

INVESTIGAÇÃO E COMPARAÇÃO DA BIOMASSA DE *Gluconacetobacter xylinus* NO CALDO E NA MEMBRANA DE CELULOSE BACTERIANA EM MEIOS COM DIFERENTES PROPORÇÕES ENTRE AS FONTES DE CARBONO E DE NITROGÊNIO

*RESEARCH AND COMPARISON OF BIOMASS *Gluconacetobacter xylinus* IN JUICE AND PULP BACTERIAL MEMBRANE IN MEDIA WITH DIFFERENT PROPORTIONS AMONG THE CARBON SOURCES AND NITROGEN*

*INVESTIGACIÓN Y COMPARACIÓN DE BIOMASA *Gluconacetobacter xylinus* NO JUGO Y LA PULPA BACTERIANA MEMBRANA EN MEDIOS CON DIFERENTES PROPORCIONES ENTRE LAS FUENTES CARBONO Y NITRÓGENO*

Juliette Talita Borba¹, Monike de Arruda Queiroz², Cynthia Gisele de Oliveira Coimbra³

- 1- Aluna de graduação de farmácia da Faculdade Pernambucana de Saúde, juliettetalita@gmail.com
- 2- Aluna de graduação de farmácia da Faculdade Pernambucana de Saúde, monikeq@gmail.com
- 3- Farmacêutica, mestre - biotecnologia de produtos bioativos, professora da Faculdade ASCES, cynthiacoimbra@gmail.com

Resumo

Celulose bacteriana é um polímero de glicose que apresenta inúmeras aplicações, porém sua produção é limitada pela disponibilidade desta

matéria-prima em larga escala. O conhecimento de uma relação quantitativa entre a biomassa no caldo e na membrana bem como dos fatores que a influenciam permitirá a resolução deste problema por possibilitar a estimativa da concentração de células na membrana sem que seja necessário destruí-la. O objetivo deste trabalho foi avaliar a proporção da biomassa celular no caldo e na membrana, além da produção de celulose por *Gluconacetobacter xylinus*, modificando as concentrações de fonte de carbono (FC) e nitrogênio (FN) do meio. Para tanto foi realizado um planejamento fatorial 2^2 , cujos fatores estudados foram as concentrações FC e FN. Os experimentos foram realizados em triplicata duas vezes: a primeira para a medida de biomassa no caldo e na membrana e a segunda para a medida de celulose purificada. A reunião dos dados obtidos permitiu a verificação de diferenças significativas entre a concentração de biomassa no caldo e na membrana, a verificação de que a proporção de células em ambos os ambientes varia com a FC e a FN e está relacionada com a quantidade de celulose produzida.

Palavras-chave: celulose bacteriana, *Gluconacetobacter xylinus*, celulose, fonte de carbono, fonte de nitrogênio.

Abstract

Bacterial cellulose is a polymer of glucose which has numerous applications but their production is limited by the availability of this raw material in large scale. Knowledge of a quantitative relationship between biomass in the broth and the membrane as well as the factors that influence it will allow to solve this problem by allowing an estimated concentration of cells in the membrane without having to destroy it. The objective of this study was to evaluate the proportion of cell biomass in the broth and the membrane, in addition to pulp production by *G. xylinus* by modifying the carbon source concentrations (CF) and nitrogen (FN) of the medium. To this end it performed a factorial design 2^2 , whose factors

studied were the HR and FN whose experiments were performed in triplicate twice: the first for the biomass measured in the broth and the membrane and the second for the purified cellulose measure. The gathering of data allowed verifying significant differences between the biomass concentration in the broth and in the membrane, the verification that the proportion of cells in both environments is not constant, it varies with the FC and FN and may be related to the amount of cellulose produced.

Keywords: bacterial cellulose, *Gluconacetobacter xylinus*, cellulose, carbon source, nitrogen source.

Resumen

Celulosa bacteriana es un polímero de glucosa que tiene numerosas aplicaciones, pero su producción está limitada por la disponibilidad de esta materia prima en gran escala. El conocimiento de una relación cuantitativa entre la biomasa en el caldo y la membrana, así como los factores que influyen permitirá resolver este problema al permitir que una concentración estimada de células en la membrana sin tener que destruirlo. El objetivo de este estudio fue evaluar la proporción de la biomasa celular en el caldo y la membrana, además de la producción de pulpa por *G. xylinus* mediante la modificación de las concentraciones fuente de carbono (CF) y nitrógeno (FN) del medio. Con este fin se realizó un diseño factorial 2^2 , cuyos factores estudiados fueron los recursos humanos y FN cuyos experimentos se realizaron por triplicado en dos ocasiones: la primera para la biomasa medida en el caldo y la membrana y el segundo para la medida de celulosa purificada. La recogida de datos permite la verificación de diferencias significativas entre la concentración de biomasa en el caldo y en la membrana, la verificación de que la

proporción de células en ambos entornos no es constante, que varía con la FC y FN y puede estar relacionado con la cantidad de celulosa producida.

Palabras clave: celulosa bacteriana, *Gluconacetobacter xylinus*, celulosa, fuente de carbono, fuente de nitrógeno.

