BIOSSÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA PROVENIENTE DO CHÁ DE KOMBUCHA

BIOSYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF BACTERIAL CELLULOSE FROM THE KOMBUCHA TEA

ALVES, Genoilson de Brito^{1*}; BEVERARI, Sarah Ferrer²; FLORENTINO, Laura Camilo³; GUERRERO, André Soares⁴; SILVA, Matheus Antony de Almeida⁵

^{1,2,3,4,5} CEETEPS – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza - ETEC Júlio de Mesquita, Curso técnico em química

* Autor correspondente
e-mail: alvesgbio@gmail.com

Received 19 February 2019; received in revised form 28 May 2019; accepted 09 June 2019

RESUMO

A celulose é um importante biopolímero, utilizado como matéria prima de produtos de diferentes aplicações industriais. A celulose é o polímero natural mais abundante do planeta, pois está presente como constituinte da maior parte da biomassa das plantas situada na parede celular vegetal. Com o avanço tecnológico, buscam-se diferentes alternativas para desenvolver esse material de maneira sustentável e produtiva, sendo uma dessas a produção da celulose a partir do metabolismo microbiano. A Kombucha consiste em um caldo fermentado a partir de uma associação simbiótica entre bactérias e leveduras capazes de produzir celulose bacteriana (CB). A celulose obtida foi tratada com água e com NaOH, e através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), verificamos maior preservação na integridade da fibra no tratamento com água. Isto foi confirmado no teste de filtração onde a CB (H₂O) apresentou redução de 82,8% na população microbiana da água proveniente de um córrego, seguida por 47,9% na CB (NaOH). A espectrometria de infravermelho (FT-IR) revelou diferença sutil entre os dois tratamentos, enquanto o teste de tração revelou que o tratamento alcalino reduz em mais de 2 vezes o limite de resistência da fibra. Com base nos resultados obtidos podemos afirmar que a celulose obtida da kombucha possui características interessantes para o uso comercial em diversos segmentos como uso em enxertos humanos para revestir a pele e como filtro para retenção de partículas biológicas em ambientes fechados como aviões e até mesmo uso hospitalar para conter a disseminação de patógenos.

Palavras-chave: *Celulose bacteriana; Kombucha; Biopolímero; Caracterização.*

ABSTRACT

Cellulose is an important biopolymer, used as a raw material for different industrial applications. This represents the most abundant natural polymer on the planet, because it is present as the constituent of most of the biomass of the plants, located in the plant cell wall. With the technological advance, different alternatives different alternatives to develop this material in a sustainable and productive way are searched, one of them is the production of cellulose from microbial metabolism. Kombucha consists of a broth fermented from a symbiotic association between bacteria and yeasts capable of producing bacterial cellulose (CB). The obtained cellulose was treated with water and with NaOH, and through Scanning Electron Microscopy (SEM), we observed greater preservation in the integrity of the fiber in the treatment with water. This was confirmed in the filtration test where the CB (H₂O) presented a reduction of 82.8% in the microbial population of the water coming from a stream, followed by 47.9% in the CB (NaOH). Infrared spectrometry (FT-IR) revealed a subtle difference between the two treatments, while the tensile test showed that the alkaline treatment reduces the resistance limit of the fiber by more than 2 times. Based on the results obtained we can assess that the cellulose obtained from kombucha has interesting characteristics for commercial use in several segments as use in human grafts to coat the skin and as a filter for retention of biological particles Indoors as airplanes and even hospital use to contain the dissemination of pathogens.

Keywords: *Bacterial cellulose; Kombucha; Biopolymer; Characterization*

1. INTRODUÇÃO

A celulose vegetal pode ser classificada como um biopolímero, por se tratar de um polímero extraído de fontes naturais renováveis (PEREIRA et al., 2013; AIROLDI et al., 2008). Além disso, é o polímero natural mais abundante do planeta, sendo um dos constituintes da maior parte da biomassa das plantas, situado na parede celular vegetal (DONINI et al., 2010).

Há alguns anos, se tornou imprescindível a participação desse material em grandes quadros mundiais devido a sua usualidade em diversos setores industriais, cujo ramo mais conhecido é a produção de papel (ABDI, 2012).

