysal AC¹, Alagoz MS, Orbay H, Sensoz O. An alternative dressing material for the split-thickness skin graft donor site: oxidized regenerated cellulose. *Ann Plast Surg.* 2006 Jul;57(1):60-4.

8. Gottrup F1, Cullen BM, Karlsmark T, Bischoff-Mikkelsen M, Nisbet L, Gibson MC. Randomized controlled trial on collagen/oxidized regenerated cellulose/silver treatment. *Wound Repair Regen.* 2013 Mar-Apr;21(2):216-25. doi: 10.1111/wrr.12020. Epub 2013 Feb 25.
9. Ulrich D1, Smeets R, Unglaub F, Wöltje M, Pallua N. Effect of oxidized regenerated cellulose/collagen matrix on proteases in wound exudate of patients with diabetic foot ulcers. *J Wound Ostomy Continence Nurs* 2011 Sep-Oct;38(5):522-8. doi: 10.1097/WON.0b013e31822ad290.
10. Domingues RM, Gomes ME, Reis RL. The potential of Cellulose Nanocrystals in Tissue Engineering strategies. *Biomacromolecules.* 2014 Jun 10. [Epub ahead of print]
11. Norouzzian D1, Farhangi A, Tolooei S, Saffari Z, Mehrabi MR, Chiani M, Ghassemi S, Farahnak M, Akbarzadeh A. Study of nano-fiber cellulose production by *Glucanacetobacter xylinum* ATCC 10245. *Pak J Biol Sci.* 2011 Aug 1;14(15):780-4.
12. Sarah Brandão Palácio. Avaliação do comportamento reológico, propriedades térmicas e espectroscópicas do biopolímero de zoogloea sp. em blenda polimérica. 2013. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Pernambuco. Orientador: Nereide Stela Santos Magalhães.

REIVINDICAÇÕES

1. "PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO EM ESCALA DE CELULOSE BACTERIANA OBTIDA PELA POLIMERIZAÇÃO DA GLICOSE A PARTIR DE AÇÚCARES DE FONTES RENOVÁVEIS VIA BIOTECNOLOGIA POR MEIO DA PROPAGAÇÃO DE *GLUCONOACETOBACTER HANSENII LMSPE* EM REATORES E OBTENÇÃO DA CELULOSE PURIFICADA PARA APLICAÇÃO NAS ÁREAS DE SAÚDE, FARMACOTÉCNICA E COSMIATRIA", caracterizado por utilizar açúcares derivados da cana de açúcar e seus derivados que incluem caldo de cana, melado, melaço, xarope e de outras fontes também renováveis como derivados lácteos e água de coco por via biotecnológica pelo *Gluconoacetobacter hansenii* LMSPE isolado da biodiversidade regional, sendo que o referido processo compreende as etapas de: a) preparação do mosto; b) esterilização do mosto; c) inoculação do mosto; d) propagação; e) clareamento) e f) obtenção do produto celulose bacteriana purificada.

2. "PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO EM ESCALA DE CELULOSE BACTERIANA OBTIDA PELA POLIMERIZAÇÃO DA GLICOSE A PARTIR DE AÇÚCARES DE FONTES RENOVÁVEIS VIA BIOTECNOLOGIA POR MEIO DA PROPAGAÇÃO DE *GLUCONOACETOBACTER HANSENII LMSPE* EM REATORES E OBTENÇÃO DA CELULOSE PURIFICADA PARA APLICAÇÃO NAS ÁREAS DE SAÚDE, FARMACOTÉCNICA E COSMIATRIA", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o mosto ser ajustado, segundo a escala Brix a um valor entre 7,5 e 15,0, considerado como ótimo o valor de Brix 10, sendo esse valor de concentração mensurado por meio de um refratômetro, sendo que o ajuste do Brix à faixa determinada é obtido por diluição do mosto com água ou

por concentração a partir de uma fonte de açúcar como sacarose, glicose, frutose ou lactose.