Introdução

A celulose ($(C_6H_{10}O_5)_n$) é o polissacarídeo mais abundante na natureza. A de origem vegetal é complexa, pois é entrelaçada com lignina, hemicelulose e pectina, diferente da bacteriana (CB) que, por não estar acompanhada pelas macromoléculas citadas é bem mais pura. A celulose bacteriana produzida pela bactéria *G. xylinum* é um dos mais promissores biomateriais nanoestruturados, exibindo características únicas com uma ampla perspectiva para interesses comerciais com inúmeras aplicações no mercado farmacêutico, biotecnológico, biomédico, odontológico, alimentício, da indústria química e medicinal⁽¹⁾. É biossintetizada por bactérias como: *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, sendo *G. xylinus* a mais estudada para este fim. A CB possui propriedades distintas da vegetal, como maior resistência mecânica e à tração, e possibilidade de inserções de materiais para obtenção de compósitos, que podem ser feitas na celulose previamente sintetizada e purificada ou "in situ", durante o cultivo da bactéria⁽²⁾ e sua pureza reduz o custo final do produto em relação à proveniente de material vegetal⁽³⁾.

A produção de CB por *G. xylinus* pode ser realizada em meios sólidos ou líquidos⁽⁴⁾. A sua síntese constitui um complexo processo que envolve três etapas principais: (1) polimerização dos resíduos de glicose em cadeias 1,4-glucana^(5,6,7), (2) secreção extracelular das cadeias lineares e (3) organização e cristalização das cadeias de glucanas, por meio de ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals dispostas hierarquicamente em tiras⁽⁷⁾.

A síntese de celulose por *G. xylinus* se dá a partir da glicose transportada do meio externo para o citoplasma da bactéria ou de fontes internas. A conversão da glicose transportada do meio externo para o citoplasma bacteriano é catalisada por quatro enzimas: Glicoquinase, que é a enzima responsável pela fosforilação do carbono 6 da glicose, a fosfoglicomutase, que catalisa a reação de isomerização da glicose-6-

fosfato para glicose-1- fosfato, a UDPG - pirofosforilase (glicose - 1 - fosfato uridililtransferase) que sintetiza a UDP - glicose (UDPG) e a Celulose Sintase (CS) que produz a celulose a partir de UDP-glicose^(6,8,9).

Para que o polímero possa ser usado em aplicações biomédicas, precisa ser biocompatível, com baixo coeficiente de fricção, apropriada topografia de superfície, afinidade química e hidrofiliabilidade⁽¹⁰⁾, propriedades que a CB apresenta e, portanto há relatos de seu uso com sucesso como curativos permanente, principalmente de lesões por queimadura ou pele artificial; implantes dentários; enxertos vasculares; membranas de diálise; revestimento de endopróteses expansíveis ("stents") cardiovasculares e cranianos; membranas para regeneração e substituição de tecidos; transportador de fármacos de liberação controlada; prótese vascular ou como vasos sanguíneos artificiais; curativos com ação antimicrobiana; em úlceras, enxertos e como auxiliar em abrasões dérmicas^(11,12), também por sua capacidade de controlar perda de fluidos, reduzir a dor durante o tratamento, criar e manter um ambiente úmido na ferida e facilitar a adesão e a proliferação celular. Logo, a importância da celulose bacteriana para a promoção da saúde é evidente, tendo em vista a variedade e a nobreza das aplicações que têm sido dadas à CB ^(2,13,14).

Por ser um produto da atividade microbiana, a CB pode ser produzida 365 dias por ano, independente das condições climáticas ou ambientais. Apesar de todas essas qualidades, ainda não existe uma planta de produção de CB em grande escala, devido à necessidade de otimização do cultivo, ocasionando baixos rendimentos e, conseqüentemente, custo elevado pouco acessível⁽²⁾. Tais estudos são avaliados pela análise do substrato utilizado, do crescimento da biomassa e da quantidade do produto (CB) produzido e, portanto, tais valores precisam ser determinados de maneira confiável.

O crescimento e a biossíntese dos produtos do metabolismo microbiano são influenciados pela qualidade, quantidade e proporção dos nutrientes do meio mas a medida do crescimento celular ainda representa

uma dificuldade para o estudo do processo e sem esta medida correta os balanços de massa não podem ser concluídos e um estudo confiável de otimização do processo também não pode ser realizado. Durante a produção de celulose, as células de *G. xylinus* permanecem em parte no caldo e também na membrana de celulose, o que inviabiliza a medida simultânea de biomassa e celulose, tendo em vista que a medida correta de um requer a destruição do outro. Muitos autores fazem a medida de células exclusivamente no caldo extrapolando a concentração de células para todo o volume de fermentação. Caso as concentrações de células no caldo e na membrana sejam idênticas, ou se mantiverem uma proporção constante, esta maneira de realizar a medida de biomassa será segura e muito útil. Porém, se alguma destas hipóteses não for confirmada, as medidas realizadas desta maneira levarão a erros graves, que impossibilita o fechamento de um balanço de massa. Porém o conhecimento de uma possível relação entre as concentrações de células nos dois ambientes (caldo e membrana) e dos fatores que podem influenciá-la tornar-se-á de extrema utilidade para o estudo da produção de CB, com aumento do rendimento e a viabilização de sua produção em escala industrial.

