

Caracterização de celulose bacteriana obtida em diferentes fontes de carbono

Characterization of bacterial cellulose obtained from different carbon sources

RESUMO

Rafaela Goltz
rafaelagoltz2@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Alessandra Cristine Novak
Sydney
alessandrac@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Com a crescente preocupação em cuidados com a pele, o interesse em produtos de origem mais natural vem se intensificando, sendo através da biotecnologia uma maneira de se atender à essas expectativas. Para a produção de máscaras faciais, um recurso já muito utilizado é a biocelulose produzida pelas bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, que foi enunciada pela primeira vez em 1886, por Adrian Brown. Neste trabalho, foi utilizado a bactéria *Gluconacetobacter hansenii* e o Caldo Alaban como meio de cultivo. O foco do estudo foi a alteração da fonte e quantidade de açúcar, optando-se por usar os açúcares cristal tradicional e orgânico, a fim de baratear o processo. A resposta objetivada era uma fina camada de biocelulose, que ainda assim possuísse resistência e capacidade de absorver compostos bioativos. As amostras foram analisadas qualitativamente. Dentro das expectativas, o melhor resultado obtido foi a biocelulose produzida a partir do açúcar orgânico, com a menor quantidade testada.

PALAVRAS-CHAVE: Biocelulose. *Gluconacetobacter*. Máscara Facial.

ABSTRACT

Nowadays, with the growing concern about skin care, the interest in more natural products has been intensified and through biotechnology it's a way to achieve these expectations. For the production of facial masks, a resource is already widely used, the biocellulose, it's produced by bacteria of the genera *Gluconacetobacter*, which was first described in 1886, by Adrian Brown. In this work, was used the *Gluconacetobacter hansenii* bacteria and the Alaban Broth has culture medium. The focus of this study was to change the source and quantity of sugar, opting to use traditional and organic crystal sugars, in order to make the process cheaper. The final objective, was a thin layer of biocellulose, that still had resistance and the ability to absorb bioactive compounds. The samples were analyzed qualitatively. Within expectations, the best result obtained was biocellulose produced from organic sugar, with the least amount tested.

KEYWORDS: Biocellulose. *Gluconacetobacter*. Facial Mask.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

A grande maioria da população está começando a se preocupar cada vez mais com auto cuidado, independentemente de sua idade ou gênero. E quando falamos do mercado responsável por esses cuidados estamos nos referindo ao setor de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos (HPPC), que para acompanhar esse aumento de consumo também vem crescendo a cada dia. No Brasil, no período de 2014 a 2019, o mercado de beleza cresceu mais de 10 milhões de dólares, segundo a Statista, agência provedora de dados no mercado (PANORAMA FARMACÊUTICO, 2019). Para se ter dimensão, esse valor representa o segundo lugar, ficando atrás apenas da China.

Contudo, aliada à tendência de cuidados, também vem sendo observada a preocupação do consumidor desse mercado em saber mais sobre seus produtos. Os resultados positivos que um determinado produto oferece não são mais suficientes, o consumidor se interessa também sobre a produção, como a composição do produto, quais as fontes e quem o produziu. Enfim, o consumidor está procurando produtos que agredam menos o meio ambiente e que sejam mais naturais (OLIVEIRA, 2015), sendo a oportunidade perfeita para o uso da biotecnologia.

Segundo a ONU, “biotecnologia significa qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica”. Então, quando falamos da mesma aplicada à área de cosméticos, podemos nos referir tanto aos compostos bioativos que podem ser extraídos de determinados processos biotecnológicos, como é o caso dos pigmentos betacaroteno e xantofilas extraídos de microalgas e utilizados em cosméticos para tratamento de pele (FONSECA, 2016), mas também de produtos finais desses processos, como é o caso da celulose. A celulose é o polímero natural mais abundante no planeta (AMORIM *et al.*, 2019), e pode ser oriundo tanto de plantas como de microrganismos. A celulose produzida por microrganismos apresenta uma grande vantagem em relação àquelas vindas de plantas: o processo de purificação. Enquanto a celulose sintetizada por plantas necessita de processos muito poluentes e complexos, as ditas bioceluloses requerem um processo de purificação mais simples (AMORIM *et al.*, 2019). Além disso, existem outras características da biocelulose que vêm chamado atenção: quando em contato com tecido vivo, a biocelulose não causa reações tóxicas ou imunológicas; alto grau de polimerização; baixa densidade; alta capacidade de absorção e retenção de água (GOTTSCALK *et al.*, 2013).