3. "PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO EM ESCALA DE CELULOSE BACTERIANA OBTIDA PELA POLIMERIZAÇÃO DA GLICOSE A PARTIR DE AÇÚCARES DE FONTES RENOVÁVEIS VIA BIOTECNOLOGIA POR MEIO DA PROPAGAÇÃO DE *GLUCONOACETOBACTER HANSENII* LMSPE EM REATORES E OBTENÇÃO DA CELULOSE PURIFICADA PARA APLICAÇÃO NAS ÁREAS DE SAÚDE, FARMACOTÉCNICA E COSMIATRIA", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o mosto ser alimentado a biodigestores integrantes de uma unidade selada de esterilização, sendo inoculado com o microorganismo *GLUCONOACETOBACTER HANSENII* LMSPE ocorrendo assim a propagação desse microorganismo.

4. "PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO EM ESCALA DE CELULOSE BACTERIANA OBTIDA PELA POLIMERIZAÇÃO DA GLICOSE A PARTIR DE AÇÚCARES DE FONTES RENOVÁVEIS VIA BIOTECNOLOGIA POR MEIO DA PROPAGAÇÃO DE *GLUCONOACETOBACTER HANSENII* LMSPE EM REATORES E OBTENÇÃO DA CELULOSE PURIFICADA PARA APLICAÇÃO NAS ÁREAS DE SAÚDE, FARMACOTÉCNICA E COSMIATRIA", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a massa polimérica acumulada por flotação natural na superfície do mosto ser coletada e transferida para o tanque de lavagem em um volume de água corrente de 10 a 20 vezes ao da massa de celulose bacteriana por um período de 6 a 24 horas para retirada de resíduos do mosto e de açúcares até a massa polimérica apresentar uma coloração marrom claro, sendo o clareamento definitivo obtido por meio de lavagens sucessivas até completo clareamento em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 0,3% até 3% na proporção de 5 a 10 vezes o

volume da massa polimérica até se obter uma coloração branca perolizada e translúcida que ocorre entre 6 horas a 36 horas; após o clareamento a massa de celulose bacteriana é transferida para um tanque de água destilada também na proporção de 5 a 10 vezes o volume da massa polimérica que é trocada a cada 6 horas para retirar todo o resíduo de hipoclorito de sódio utilizado no processo de clareamento identificado quando o pH do efluente atinge 6,2.

5. "PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO EM ESCALA DE CELULOSE BACTERIANA OBTIDA PELA POLIMERIZAÇÃO DA GLICOSE A PARTIR DE AÇÚCARES DE FONTES RENOVÁVEIS VIA BIOTECNOLOGIA POR MEIO DA PROPAGAÇÃO DE *GLUCONOACETOBACTER HANSENII* LMSPE EM REATORES E OBTENÇÃO DA CELULOSE PURIFICADA PARA APLICAÇÃO NAS ÁREAS DE SAÚDE, FARMACOTÉCNICA E COSMIATRIA", caracterizado por empregar uma unidade selada de esterilização e propagação (1), onde é prevista uma unidade selada para produção de água quente, vapor e esterilização do mosto (2); a unidade selada para produção de água quente, vapor e esterilização do mosto (2) está ligada, pela sua região superior, a um tubo de recepção de água e de mosto (3) e pela sua lateral, a uma linha de lavagem, esterilização e alimentação (4); na mesma linha de lavagem, esterilização e alimentação (4) está disposta uma bomba premente para água e mosto (5) e na sua sequência está o biodigestor (6); o biodigestor (6) está conectado a uma unidade móvel de transferência de massa celular (7), a qual está conectada, por outro lado a um segundo biodigestor (6), sendo que ambos os biodigestores (6) estão conectados, pelas suas respectivas porções superiores, à linha de lavagem, esterilização e alimentação

(4) e pelos suas respectivas porções de fundo | a uma linha (8) para escape de rejeitos para coleta | de resíduos líquidos, sendo o fluxo do material ao longo da unidade (1) comandado mediante operação de registros (9).