Este trabalho objetivou a investigação da concentração da biomassa celular no caldo e na membrana de CB, além da produção de celulose utilizando *G. xylinus*, em meios com diferentes concentrações de fonte de carbono (FC) e de nitrogênio (FN).

Materiais e métodos

Foi realizado um estudo experimental quantitativo em que foram inicialmente realizados processos fermentativos utilizando-se a bactéria *G. xylinus* em cultivo estático à temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), por 12 dias, em frascos Erlenmeyer de 500mL, utilizando 100 mL de meio Hestrin-Schramm (HS), composto por glicose, extrato de levedura, peptona, ácido cítrico ($1,15 \text{ g.L}^{-1}$) e Na_2HPO_4 ($2,7 \text{ g.L}^{-1}$). As concentrações

de glicose (fonte de carbono – FC) e de extrato e de levedura + peptona (1:1) (fonte de nitrogênio – FN) foram determinadas no planejamento experimental (Tabela 1). O inóculo correspondeu a 10% do volume final, e foi produzido com meio HS padrão utilizando glicose 20g.L^{-1} , extrato de levedura 5g.L^{-1} , peptona 5g.L^{-1} , Na_2HPO_4 $2,7\text{ g.L}^{-1}$ e ácido cítrico $1,15\text{ g.L}^{-1}$ com 48 horas de cultivo.

O planejamento experimental foi do tipo 2^2 , com pontos central e axiais, em que os efeitos principais e de interação da FC e da FN foram estudados. As faixas escolhidas entre os pontos axiais (-a e +a) foram, respectivamente de 10 g.L^{-1} a 30 g.L^{-1} e de $9,5\text{ g.L}^{-1}$ a $28,5\text{ g.L}^{-1}$. As variáveis dependentes estudadas foram concentração final de celulose, biomassa no caldo e na membrana, e relação entre a biomassa no caldo e na membrana. O tratamento estatístico foi realizado com o auxílio do programa STATISTICA 8.0 e os gráficos utilizando-se o Origin 8.0 como ferramenta.

Tabela 1

Todos os experimentos foram realizados em triplicata (exceto os experimentos do ponto central, que foram realizados em duplicata) e em duas etapas: a primeira, para a medida das concentrações de células no caldo e na membrana e a segunda para a quantificação da celulose produzida em cada condição. Para a determinação da celulose as membranas retiradas do meio foram rinsadas com água destilada e purificadas por submersão em solução de NaOH 0,5 M e mantidas a 90°C por 60 minutos. A base foi removida posteriormente por submersão e trocas de água destilada até a neutralização de seu pH. As membranas purificadas foram então medidas por peso-seco em estufa (Tecnal, TE-393/1) a 80°C até peso constante, medido em balança analítica (Ohaus, Pioneer).

Na segunda etapa, realizada para a medida de biomassa no caldo e na membrana, o volume do caldo sem a membrana foi medido com o

auxílio de provetas, o pH do caldo foi medido em pHmetro (Ohaus, Starter 2100). A biomassa do caldo foi medida por peso-seco a 80°C até peso constante, após a filtração prévia, a vácuo, de 4mL do meio em membranas com poros de 4,5 µm previamente tarada. A biomassa na membrana foi medida após a hidrólise desta última. Para isso as membranas foram banhadas em solução tampão de citrato de sódio e ácido cítrico pH 4,8. Cada membrana foi então transferida para um frasco contendo 50 mL de volume da solução tampão e a este adicionado a enzima CELLUCLAST[®] suficiente para atingir a concentração de 0,1% (v/v) e os frascos foram mantidos em banho termostaticado (Cole Parmer, PT-1400) a 50°C durante 8h. Todo o volume de cada frasco foi filtrado a vácuo em membranas filtrantes com poros de 4,5 µm de diâmetro, previamente secas e taradas, para a medida por peso-seco a 80°C até peso constante.

Resultados e Discussão

Em todos os experimentos realizados as concentrações de células na membrana e no caldo diferiram consideravelmente, sendo sempre mais elevado na membrana, mas sem que a relação entre tais concentrações fosse mantida nas diferentes condições. As concentrações mais elevadas que podem ser obtidas no caldo e na membrana na faixa de concentrações de FC e de FN testadas são, respectivamente, 0,023 g.L⁻¹ e 0,4 g.L⁻¹, o que pode se observado nas Figuras 1 e 2. A significativa diferença de concentração de células no caldo e na membrana ocorre, provavelmente, pelo fato de a linhagem *G. xylinum* ser uma bactéria Gram-negativa, aeróbia estrita e também ter a capacidade de utilizar uma variedade de substratos para a biossíntese de celulose¹⁵, as bactérias que estão em contato direto com o ar conseguem produzir a celulose de maneira mais acelerada do que as que ficam no restante do caldo, pois o contato direto com esse nutriente fundamental facilita o aumento da biomassa e a consequente produção de CB. A membrana de CB funciona