Contudo, a fabricação deste requer o emprego do florestamento em diversos solos, ato que pode modificar e prejudicar o solo que está sendo submetido a condições diferentes de sua mata nativa. Segundo estudos de ARAÚJO, GOEDERT e LACERDA (2007), em áreas de plantações de Pinus, por exemplo, há a redução da capacidade de troca catiônica do solo a cada ano de plantio, e como praticamente toda madeira utilizada para tais fins tem origem em florestas plantadas de Pinus e Eucalipto, este fato se torna preocupante.

Assim, buscam-se novas formas viáveis de se obter celulose, sem causar tantos danos à natureza. Uma alternativa é a síntese de celulose por meio de bactérias. A celulose bacteriana, em oposição à celulose vegetal, não apresenta contaminação pelos polissacarídeos lignina e hemicelulose, tornando os métodos de isolamento destes desnecessários, possibilitando a economia de energia envolvida nos processos e descartando tratamentos químicos mais complexos (DONINI et al., 2010).

Acredita-se que a celulose bacteriana se enquadre como um biomaterial bastante promissor já que suas características físicas, como alta cristalinidade, elasticidade, resistência a tensão, biocompatibilidade e capacidade de absorção de água, a torna alvo no ramo da biotecnologia e de diversos setores da indústria (ALMEIDA, 2013).

A produção de celulose bacteriana é realizada por diversas bactérias de diferentes gêneros como *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, onde essas apresentam a capacidade de metabolização da glicose, que atua como fonte de energia no

metabolismo dos microrganismos e como precursora da biossíntese do polímero (ROSS et al., 1991).

Atualmente, a bactéria *Gluconacetobacter xylinus* é o microrganismo mais utilizado nos estudos sobre a biossíntese de celulose, devido tanto à sua produtividade na presença de diversas fontes de carbono e nitrogênio (LEE et al, 2014), quanto por representar o maior valor até então encontrado na literatura para a obtenção desse produto, correspondente a 15,3 g/L em 50 horas de cultivo bacteriano (DONINI et al, 2010).

As bactérias do gênero *Gluconacetobacter* são não patogênicas, comumente encontradas em alimentos, como em vegetais e frutas, que realizam a fermentação acética, sendo a *Gluconacetobacter xylinus* a principal responsável pela produção do vinagre (Embrapa, 2006).

Outro meio em que existem colônias dessa bactéria é o chá de kombucha que é uma bebida produzida pela fermentação de chá (sendo mais comumente utilizados chá verde ou preto) e açúcar por meio de uma associação simbiótica conhecida como SCOBY (Symbiotic Community of Bacteria and Yeast), que se apresenta na superfície do chá junto a toda a celulose formada (NGUYEN et al., 2008).

A Kombucha é uma bebida tradicionalmente chinesa que foi inserida em países europeus por portugueses e holandeses e está relacionada a alguns hábitos alimentares em consequência de suas propriedades estimulantes e desintoxicantes que melhoraram o fluxo de sangue e urina (HOLIMAN; HERTOOG; KATAN, 1996; YANG; WANG, 1993).

Em março de 2018, fora realizada uma pesquisa pela Universidade de Guayaquil, no Equador, onde se obteve celulose a partir do chá de Kombucha utilizando frutas, como a banana e o abacaxi, como fonte de carbono e meio de cultura também (BARRETO; SORIANO, 2018).

Em todos os meios pode se observar uma alta produção que é característica do chá, o que poderia destacá-lo em relação a produção realizada por bactérias isoladas, uma vez que, contendo uma diversidade de espécies de bactérias produtoras de celulose em conjunto com leveduras, a kombucha apresenta películas bem formadas. Sendo assim, buscamos comparar a formulação da película de celulose

produzida pelas bactérias e suas características após serem tratadas com NaOH e com água, avaliando sua integridade microscópica, resistência mecânica e capacidade de filtração para bactérias.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Comparação da produção celulósica

Iniciamos os experimentos com bactérias presentes em matriz para formulação de vinagre. Para o procedimento foi preparado meio de cultura Alaban por apresentar características ácidas adequadas para o desenvolvimento microbiano de bactérias do gênero *Gluconacetobacter* (DANESI, E. D.; WOSIACKI, G., 1998; ALABAN, C. A., 1962).

Ao meio de cultura autoclavado foram adicionados 5 mL da cepa em questão (procedimento realizado na capela de fluxo laminar evitando risco de contaminação), em seguida fora levado a incubadora à temperatura de 30°C para o crescimento das bactérias, durante aproximadamente dois dias.