6. "PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO EM ESCALA DE CELULOSE BACTERIANA OBTIDA PELA POLIMERIZAÇÃO DA GLICOSE A PARTIR DE AÇÚCARES DE FONTES RENOVÁVEIS VIA BIOTECNOLOGIA POR MEIO DA PROPAGAÇÃO DE *GLUCONACETOBACTER HANSENII* LMSPE EM REATORES E OBTENÇÃO DA CELULOSE PURIFICADA PARA APLICAÇÃO NAS ÁREAS DE SAÚDE, FARMACOTÉCNICA E COSMIATRIA", de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por prever o uso de biodigestores (6) de baixa profundidade e área interna ampla para aumentar a taxa de conversão substrato massa polimérica, tendo os referidos biodigestores (6) área da superfície de flotação quatro vezes a da altura.

7. "PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO EM ESCALA DE CELULOSE BACTERIANA OBTIDA PELA POLIMERIZAÇÃO DA GLICOSE A PARTIR DE AÇÚCARES DE FONTES RENOVÁVEIS VIA BIOTECNOLOGIA POR MEIO DA PROPAGAÇÃO DE *GLUCONACETOBACTER HANSENII* LMSPE EM REATORES E OBTENÇÃO DA CELULOSE PURIFICADA PARA APLICAÇÃO NAS ÁREAS DE SAÚDE, FARMACOTÉCNICA E COSMIATRIA", de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por utilizar biodigestores (6) de baixa profundidade e área interna ampla, onde os mesmos são distribuídos em série e acoplados a uma fonte de vapor formando uma unidade selada de esterilização e propagação (1).

8. "PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO EM ESCALA DE CELULOSE BACTERIANA OBTIDA PELA

POLIMERIZAÇÃO DA GLICOSE A PARTIR DE AÇÚCARES DE FONTES RENOVÁVEIS VIA BIOTECNOLOGIA POR MEIO DA PROPAGAÇÃO DE *GLUCONOACETOBACTER HANSENII* LMSPE EM REATORES E OBTENÇÃO DA CELULOSE PURIFICADA PARA APLICAÇÃO NAS ÁREAS DE SAÚDE, FARMACOTÉCNICA E COSMIATRIA", de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por os biodigestores (6) serem distribuídos em série e acoplados a uma fonte de vapor formando uma unidade selada de esterilização e propagação (1) sendo ainda acoplados a uma unidade coletora selada de transferência de massa celular para propagação (7).

9. "PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO EM ESCALA DE CELULOSE BACTERIANA OBTIDA PELA POLIMERIZAÇÃO DA GLICOSE A PARTIR DE AÇÚCARES DE FONTES RENOVÁVEIS VIA BIOTECNOLOGIA POR MEIO DA PROPAGAÇÃO DE *GLUCONOACETOBACTER HANSENII* LMSPE EM REATORES E OBTENÇÃO DA CELULOSE PURIFICADA PARA APLICAÇÃO NAS ÁREAS DE SAÚDE, FARMACOTÉCNICA E COSMIATRIA", de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por incluir uma unidade coletora selada de transferência de massa celular para propagação (7) e obtenção de alíquotas para análise do controle de qualidade da massa celular sem contaminação.