As bactérias do gênero *Gluconacetobacter* são as mais discutidas quando se trata de celulose bacteriana, visto que são as maiores produtoras. O primeiro estudo registrado foi feito por Adrian Brown, em 1886, onde ele observou a formação de uma camada gelatinosa na superfície da fermentação de vinagre (NASCIMENTO, 2015). Desde então, foram feitos muitos estudos sobre a mesma, devido principalmente tanto à sua versatilidade, pois pode ser aplicada tanto na área de alimentos, como em fármacos e cosméticos, como pelas características supracitadas.

Conforme se sabe, a fonte de carbono se torna muitas das vezes o limitante no processo de crescimento dos microrganismos, como também na produção de seus metabólitos. Um exemplo é na produção de goma xantana, onde cada fonte

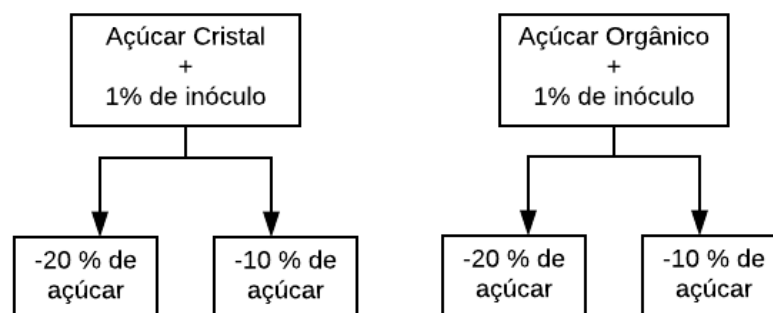
tem um efeito na qualidade e quantidade da goma (LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009). Já no caso das bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, a fonte de carbono é fundamental para a formação da biocelulose (TSOUKO *et al.*, 2015.). Devido a isso, buscar uma forma de diminuir seu preço afim de trazer maior viabilidade para o processo é essencial.

Assim, o objetivo deste trabalho é estudar fontes de carbono de fácil acesso e baixo custo, e o impacto da concentração das mesmas na produção da celulose pela bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, bem como caracterizá-la, para futura aplicação nas máscaras faciais da empresa de dermocosméticos Rihcerri.

MATERIAIS E MÉTODOS

A bactéria utilizada foi a *Gluconacetobacter hansenii*, que já se encontrava adaptada ao meio de cultura que será descrito a seguir. O laboratório D003 na UTFPR-PG foi utilizado durante este trabalho para a preparação do meio, autoclavagem e também na primeira etapa de armazenamento das culturas. O meio base utilizado foi o Caldo Alaban (ALABAN, 1962): 100 g L⁻¹ de sacarose, 5 g L⁻¹ de fosfato ácido de potássio; 2,5 g L⁻¹ de extrato de levedura; 0,2 g L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado; 0,6 g L⁻¹ de sulfato de amônio, diluídos em água destilada, e com base no mesmo foram feitas algumas variações. Foram testados diferentes tipos de açúcares (os dois da marca União, sendo um cristal tradicional, enquanto o outro, orgânico), quantidades de açúcar (-10% e -20% da quantidade utilizada no meio base). A quantidade de inóculo foi padronizada para 1% (v/v) da quantidade de meio utilizado. Sendo assim, foram delineados 4 testes (Figura 1).

Figura 1 – Variações do meio de cultivo estudadas.



Fonte: Autoria própria (2020).

Foi preparado o meio de cultivo tradicional, porém cada teste com o tipo e quantidade de açúcar indicado na Figura 1. A cada frasco foi adicionado 200 mL de meio de cultivo, que em seguida foram fechados com uma camada dupla de papel Kraft, conforme a Figura 2. Os meios de cultivo foram autoclavados por 15 minutos a 121°C.

Figura 2 – Meios de cultivo após autoclavagem



Fonte: Autoria própria (2020).

Após a autoclavagem, quando o meio de cultura já se encontrava em temperatura ambiente, foi inoculado, com a micropipeta, 2 mL de inóculo. Em seguida, foi colocado para crescimento e então foram observados os resultados de cada amostra, sendo que o esperado era uma fina camada de celulose, que ao mesmo tempo tivesse elasticidade e resistência, conforme indicado na Figura 3. Para cada um dos testes (quatro ao total) houveram duas etapas, cada uma com 5 amostras.

Figura 3 – Meios de cultivo após autoclavagem



Fonte: Adaptado de Éden Batista Duarte (2019).