Para melhores parâmetros de comparação sobre o índice de produtividade da celulose entre a bactéria isolada e a comunidade de bactérias presentes no chá de kombucha, foram adicionados 5 mL de chá verde em um erlenmeyer e 5 mL de chá de kombucha no outro, ambos previamente inoculados, com o objetivo de acrescentar a cada um dos meios outros microrganismos diferentes dos inoculados.

2.2. Identificação da bactéria *G. xylinus* na kombucha

Tendo em vista identificar a presença da bactéria *Gluconacetobacter xylinus* na kombucha, foram realizados os testes de Gram e Catalase, esperando os resultados, negativo e positivo, respectivamente. Por tanto, foi preparado um ágar nutriente, que possibilita o crescimento de variados microrganismos, e a este foi adicionado o chá de kombucha.

2.2.1. Coloração de Gram

Para cada colônia bacteriana que havia crescido em meio de cultura sólido, foi preparado um esfregaço coletando parte das colônias com o auxílio de uma alça bacteriológica e depositando sob uma gota de água presente em uma lâmina. Então fora realizado o procedimento

de fixação dessas colônias sobre as lâminas, para impedir a remoção destas durante a coloração. Assim, seguiu-se o procedimento de coloração do teste em questão.

Adicionou-se violeta genciana sob a amostra, constantemente por 1 minuto, e lavou-se com água destilada. Posteriormente, adicionou-se a solução de Lugol por 1 minuto, seguido, novamente, de lavagem em água. Em seguida, realizou-se a lavagem com álcool 90% por 30 segundos e lavou-se com água destilada. A superfície da lâmina foi coberta com fucsina e após 1 minuto, ocorreu a última lavagem. Após a secagem, observou-se a coloração que as amostras desenvolveram tanto a olho nu quanto a microscopia óptica para avaliação dos resultados.

2.2.2. Teste de Catalase

Para essa análise, foi retirada uma alçada das colônias bacterianas formadas em ágar nutriente e depositou-as em lâmina de vidro. Em seguida, adicionou-se uma gota de H₂O₂ a 3% e observou-se a lâmina macroscopicamente, analisando a formação ou ausência de bolhas.

2.3. Tratamento da celulose

O tratamento da celulose teve como objetivo eliminar os microrganismos da película e retirar os subprodutos da síntese para futuras análises do produto. Para determinação de um método mais efetivo de tratamento, escolheu-se dois para posterior comparação, com NaOH e Água quente.

O tratamento com NaOH consiste na imersão da película de CB em uma solução de Hidróxido de Sódio 1 mol/L durante 15 minutos, seguido de lavagem em constante agitação para retirada da base sobressalente. O tratamento com água foi feito com a imersão da película em água próxima ao ponto de ebulição e a troca desta até que a celulose não apresente manchas amareladas.

2.4. Identificação da celulose - Indireta

Por se apresentar em estado sólido e sua solubilização necessitar de reagentes específicos, fora realizada uma hidrólise ácida para analisar a presença, indiretamente, de celulose no Scoby da kombucha.

A hidrólise ácida consiste na degradação das cadeias poliméricas da celulose em

monômeros de glicose a partir da ação química da água em meio ácido (Figura 1). Essa etapa foi realizada com aquecimento em banho-maria e adição gradual de 13 mL de H_2SO_4 50% e 25 mL de H_2O deionizada sob agitação manual. Em decorrência dessa etapa reacional, realizou-se análises indiretas da presença de celulose em uma amostra, a partir da identificação qualitativa da glicose (ARAUJO *et al.*, 2013).

Figura 1. Reação de hidrólise ácida da celulose
Fonte: Acervo pessoal

2.4.1. Teste de Molisch

O teste de Molisch foi realizado identificando três tubos de ensaio, em um colocou-se dois 2 mL de água; 2 mL da solução proveniente da hidrólise da celulose bacteriana (CB); 2 mL da solução da celulose vegetal hidrolisada. Em seguida, adicionou-se 6 gotas de reagente de Molisch e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado em cada tubo e observou-se as mudanças ocorridas.

O teste é considerado positivo quando o carboidrato que está presente na solução forma um composto chamado de furfural (no caso de pentoses) ou hidroximetilfurfural (no caso de hexoses), em meio que contém α -naftol, formando um complexo de coloração violeta (Figura 2).