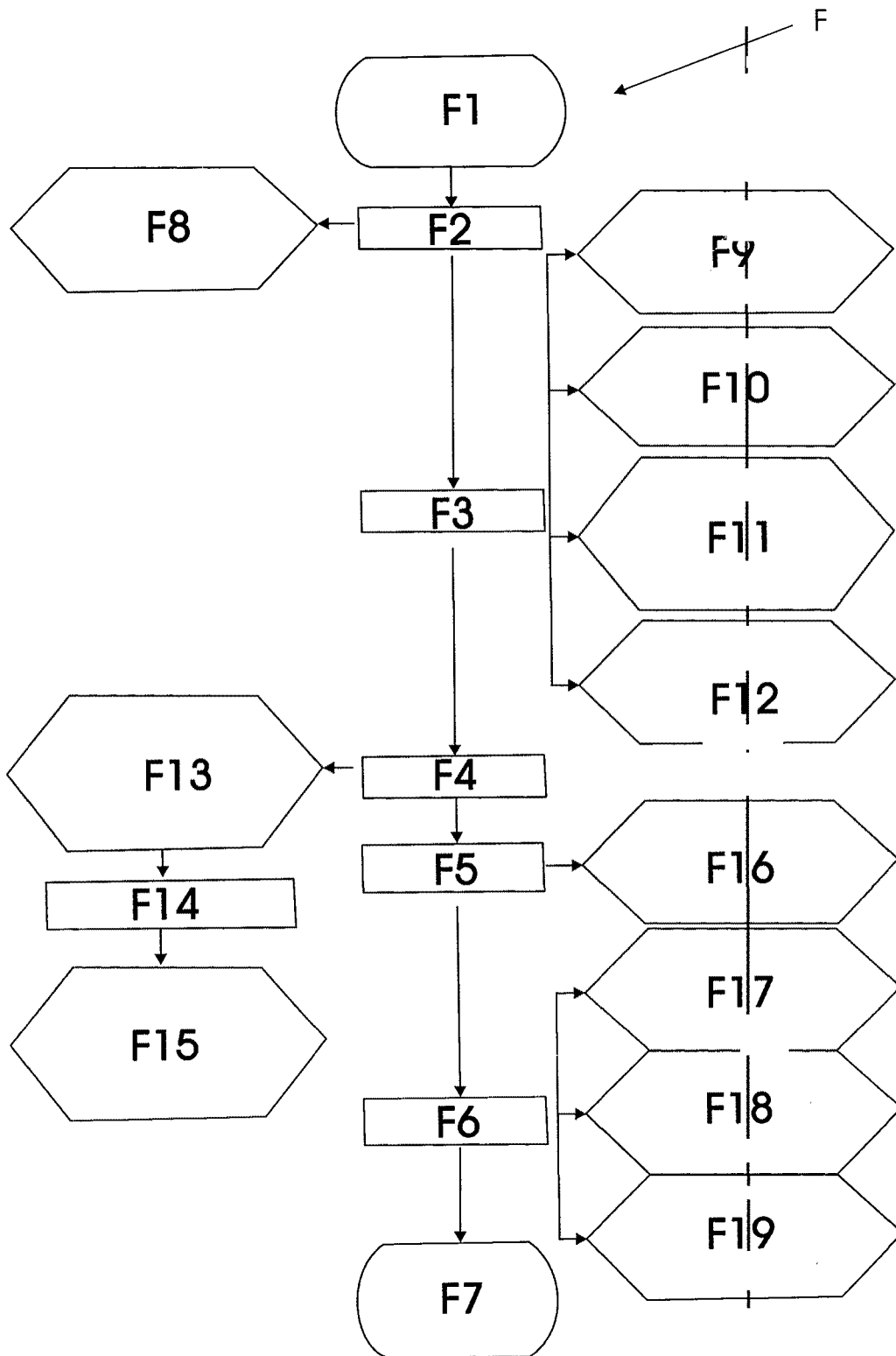


FIG.1

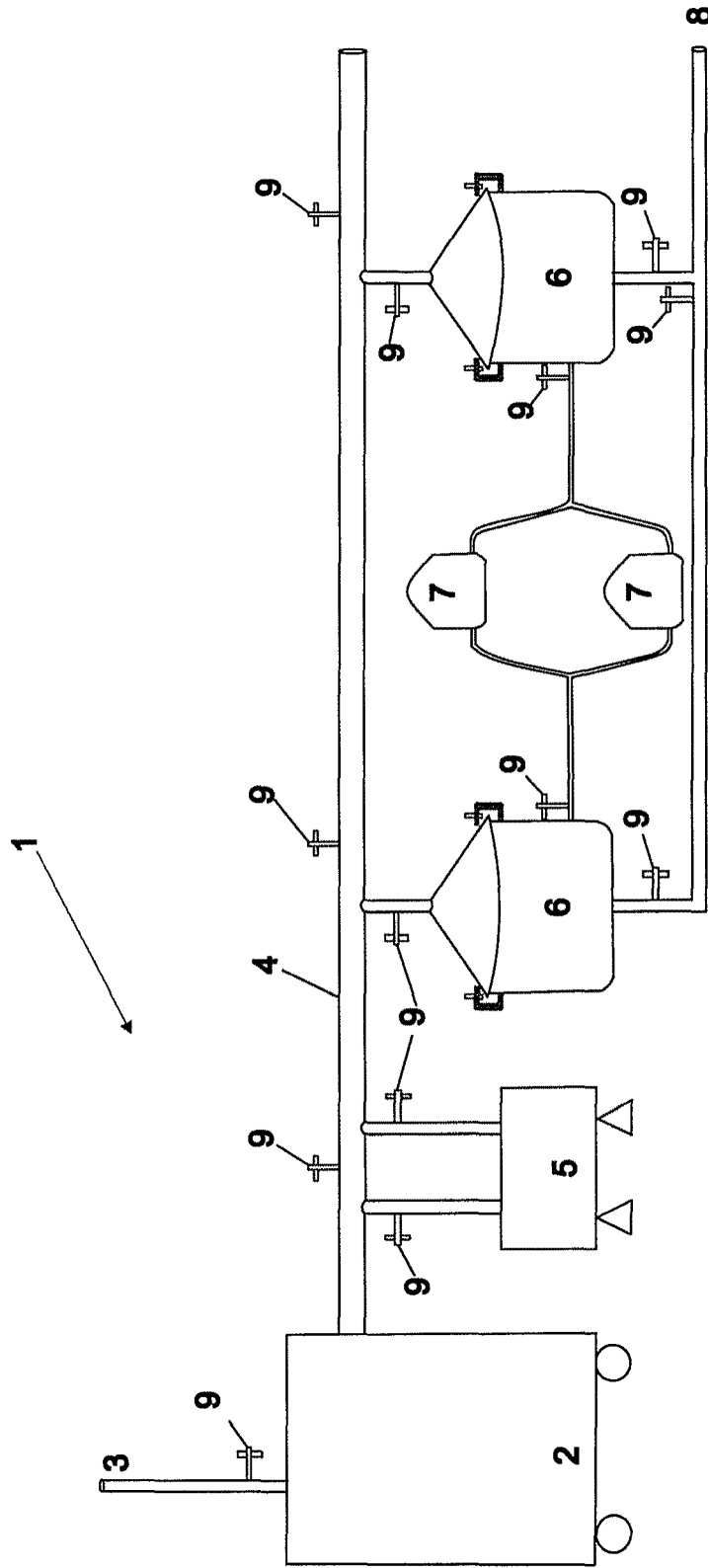


FIG.2

RESUMO

"PROCESSO DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO EM ESCALA DE CELULOSE BACTERIANA OBTIDA PELA POLIMERIZAÇÃO DA GLICOSE A PARTIR DE AÇÚCARES DE FONTES RENOVÁVEIS VIA BIOTECNOLOGIA POR MEIO DA PROPAGAÇÃO DE *GLUCONOACETOBACTER HANSENI* LMSPE EM REATORES E OBTENÇÃO DA CELULOSE PURIFICADA PARA APLICAÇÃO NAS ÁREAS DE SAÚDE, FARMACOTÉCNICA E COSMIATRIA", o qual prevê as etapas de a) preparação do mosto; b) esterilização do mosto; c) inoculação do mosto; d) propagação; e) clareamento) e f) obtenção do produto celulose bacteriana purificada. O processo de produção em escala de celulose bacteriana é obtido em uma unidade selada de esterilização e propagação, biodigestores com a área da superfície de flotação quatro vezes a da altura.