No teste de capacidade de absorção de água (CAA), baseado na metodologia de Saibuatong e Phisalaphong (2010), a biomembrana liofilizada é imersa em água destilada e levada à estufa até o equilíbrio. Após, a biomembrana é removida da água e o excesso de água é retirado e, em seguida, pesada em balança analítica até peso constante. Assim, a capacidade de absorção é dada por:

$$CAA (\%) = \frac{W_h - W_d}{W_d} \times 100 \quad (1)$$

Sendo: W_h o peso da biomembrana hidratada e W_d o peso da biomembrana seca.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a inoculação, foi observado constantemente o desenvolvimento de cada amostra, e as conclusões foram obtidas a partir do crescimento da biocelulose e a resistência foi analisada qualitativamente.

Primeiramente, foram realizados os testes com o açúcar cristal em -10% e em -20%. Foi observado que, em todas as amostras, a biocelulose se formava muito rapidamente, sendo que nos primeiros 3 dias já era possível observar uma película de aproximadamente 7 mm. Após 7 dias da inoculação a biocelulose estava com uma espessura muito grande, chegando muitas vezes a 3 cm, assim como na Figura 4. Outro fator observado foi que quando o cultivo foi perturbado, a biocelulose se separou em duas, formando então duas películas. Contudo essas películas eram pouco resistentes. Isso demonstra a importância de se manter o cultivo estático, sem perturbações. Quanto à quantidade de açúcar testado, -10% e -20%, não foi possível observar diferenças entre os dois em relação à espessura da biomembrana formada.

Figura 4 – Películas de biocelulose com açúcar cristal a -10%.



Fonte: Autoria própria (2019).

Os testes seguintes foram realizados com o açúcar orgânico. A quantidade de -10% proporcionou um crescimento rápido, mas não tanto quanto os anteriores: com 7 dias, o cultivo apresentava uma película de biocelulose de 2 cm. Já quando foi testado -20% de açúcar, foi possível notar que a película de biocelulose formada era menor, o que, dentro das expectativas do trabalho, foi o melhor resultado,

visto que quando estava com 7 dias após inoculação a película estava entre 5 mm a 1 cm.

Conquanto, as bioceluloses ainda estavam espessas, longe do esperado, representado pela Figura 2. Deste modo, as culturas começaram a ser armazenadas no laboratório de Análise Sensorial, o qual mantém temperatura praticamente constante em 23°C. Com isso, a espessura da película obtida foi menor e também resistente ao toque, como apresentado na Figura 5. Foi o resultado que mais se assemelhou ao esperado, restando ainda alguns testes e ajustes a serem feitos.

Figura 5 – Película de biocelulose com açúcar orgânico a -20% e temperatura constante.



Fonte: Autoria própria (2019).

Quanto à resistência das bioceluloses, que como dito anteriormente foram analisadas qualitativamente, as bioceluloses cultivadas no meio com açúcar orgânico apresentaram resultados melhores em relação àquelas cultivadas no meio com açúcar cristal. A formação da biocelulose se dá através de três etapas: a primeira, em que acontece a polimerização de resíduos de glicose em cadeias β_{1-4} -glucana; a segunda em que ocorre a secreção extracelular das cadeias lineares; e a terceira quando ocorre a organização e cristalização das cadeias de glucanas, por ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals dispostas em tiras (DONINI *et al.*, 2010). Assim, pode-se dizer que nas amostras com açúcar cristal não houve uma formação adequada da estrutura tridimensional da biomembrana, levando à baixa resistência.

Sabe-se que no início da fermentação a concentração de bactéria aumenta, consumindo o oxigênio dissolvido e produzindo celulose em fase líquida, a qual é responsável por deixar o meio turvo. Contudo, após o oxigênio dissolvido findar, as bactérias que se encontram próximo à superfície são as únicas a continuar a produção de celulose (IGUCHI; YAMANAKA; BUDHIONO, 2000). Outro ponto importante, é que conforme a legislação brasileira, o açúcar cristal deve possuir a polarização, que representa a porcentagem de sacarose em torno de 99°Z (grau zucker), enquanto açúcares como o orgânico possuem em torno de 90°Z

(JAMBASSI, 2017), já que o açúcar cristal passa por processamentos, restando praticamente apenas sacarose. Isso pode explicar o fato de que as amostras com açúcar cristal obtiveram maiores espessuras da biocelulose, pois tiveram uma maior disponibilidade de sacarose no meio, já que não foi feita uma compensação da quantidade de sacarose colocada no meio, foi apenas adicionado as quantidades iguais dos dois açúcares.

Quanto ao teste de capacidade de absorção de água, no qual poderia se observar a capacidade da biocelulose como suporte aos bioativos para produção da máscara anti-idade da empresa Rihcerri, não foram realizados devido à pandemia do novo Coronavírus.