Figura 2. Reação de Molisch com glicose

2.4.2. Teste de Benedict

O teste de Benedict identifica a presença de açúcares redutores em um meio reduzindo o

Cu^{2+} em Cu^{1+} presente no reagente de Benedict, formando óxido cuproso que é laranja avermelhado (Figura 3). Essa reação ocorre com o carboidrato em sua forma linear devido a essa disposição apresentar o grupo aldeído, responsável pela extremidade redutora.

Figura 3. Reação de Benedict com glicose
Fonte: Acervo pessoal

Identificaram-se quatro tubos de ensaio, em seguida foram adicionados 1 mL de solução após hidrólise de celulose vegetal no tubo 1; no tubo 2 foi adicionado 1 mL de solução após hidrólise de CB; no tubo 3, 1 mL de solução de glicose 2% neutralizada; 2 mL de solução padrão de glicose no tubo 4. Todas as soluções provenientes da hidrólise foram neutralizadas para ocorrer a precipitação do CuO_2 . Adicionou-se 2 mL do reagente de Benedict em cada tubo. Os tubos foram aquecidos através de banho-maria e observou-se as mudanças ocorridas.

2.4.3. Identificação direta - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia de infravermelho é um método analítico que se baseia na absorção da radiação na região do infravermelho em comprimentos de ondas específicos para cada ligação química e grupo funcional, sendo possível determinar a estrutura química de amostras com auxílio de espectros de referência (PANTZE, 2006). Além de avaliar a coerência entre as ligações química da película da Kombucha e aquelas presentes na celulose padrão, é possível observar a eficácia dos tratamentos realizados para a remoção dos microrganismos e seus subprodutos.

Para esta análise, foram utilizadas as amostras da CB tratada com H_2O e CB tratada com NaOH . Cada amostra foi posicionada sob um cristal de diamante e pressionada, com a torre giratória de pressão, para maior contato da amostra e do cristal. A análise foi realizada nas instalações da UFABC – Campus Santo André.

2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi feita para a análise morfológica das fibras da celulose bacteriana e a influência dos tratamentos nessa. Os resultados obtidos foram obtidos utilizando o VEGA3 by TESCAN nas instalações do SENAI Mário Amato, em São Bernardo do Campo, São Paulo - SP. Todas alíquotas foram revestidas com uma fina camada de ouro antes da coleta das imagens.

2.6. Teste de retenção de microrganismos

Com a utilização da película de celulose no campo da biotecnologia e biomedicina, é imprescindível a realização de análises desta diante de suas propriedades antimicrobianas. Portanto, foi analisada a capacidade de retenção microbiológica da película de celulose bacteriana.

O teste tem início com a realização de três filtrações a vácuo de 10 mL de água contaminada utilizada como analito, usando as películas de celulose, submetidas a diferentes tratamentos (com água, NaOH e sem tratamento), como meio filtrante para o estabelecimento de um método comparativo.

Em seguida foi executada uma diluição seriada do analito filtrado, com o intuito de diminuir a quantidade de soluto em relação ao diluente. Pipetando 50µL para tubos do tipo falcon, foi ajustada a diluição das três soluções base em 1:600.

Na capela de fluxo laminar, foram transferidos 500µL das diluições finais, seguindo o procedimento de sistema pour plate em ágar padrão, para que tornasse possível a contagem das colônias para os cálculos do UFC (unidade formadora de colônia), demonstradas na figura 4, em cerca de 72 horas. Para melhor desenvolvimento bacteriano, as placas de petri ficaram na incubadora durante o período determinado a uma temperatura de 30°C.

Figura 4. Placa de Petri inoculada

2.7. Teste de Tração

Cortou-se as películas de celulose com os dois tratamentos realizados no formato do corpo de prova. Uma a uma, posicionou-se as amostras nas garras do equipamento fortemente. Calibrou-se o equipamento MÁQUINA DE ENSAIO KRATOS - TRCv61300 para tracionar na velocidade de 50 mm/min e iniciou-se o processo de tração até a amostra romper. A análise foi realizada nas instalações do SENAI Mário Amato.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.1. Comparação da produção celulósica

O desenvolvimento da película com a adição de outros microrganismos se mostrou superior morfológicamente à produção a partir bactéria isolada, isto deve-se, possivelmente, a interações interespecíficas que ocorrem entre as colônias de espécies diferentes presentes nos chás adicionados nas análises e antes ausentes (QUESADO; DOS SANTOS RIOS, 2009).