como mecanismo de flotação, permitindo ao microrganismo permanecer em uma interface ar/líquido para obter oxigênio com maior facilidade para seu crescimento, além de atuar como barreira física que protege a bactéria da radiação ultra-violeta². As células que ficam no caldo dependem do oxigênio que será transmitido pela membrana e pelo que foi dissolvido no meio. Além disso, provavelmente recorrem também à via fermentativa para a obtenção de energia, que é menos eficiente, o que pode explicar o fato de o maior crescimento de biomassa no caldo ter ocorrido apenas em meios com concentrações mais elevadas de FC (30 g.L⁻¹) em relação à concentração mais favorável ao crescimento celular na membrana (20 g.L⁻¹), onde há mais oxigênio disponível. Em relação à FN, a diferença na concentração mais favorável ao crescimento bacteriano foi menor, mas ainda sim maior na biomassa do caldo (23 g.L⁻¹) e menor na biomassa da membrana (20g.L⁻¹). De acordo com Ross (1991) *G. xylinus* em meios com limitação de fontes de nitrogênio, mantém a produção de celulose desde que o suprimento de FC seja adequada⁶.

Figura 1

Figura 2

Concentrações de células no caldo e na membrana de celulose

As concentrações de biomassa no caldo e na membrana não são iguais, mas são influenciadas de maneira diferente pelos fatores estudados:

A concentração de células no caldo aumenta com a elevação de ambos os nutrientes (FC e FN), de forma que o planejamento aponta que as maiores concentrações de células no caldo podem ser obtidas com as concentrações mais elevadas de FC (30 g.L⁻¹) e de FN (23 g.L⁻¹) testadas, a maior concentração de células no caldo, apontada pelo estudo fatorial é a que corresponde aos experimentos 1 e 5, é possível observar esses resultados na figura 1. Foi contado com a diferente disponibilidade de oxigênio, que é maior na membrana que fica na superfície e menor no

caldo que depende do oxigênio dissolvido no meio de cultura, então é possível que a relação da concentração de células se modifique na membrana e no caldo. Foi verificado se há uma proporção constante ou que muda, sendo influenciada pelas concentrações de FC e de FN. Foi investigado se há alguma relação entre as concentrações de células no caldo e na membrana e a produção de celulose.

O mesmo não é observado em relação ao crescimento de células na membrana, cuja concentração de FN mais favorável é de aproximadamente 19 g.L^{-1} e de FC de aproximadamente 20 g.L^{-1} . A maior concentração de células na membrana apontada pelo estudo fatorial é a que corresponda ao experimento 10, como pode ser verificado no gráfico da figura 2. Concentrações superiores ou inferiores a estes valores resultam em menores concentrações de células na membrana.

As concentrações de biomassa no caldo e na membrana são diferentes, por isso não é possível medir a biomassa no caldo e extrapolar para todo o volume, pois a concentração de biomassa no caldo foi de aproximadamente $0,023 \text{ g.L}^{-1}$ e de biomassa na membrana é de aproximadamente $0,4 \text{ g.L}^{-1}$. Um possível motivo seria o fato de a membrana estar em maior contato com o oxigênio, o que influenciaria positivamente na produção das células, já o caldo conta apenas com o oxigênio que está dissolvido no meio de cultura, tendo menor disponibilidade e finalmente menor concentração total. A extrapolação da concentração de células no caldo para estimar o total induz a um erro considerável na medida de biomassa.

A maior concentração de células na membrana e no caldo é de aproximadamente 23 g.L^{-1} , com FC ($\sim 20 \text{ g.L}^{-1}$) e FN ($\sim 23 \text{ g.L}^{-1}$), conforme a figura 3, concentrações menores ou maiores dos substratos resultariam em uma diminuição dessa proporção.

Figura 3

Produção de celulose

A construção do gráfico de superfície através dos dados obtidos pela medida de celulose em meios com concentrações diferentes de FC e FN permitiu a verificação de condições com as concentrações mais baixas de FC associadas às mais elevadas de FN correspondem às que mais favorecem a produção de celulose, o que pode ser observado na figura 4.

Figura 4

A maior concentração de celulose obtida nas faixas de concentrações de FC (7 g.L^{-1}) e FN (30 g.L^{-1}) testadas é aproximadamente $0,45 \text{ g.L}^{-1}$. Uma possível explicação para essa proporção seria que a FC é o nutriente que o microrganismo usa prioritariamente como fonte de energia e a FN contém os nutrientes (aminoácidos) que o microrganismo usa para a síntese de suas estruturas celulares, suas enzimas, mas os microrganismos também podem usar as FNs como fonte de energia. A proporção entre a FC e a FN também influenciam o metabolismo oxidativo e modificam a demanda de oxigênio, que resulta, certamente, em diferentes velocidades de crescimento celular em cada um destes ambientes.

Relação entre concentração de biomassa no caldo e na membrana para produção de celulose

Foi observado que quanto maior a concentração de células na membrana ($\sim 1,5 \text{ g.L}^{-1}$) e menor concentração de células no caldo ($\sim 0,012 \text{ g.L}^{-1}$) resultaram em maior concentração de celulose que foi aproximadamente $0,4 \text{ g.L}^{-1}$, conforme figura 5.

Figura 5

Conclusões

O caldo de produção de celulose é dividido em dois ambientes com ofertas diferenciadas de nutrientes (FC e FN) e de oxigênio. A medida de biomassa, portanto, não pode, de forma alguma, ser feita exclusivamente no caldo e extrapolada para o volume da membrana, o que leva a grandes erros de medida e, conseqüentemente, a consideráveis erros no balanço de massa tão necessário para o entendimento de um processo fermentativo e, conseqüentemente, o estabelecimento das condições mais adequadas à produção de celulose. Este trabalho permitiu o entendimento da relação entre o crescimento celular em ambos os ambientes e a produção de celulose, contribuindo, desta forma, para os estudos de produção de celulose bacteriana utilizando-se *G. xylinus*.

Referências

1. Barud SH. Membranas de Celulose Bacteriana contendo Nanopartículas de Prata. 30º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2005.
2. Donini IAN. et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. *Eclet. Quím.*, vol.35, nº4, São Paulo, 2010
3. Shoda M, Sugano Y. recent advances in bacterial cellulose production, *biotechnol. Bioprocess eng.* 10 (2005)
4. Williams WS, Cannon RE. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. *Appl Environ Microbiol* 55, 2448–2452 (1989).
5. Chávez-Pacheco JL, Martínez-Yee S, Contreras-Zentella M. Escamilla-Marván, E. *TIP.* 7 (2004) 26.
6. Ross P, Mayer R, Benziman M. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 55 (1991) 35.
7. Saxena M, Brown R. *Ann. Bot.* 96 (2005) 9.
8. Swissa M, Aloni Y, Weinhouse H, Benizman M, *Bacteriol J.* 143(3) (1980) 1142.
9. Krystynowicz M, Koziolkiewicz A, Wiktorowska-Jeziarska S, Bielecki. et al. *Acta Biochim. Pol.* 52 (3) (2005) 691.
10. Wu Y, Yu S, Mi F, Wu C, Shyu S, Peng C, Chao A. Preparation and characterization on mechanical and antibacterial properties of chitosan/cellulose blends. *Carbohydrate Polymers.* 57, 435-440; (2004)
11. Fontana JD, De Souza AM, Fontana CK, Torriani IL, Moreschi, JC, Gallotti BJ, De Souza SJ, Narcisco GP, Bichara JA, Farah LF. *Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skinsubstitute. Appl Biochem Biotechnol*, v.24-25, p.253-64. 1990.
12. Sanchavanakit N, Sangrungraungroj W, Kaomongkolgit R, Banaprasert T, Pavasant P, Phisalaphong M. Growth of human

keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film. *Biotechnology Progress*, v.22, n.4, p.1194-1199. 2006

13. Gomes FPA. *Biossíntese de Celulose Bacteriana a partir de Resíduos Industriais*, 2011.

14. Recouvreux DOS. *Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos*, 2008.

15. Souza SS, Porto LM. *Biologia sistêmica da produção de celulose bacteriana através da reconstrução metabólica da *Gluconacetobacter hansenii**, [dissertation], Santa Catarina, Universidade Federal de Santa Catarina/ UFSC; 2014. 144p.

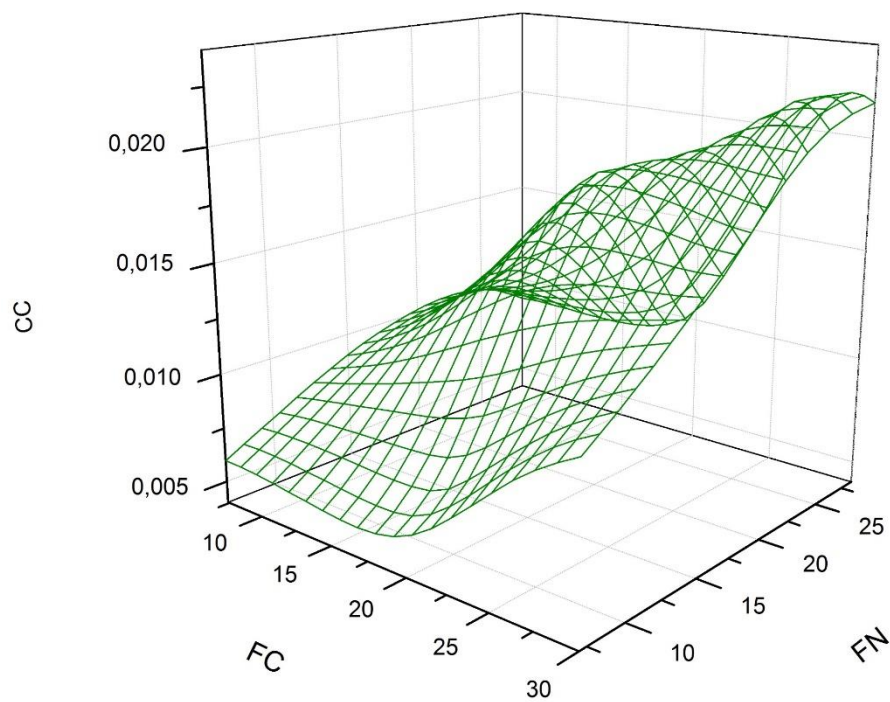
Tabela 1. Matriz do planejamento experimental 2^2 , incluindo os pontos central e axiais, usados para estudar a influência de dois fatores (FC e FN) sobre o crescimento celular no caldo, na membrana, a proporção das concentrações nos dois ambientes e sobre a produção de celulose.