Este tipo de interação justifica também o fato da amostra submetida ao chá de kombucha ter seu desenvolvimento impulsionado, como demonstra a figura 5, visto que este tipo de chá possui maior quantidade de bactérias produtoras de celulose em conjunto.

Figura 5. Películas (A) adição de chá verde (B) adição de chá de kombucha

3.2. Identificação da bactéria *G. xylinus* na kombucha

O teste de Gram apresentou como resultado uma coloração avermelhada (Figura 6), constatando o resultado negativo, característico das bactérias que não apresentam uma espessa camada de peptidoglicano, classificadas como Gram negativas, assim como as bactérias fermentadoras da espécie *Gluconacetobacter xylinus*.

Figura 6. Avaliação microscópica da coloração de Gram (cor roxa)

O teste de catalase resultou na perceptível formação imediata de bolhas provenientes da liberação de oxigênio (Figura 7) evidenciando a presença da enzima *Hidroxiperoxidase* no metabolismo microbiano, assim podendo classificar as bactérias analisadas como catalase positiva. Aumentando a possibilidade de existir bactérias *Gluconacetobacter xylinus* na Kombucha.

Figura 7. Avaliação do teste de Catalase

3.3. Identificação da celulose - Métodos indiretos

3.3.1. Teste de Molish

Devido ao aparecimento da cor roxa no ensaio da celulose bacteriana, constatou-se que a presença de um carboidrato na amostra é positiva, portanto, subentende-se que é a glicose decorrente da hidrólise ácida da celulose presente no Scooby (Figura 8C). A CB apresentou aspectos de coloração mais fortes, quando comparada a celulose vegetal 95%,

devido a interferência dos resíduos presentes na Kombucha. Entretanto, a semelhança na coloração indica que o carboidrato presente em ambas amostras pode ser equivalente. (Figura 8B e C). A amostra contendo água foi analisada como um parâmetro de referência analítica e apresentou resultado negativo, o qual corrobora com o teste aplicado ao indicar a ausência de carboidrato (Figura 8A).

Figura 8. Análise indireta da celulose bacteriana a partir do teste de Molish. (A) água (B) celulose vegetal (C) celulose bacteriana

3.3.2. Teste de Benedict

As amostras avaliadas pelo teste de Benedict constatarem a presença de um carboidrato redutor nas alíquotas provenientes da hidrólise de celulose bacteriana e vegetal (Figura 9A; B). Sendo que, ao observar a disposição e os aspectos coloríficos da amostra de glicose padrão, pode-se apontar que o carboidrato redutor presente na amostra de CB é a glicose (Figura 9B; C; D). É importante ressaltar que o teste de Benedict é mais específico que o teste de Molish, pois apresenta uma seletividade substancial maior ao identificar apenas carboidratos redutores.

Figura 9. Teste de Benedict (A) celulose vegetal (B) celulose bacteriana (C) glicose neutralizada (D) glicose padrão

3.4. Identificação da celulose - Métodos diretos

3.4.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de FT-IR da CB tratada com NaOH e CB tratada com H₂O possibilitaram a observação de bandas de absorção referentes as ligações químicas presentes nas amostras. (Tabela 1).

Tabela 1. Comprimentos de onda e seus respectivos grupos funcionais exibidos pela celulose bacteriana em FT-IR

λ (cm ⁻¹)	Grupo Funcional
3345	O-H estiramento
2920	C-H estiramento
2897	C-H estiramento
2895	C-H estiramento
1536	N-H
1427	CH ₂
1365	CH ₂
1348	CH ₂
1161	C-O éter
1109	C-O éter alifático
1109	C-O álcool secundário
1056	C-O álcool primário

Fonte: Acervo pessoal

As ligações Carbono-Hidrogênio são de suma importância para a estrutura de um polímero, UI-Islam *et al.* (2011) investigaram a estrutura da CB pura, detalhando as bandas de absorção geradas pela ligação C-H e C-O-C, através do estiramento de C-H em 2896 cm⁻¹, deformação simétrica de CH em 1427 e 1371 cm⁻¹ e estiramento em 1035cm⁻¹, respectivamente.

Figura 10. Espectros de FT-IR; CB tratada com NaOH e CB tratada com água.

Sendo assim, os bandas de absorção encontradas em 2920/2897/2895 cm⁻¹ correspondentes aos estiramentos de ligação C-H, certamente indicam a presença de material de natureza alifática; 1427/1365/1348 cm⁻¹ são referentes a CH₂ que por se tratar de um polímero, apresenta diversas unidades repetidoras; 1161/1109/1056/1033 cm⁻¹ retratam uma faixa ampla que indica a presença de C-O característico do grupo funcional álcool primário/secundário e éter alifático, sendo este, responsável pela ligação glicosídica que forma a celulose (Figura 10).

Os dados obtidos corroboram com a literatura, onde DU *et al.* (2018) realizou a caracterização por FT-IR com CB produzida por *Gluconacetobacter xylinus* isolada e obteve picos de 3450 cm⁻¹, 2905 cm⁻¹, 1653 cm⁻¹, 1060 cm⁻¹, os quais representam, estiramento de OH, estiramento de CH, grupo carbonila (CO) de banda larga referente a glicose presente na amostra (a película não teve tratamento alcalino) e estiramento C-O-C (vibração forte), respectivamente.

Bandas referentes à nitrogênio, estruturas proteicas, ou possíveis contaminantes (1535, 1730-1735, 3150-3220) não foram exibidas, sendo indicativos de pureza nas amostras de CB, quando dispõe do tratamento alcalino responsável pela purificação ao remover células bacterianas e outros compostos orgânicos remanescentes do metabolismo celular dos microrganismos após fermentação do meio de cultivo (DUNBEY *et al.*, 2002).

Entretanto, o aparecimento da banda de absorção em 1536 cm⁻¹ (amidas) na CB purificada com água evidencia que o tratamento não foi totalmente eficiente perante a remoção dos subprodutos metabólicos do sistema (Figura 10). Devido a esse empecilho, faz-se necessário o ajuste de parâmetros e repetição de análises dessa metodologia envolvendo a água como agente químico purificador.

3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A partir das imagens obtidas por MEV, nota-se que a membrana de celulose bacteriana tratada com NaOH apresentou estrutura preservada, entretanto, consta com a disposição desorganizada das fibras que resulta na oclusão de parte dos poros (Figura 11C-D). A presença de impurezas na superfície da película da celulose indica que o tratamento alcalino para a remoção de colônias microbianas e subprodutos

de metabolismo não foi totalmente eficiente, entretanto, as partículas evidenciadas não apresentam características de células vivas, apenas de restos celulares entrelaçados com as fitas da celulose (Figura 11A-B).

Figura 11. Análise morfológica da celulose bacteriana tratada com hidróxido de sódio por MEV (A) Ampliação de 10.000x (B) Ampliação de 30.000x (C) Ampliação de 50.000x (D) Ampliação de 100.000x

A membrana de CB tratada com água exibiu uma estrutura com alta preservação, poros bem definidos e disposição linear das fitas das fibras celulósicas (Figura 12B-C). Com a substituição da solução alcalina por água deionizada, é possível visualizar a presença de partículas interferentes no material fibroso (Figura 12A).

Figura 12. Análise morfológica da celulose bacteriana tratada com água por MEV; (A) Ampliação de 10.000x (B) Ampliação de 30.000x (C) Ampliação de 50.000x

3.6. Teste de retenção de microrganismos

A filtração a vácuo, utilizando a água do rio contendo coliformes fecais e dispondo da película de celulose como meio filtrante, foi realizada com o intuito de investigar a capacidade do material desenvolvido perante a

retenção de microrganismos a partir do método Pour Plate. O estudo se assemelha aos fundamentos da microfiltração que consistem no processo que utiliza o gradiente de pressão com força motriz, junto a uma superfície permeável, visando a separação de partículas. Essa superfície consiste em uma membrana de barreira fina que dispõe do transporte seletivo entre solventes e solutos (LONGO et al., 2008; DEL COLLE, 2005). Segundo RIPPERGER e ALTMANN (2002), a microfiltração com membranas é relevante para a retenção microbiana nas áreas de ciências biológicas, da saúde e alimentícias.

Materiais poliméricos que apresentam alta biocompatibilidade são candidatos ideais para o desenvolvimento de matrizes que forneçam suporte às células, promovam sua diferenciação e proliferação e, consequentemente a formação de um novo tecido. As propriedades que propiciam condições ótimas para o material desenvolvido remetem a: rigidez mecânica; estrutura tridimensional que possa promover a interação máxima com as células e os fluidos corpóreos; nanoestrutura superficial que permita a adesão celular (ANTÔNIO et al., 2012). Diante as características, os polímeros naturais oferecem grande vantagem por serem similares às macromoléculas biológicas de reconhecimento pelo organismo e interação metabólica.