Códigos	Fatores	Níveis				
		- α	-1	Central	+1	+ α
FC	Fonte de Carbono (g.L^{-1})	10,0	7,4	20,0	27,1	30,0
FN	Fonte de Nitrogênio (g.L^{-1})	9,5	7,0	19,0	25,7	28,5

Exp	Factor Levels		Conditions	
	FC (g.L^{-1})	FN(g.L^{-1})	FC (g.L^{-1})	FN (g.L^{-1})
1	+1	+1	27,1	25,7
2	-1	+1	7,4	25,7
3	+1	-1	27,1	7,0
4	-1	-1	7,4	7,0
5	+ α	0	30,0	19,0
6	- α	0	10,0	19,0
7	0	+ α	20,0	28,5
8	0	- α	20,0	9,5
9	0	0	20,0	19,0
10	0	0	20,0	19,0
11	0	0	20,00	19,0

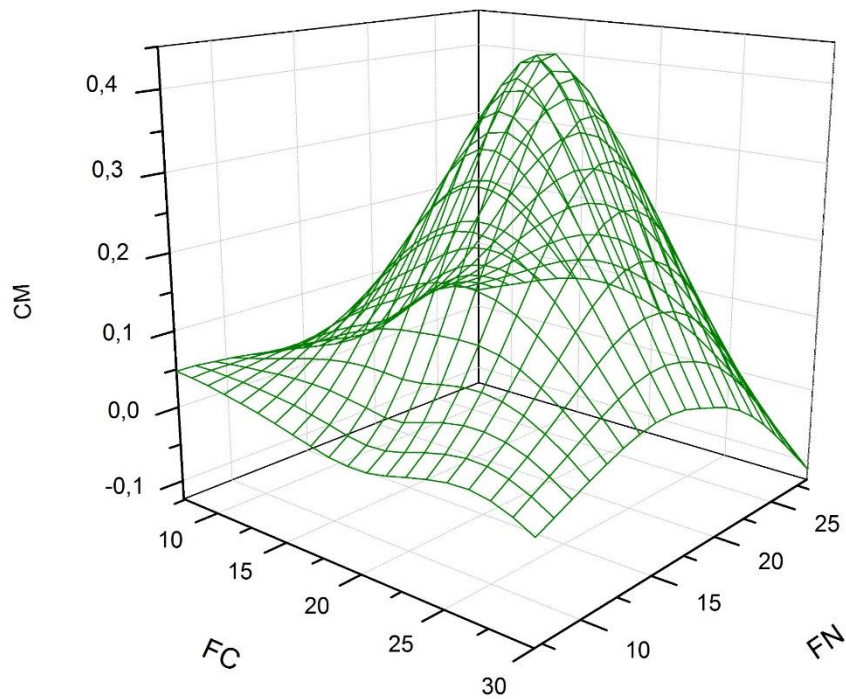
+ , - = níveis do planejamento fatorial; 0 = ponto central; + α e - α = pontos axiais.

Figura 1 – Gráfico de concentração de células no caldo



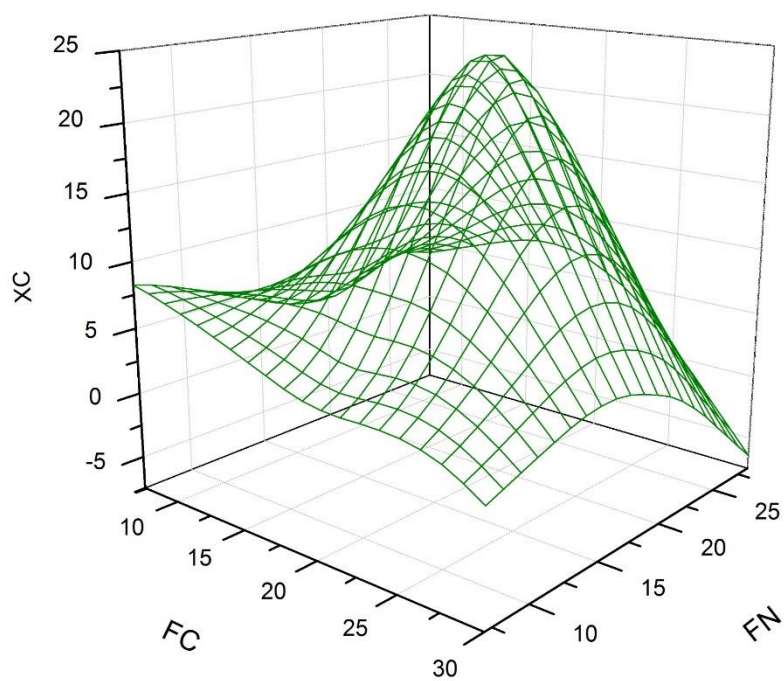
FC: Fonte de carbono; FN: Fonte de nitrogênio; CC: Concentração de células no caldo.