Por conta do alto potencial de aplicação na área biomédica, é imprescindível avaliar o comportamento da CB perante os microrganismos, sendo que sua retenção pode resultar na preservação do organismo a ação de agentes externos. Ademais, os polímeros naturais podem minimizar o estímulo à inflamação crônica ou reações imunológicas e toxicidade, as quais são frequentemente apresentadas com materiais sintéticos (HORNUNG, et al., 2006).

Os dados obtidos a partir do método de Pour Plate exibem que a CB produzida pelo metabolismo celular dos microrganismos presentes na kombucha é capaz de reter bactérias do meio. Com destaque para a CB tratada com H₂O que apresentou a maior eficiência no processo diminuindo em 82,87% a população microbiana. Seguido da CB tratada com NaOH, apresentando uma redução de 47,94% nas UFC/mL. A celulose bacteriana produzida neste trabalho tem um maior potencial de retenção microbiana do que o papel de filtro convencional utilizado como membrana de filtração, o qual exibiu um acúmulo de UFC/mL

de 42,45%. A amostra sem meio filtrante foi analisada por Pour Plate para a obtenção de um parâmetro inicial da quantidade total de microrganismos (Tabela 2 - Figura 13).

Tabela 2 - Retenção de microrganismos a partir de variantes no meio filtrante com água de córrego a partir do Método Pour Plate

Meio filtrante	Σ colônia por placas	$\bar{X}$ colônia	UFC/mL
CB tratada com H ₂ O	25	2,27	0,738 x 10 ⁵
CB tratada com NaOH	76	6,91	2,24 x 10 ⁵
Papel de filtro comum	84	7,64	2,48 x 10 ⁵
Água sem filtração	146	13,27	4,31 x 10 ⁵

Figura 13 - Retenção de microrganismos a partir de variantes no meio filtrante com água de córrego a partir do Método Pour Plate

A disparidade de colônias por placa das duas análises contendo celulose bacteriana se justifica pela ação química dos reagentes utilizados no processo de eliminação dos microrganismos provenientes do Soby da Kombucha, sendo que o NaOH é mais agressivo, em comparação a H₂O, à conformação estrutural das fibras da película. O tratamento alcali ocasiona o aumento da porosidade da celulose e reduz seu grau de polimerização e cristalinidade (ZHANG et al., 2012). Com isso, o transporte de partículas pela membrana ocorre com mais incidência, resultando em uma menor retenção microbiana.

Apesar das interferências ocasionadas pelo tratamento alcalino, observou-se um valor menor de UFC/mL nessa amostra quando comparada ao papel de filtro convencional e apresentou redução de aproximadamente 50% dos microrganismos do total inicial da água do córrego. Entretanto, é preciso analisar os fins aplicativos do material de acordo com as características necessárias para seu melhor desempenho, ou seja, a influência do NaOH na

porosidade da CB pode ser conveniente a determinados materiais.

3.5. Teste de tração

Os corpos de prova utilizados neste ensaio tinham dimensões de 0,8 mm de espessura e 6 mm de largura. É notória a diminuição da resistência da película de celulose após o tratamento com NaOH, sendo que em média a película perde cerca de 290g de força máxima aplicada (nas condições especificadas acima) e 6,0677 Kg/cm² de limite de resistência (Figura 14). Isso evidencia que o tratamento alcalino é mais agressivo à película, comprometendo características que podem ser úteis de acordo com a aplicação pretendida.

Figura 14 - Força máxima e limite de resistência

4. CONCLUSÕES:

A produção da celulose por meio do chá de Kombucha mostrou-se mais eficiente quanto a quantidade gerada quando comparada a produção com bactérias *Gluconacetobacter sp.* isolada em cultura pura. Verificamos que o tratamento realizado após a obtenção da celulose pode interferir diretamente em seus aspectos estruturais. O tratamento com NaOH revelou-se mais agressivo as estruturas das fibras, enquanto o tratamento com água proporciona melhor preservação o que interfere

diretamente na característica de reter células bacterianas na filtração e na capacidade de tração da mesma.

5. AGRADECIMENTOS:

Aos professores do SENAI Mário Amato, Cesar Augusto e Newton Saito, pela dedicação e auxílio nas análises realizadas de MEV e Tração.

Na UFABC – Campus Santo André, agradecemos ao Messias Cardoso Loiola e Matheus Gruppi Vital pela disponibilidade e auxílio nas análises em FT-IR. E a Janete Rocco Gruppi por disponibilizar a Kombucha.

6. REFERÊNCIAS

1. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial – ABDI. Caderno 2: Nota técnica papel e celulose: subsídios para a elaboração de uma estratégia industrial brasileira para a economia de baixo carbono. **2012**. Disponível em: <<http://www.abdi.com.br/Estudo/caderno%202020-0Papel%20e%20celulose.pdf>>.
2. Airoidi, C.; et al. A relevante potencialidade dos centros básicos nitrogenados disponíveis em polímeros inorgânicos e biopolímeros na remoção catiônica. *Química Nova*, **2008**.
3. Almeida, D. M., et al. Propriedades físicas, químicas e de barreira em filme formados por blenda de celulose bacteriana e fécula de batata. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 23, n. 4, p. 538-546, **2013**.
4. Antônio, R. et al. Produção de celulose bacteriana a partir de diferentes substratos. *Rev. Técnico Científica (IFSC)*, v. 3, n. 1, **2012**.
5. Araújo, R.; Goedert, W. J.; Pinto coelho lacerda, M., Qualidade de um solo sob diferentes usos e sob cerrado nativo. *Revista Brasileira de Ciência do solo*, v. 31, n. 5, **2007**.
6. Barreto M.; Mishelle M.; Soriano muñoz, J. M.; Síntesis y Estudio de Propiedades Celulosa Bacteriana Obtenida de Piña y Banano, Inoculados con kombucha. **2018**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidad de Guayaquil, Facultad de Ingeniería Química.
7. Donini, Í. A.; et al. Biosynthesis and recent advances in production of bacterial cellulose. *Eclética Química*, v. 35, n. 4, p. 165-178, **2010**.
8. Dunbey, V.; Saxena, C.; Singh, L.; Ramana, K. V.; Chauhan, R. S. Pervaporation of binary water-ethanol mixtures through bacterial cellulose membrane. *Separation Purification Technology*, v. 27, p. 163-171, **2002**.
9. EMBRAPA. Sistema de produção de vinagre. Rizzon L. A., Publicado em dezembro de **2006**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.
10. Holiman, P. CH; Hertog, M. G. L.; Katan, M. B. Analysis and health effects of flavonoids. *Food chemistry*, v. 57, n. 1, p. 43-46, **1996**.
11. Hornung, M. et al. Optimizing the Production of Bacterial Cellulose in Surface Culture: Evaluation of Substrate Mass Transfer Influences on the Bioreaction (Part 1) *Engineering Life Science*. 6 (6), 537–545, **2006**.
12. 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, **2014**.
13. Longo, E. et al. Processo de microfiltração tangencial para retenção de microrganismos em estruturas microporosas à base de (alfa)-alumina – prata metálica, mediante impregnação por solução portadora de nano-partículas de prata – ISP. Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), **2008**.
14. Nguyen, V. T., et al. Characterization of cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. *Current Microbiology*, v. 57, n. 5, p. 449, **2008**.
15. Pantze, A. Studeis of ester formation on a cellulose matrix. *Licentiate Thesis - Lulea University of Technoilogy*. Skelleftea, **2006**.
16. Pereira, C. G.; et al. Estudo de Novos Polímeros Biodegradáveis para a Aplicação no Segmento de Utilidades Domésticas. In: Congresso de Pesquisa e Extensão da Faculdade da Serra Gaúcha. **2013**.

17. Quesado, L. B.; SANTOS R., Elizabeth. Interações Ecológicas nos Livros Didáticos do Ensino Médio. Monografia de Pós-Graduação, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, **2009**.
18. Ripperger, S., Altmann, J., Crossflow microfiltration – state of the art, Separation and Purification Technology, 26 (**2002**) 1931.
19. Ul-Islam, M. *et al.* Effect of chitosan penetration on physico-chemical and mechanical properties of bacterial cellulose. Korean Journal of Chemical Engineering, v. 8, n. 28, **2011**.
20. Zhang, S. *et al.* Alkali Combined Extrusion Pretreatment of Corn Stover to Enhance Enzyme Saccharification. Industrial Crops and Products v. 37, **2012**.