Figura 2 – Gráfico de concentração de células na membrana



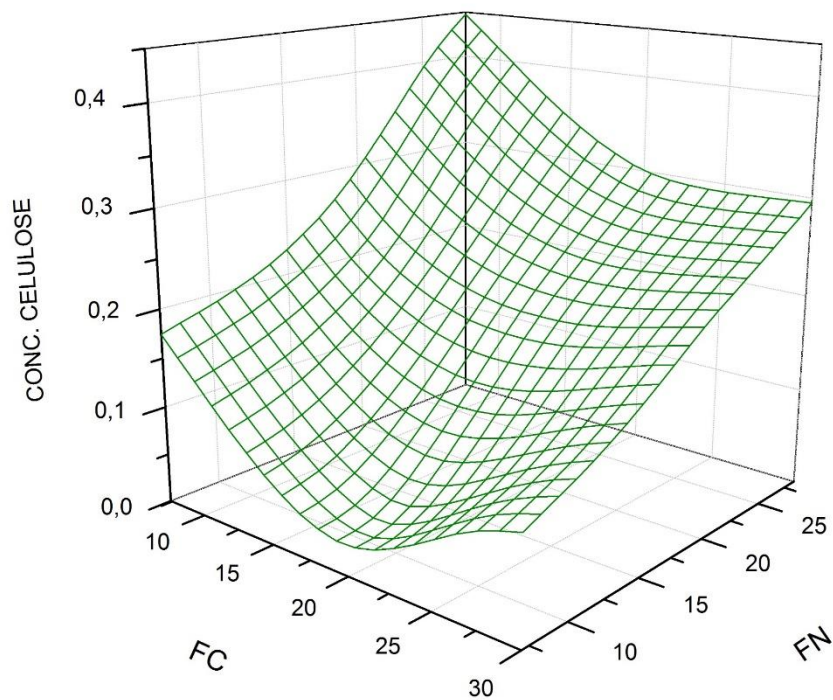
FC: Fonte de carbono; FN: Fonte de nitrogênio; CM: Concentração de células na membrana.

Figura 3- Gráfico relacionando a concentração de células na membrana e no caldo



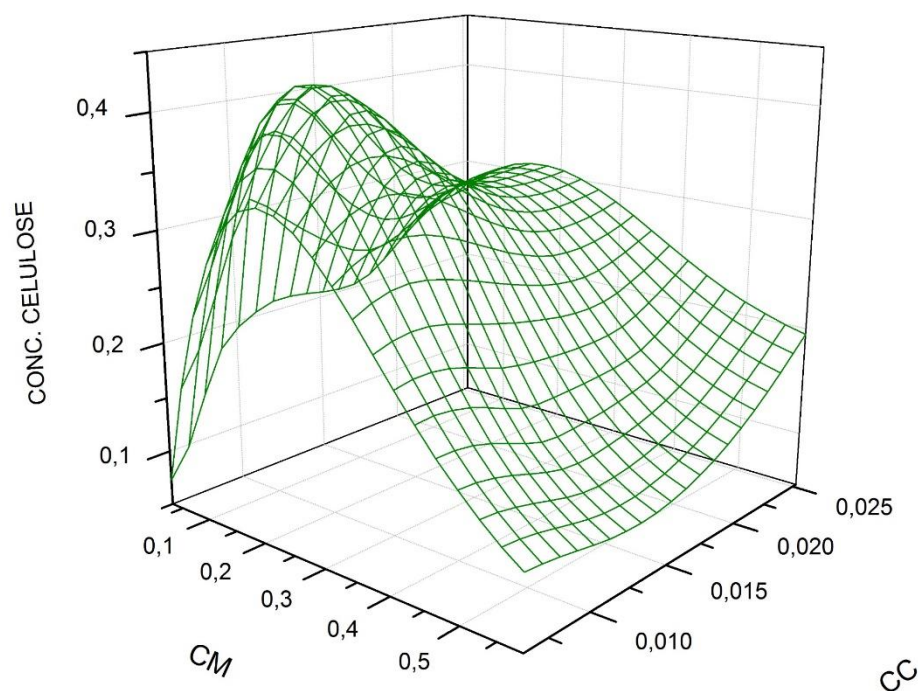
FC: Fonte de carbono; FN: Fonte de nitrogênio; XC: Relação da concentração de células na membrana e no caldo.

Figura 4 – Gráfico de concentração de celulose



FC: Fonte de carbono; FN: Fonte de nitrogênio; CONC. CELULOSE: Concentração de celulose.

Figura 5 – Gráfico relacionando concentração de celulose com a biomassa no caldo e na membrana



CM: Concentração de células na membrana; CC: Concentração de células no caldo; CONC. CELULOSE: Concentração de celulose

Faculdade Pernambucana de Saúde - Programa de Iniciação Científica
e Trabalho de Conclusão de Curso.

Anexo 1 - INSTRUÇÕES PARA O PREPARO E ENVIO DOS MANUSCRITOS PARA REVISTA ELETRÔNICA DE FARMÁCIA

A REF atualizou em abril de 2010 as regras para publicação e organização das referências, tendo como base as normas adotadas pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (estilo Vancouver), publicadas no ICMJE - Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (<http://www.icmje.org/index.html>).

CATEGORIA DOS ARTIGOS

A REF publica, preferencialmente, artigos originais, incluindo na sua linha editorial também estudos cienciométricos (artigos de revisão sistemática, Meta-análise), comunicações breves e relato de casos. Artigos de revisões narrativas só serão aceitas quando as mesmas forem de autoria de editores da Revista Eletrônica de Farmácia ou de pesquisadores convidados pela Equipe Editorial.

A apresentação dos manuscritos deve obedecer à regra de formatação definida nessas normas, diferenciando-se apenas pelo número permitido de páginas em cada uma das categorias.

Artigos Originais: são trabalhos resultantes de pesquisa original, de natureza quantitativa ou qualitativa. Sua estrutura deve apresentar necessariamente os itens: Introdução, Metodologias, Resultados e Discussão e Conclusão. A hipótese de pesquisa, bem como os objetivos devem ser facilmente identificados no final da Introdução. Apresentação máxima de 25 laudas.

- Artigos de Estudos Cienciométricos: são contribuições que têm por objeto a análise sistematizada da literatura. Deve incluir com clareza a delimitação do problema, dos procedimentos adotados no procedimento metodológico e conclusões. Apresentação máxima de 25 laudas.
- Comunicações breves/Relatos de caso/experiência: se caracterizam pela apresentação de notas prévias de pesquisa, relatos de caso ou experiência, de conteúdo inédito ou relevante, devendo estar amparada

em referencial teórico que dê subsídios a sua análise. Apresentação em até 10 laudas.

FORMA DE APRESENTAÇÃO DOS MANUSCRITOS

Os trabalhos deverão ser apresentados em formato compatível ao Microsoft Word (.doc), digitados para papel tamanho A4, com letra tipo Verdana, tamanho 12, com espaçamento 1,5 cm entre linhas em todo o texto, margens 2,5 cm (superior, inferior, esquerda e direita), parágrafos alinhados em 1,0 cm.

- Título: Letra tipo Verdana, justificado, em caixa alta, tamanho 16, negrito, nas versões da língua portuguesa, inglesa e espanhola, na primeira página do trabalho. Os títulos em inglês e espanhol devem vir logo após ao título em português, estes devem estar no formato justificado, caixa alta, em itálico, tamanho 14, letra tipo Verdana. Não utilizar abreviações no título e resumo. Especificar em nota no fim do documento a indicação da agência de fomento, quando for o caso e, também, quando parte de Relatório de Pesquisa, Tese, Dissertação, entre outras. Deverá ser conciso, porém informativo, em até 15 palavras. Autores: a identificação deve ser feita somente pelo sistema de submissão online. Devem ser apresentadas as seguintes informações: nome(s) completo(s) do(s) autor(es), formação universitária, titulação, atuação profissional, local de trabalho ou estudo, e e-mail, de preferência institucional.

- Resumo e descritores: devem ser apresentados na primeira página do trabalho em português, inglês e espanhol, digitados em espaço simples, com até 200 palavras. A sequência de apresentação dos resumos deve seguir a seguinte ordem: resumo em português, inglês e espanhol, independente da língua utilizada para o desenvolvimento do manuscrito. Os resumos devem contemplar os seguintes itens: contextualização, problemáticas (Gap), objetivo, metodologia, resultados, conclusões. Ao final do resumo devem ser apontados de 3 a 5 descritores que servirão

para indexação dos trabalhos. Para tanto os autores devem utilizar os “Descritores em Ciências da Saúde” da Biblioteca Virtual em Saúde (<http://www.bireme.br/> ou <http://decs.bvs.br/>). Os descritores não poderão estar presentes no título.

- Estrutura do Texto: a estrutura do texto deverá obedecer às orientações de cada categoria de trabalho já descrita anteriormente, acrescida das referências bibliográficas, de modo a garantir uma uniformidade e padronização dos textos apresentados pela revista. Os anexos (quando houver) devem ser apresentados ao final do texto.

- Ilustrações: tabelas, figuras e fotos devem estar inseridas como documentos suplementares, em documento único, separados por “quebra de página”. As ilustrações devem apresentar informações mínimas (título e legenda) pertinentes àquela ilustração. Os títulos das ilustrações devem estar posicionados acima da ilustração e as legendas abaixo da mesma. As Ilustrações e seus títulos devem estar centralizados e sem recuo, tamanho 9, fonte Verdana. O tamanho máximo permitido é de uma folha A4. Cada ilustração deve estar em uma única página e as páginas separadas por “quebra de página”.

- Notas de rodapé: devem ser apresentadas quando forem absolutamente indispensáveis, indicadas por números e constar na mesma página a que se refere.

- Citações:

- ◇ Para citações “ipsis literis” de referências bibliográficas deve-se usar aspas na sequência do texto.

- ◇ As citações de falas/depoimentos dos sujeitos da pesquisa deverão ser apresentadas em itálico, em letra tamanho 10, na sequência do texto.

- Referências bibliográficas: as referências bibliográficas devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que forem mencionadas pela primeira vez no texto. Devem ser identificadas no texto por números arábicos sobrescritos entre parênteses, sem espaços da última palavra para o parênteses, sem a menção aos autores, exceto quando

estritamente necessária à construção da frase. Nesse caso além do nome deve aparecer o número da referência. Essa regra também se aplica para tabelas e legendas. Ao fazer a citação sequencial de autores, separe-as por um traço; quando intercalados utilize vírgula.