CONCLUSÃO

Dentro das expectativas do presente trabalho, foi possível observar que a celulose produzida pela bactéria *Gluconacetobacter hansenii* no meio de cultivo com açúcar orgânico a -20% da quantidade indicada no caldo Alaban, mostrou-se a melhor opção. Ainda, pode-se ressaltar a importância da temperatura constante no processo. Devido a finalidade desse trabalho ser para produção de máscaras com adição de bioativos, resalta-se a importância de realizar testes para a capacidade de absorção.

REFERÊNCIAS

ALABAN, C. A. Studies on the optimum conditions for "nata de coco" bacterium or "nata" formation in coconut water. **Philippine Agriculturist**, Laguna, v. 45, p. 490-516, 1962.

AMORIM, J. D. P. et al. Avaliação do potencial da celulose bacteriana para aplicação em cosméticos. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 18457–18462, 2019. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/337131600_Avaliacao_do_potencial_da_celulose_bacteriana_para_aplicacao_em_cosmeticos. Acesso em: 27 set. 2020.

BRASIL segue em crescimento no setor de saúde e beleza. [S. l.], 12 jul. 2019.

Disponível em: <https://panoramafarmaceutico.com.br/2019/07/12/brasil-segue-em-crescimento-no-setor-de-saude-e-beleza/> . Acesso em: 12 jun. 2020.

DONINI, I. A. N. et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclet. Quím.**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 165-178, 2010. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46702010000400021&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 19 jun. 2020.

DUARTE, É. B. et al. Celulose bacteriana: propriedades, meios fermentativos e aplicações. **Embrapa Agroindústria Tropical**, v. 186, p. 1–37, 2019. Disponível

em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1109174/celulose-bacteriana-propriedades-meios-fermentativos-e-aplicacoes>. Acesso em: 27 set. 2020.

FONSECA, J. A. **Aplicação de algas na indústria alimentar e farmacêutica.**

Orientador: Dra Carla Sousa e Silva. 2016. 75 p. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2016.

Disponível em: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/5827/1/PPG_29141.pdf. Acesso em: 27 set. 2020.

GOTTSCHALK, L.M.F. et al. Produção de celulose bacteriana pela cepa

Gluconacetobacter hansenii ATCC 1431 com diferentes fontes de nitrogênio. In: WORKSHOP DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO, 7., 2013, São Carlos. **Anais...** Rio de Janeiro: EMBRAPA 2013. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/964774/producao-de-celulose-bacteriana-pela-cep-gluconacetobacter-hansenii-atcc-1431-com-diferentes-fontes-de-nitrogenio>. Acesso em: 27 set. 2020.

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose – a masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**, v.35, n.2, p.261-270, 2000. Disponível

em: https://www.researchgate.net/publication/226468345_Bacterial_cellulose-a_masterpiece_of_nature's_arts. Acesso em: 27 set. 2020.

JAMBASSI, Jéssica Rodrigues. **Aspectos da qualidade do açúcar: impactos de diferentes condições de armazenamento e método de classificação por espectroscopia Raman.**

Orientador: Claudio Lima de Aguiar. 2017. Dissertação (Mestra em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017. Disponível em:

<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-16082017-152118/pt-br.php>. Acesso em: 27 set. 2020.

LUVIELMO, M.; SCAMPARINI, A. Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicação. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 5, n. 1, p. 50–

67, 2009. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Goma-xantana%3A-produ%C3%A7%C3%A3o%2C-recupera%C3%A7%C3%A3o%2C-propriedades-e-Luvielmo-Scamparini/172f64264bbd7c4a655ff5c61372634217667de5>

. Acesso em: 27 set. 2020.

NASCIMENTO, E.S. **Extrato de algaroba como fonte alternativa para produção de celulose bacteriana.**

Orientador: Morsyleide de Freitas Rosa. 2015. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1029427/extrato-de-algaroba-como-fonte-alternativa-para-producao-de-celulose-bacteriana>. Acesso em: 27 set. 2020.

OLIVEIRA, Priscilla. **Bem-estar: cresce a busca por cosméticos orgânicos e naturais**. [S. l.], 31 mar. 2015. Disponível em: <https://www.mundodomarketing.com.br/reportagens/mercado/33217/bem-estar-cresce-a-busca-por-cosmeticos-organicos-e-naturais.html>. Acesso em: 13 jun. 2020.

ONU, **Convenção de Biodiversidade 1992**, Art. 2.

SAIBUATONG, Ong-ard; PHISALAPHONG, Muenduen. Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 79, p. 455-460, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861709004949>. Acesso em: 27 set. 2020.

TSOUKO, E. et al. Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 14832–14849, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/279530521_Bacterial_Cellulose_Production_from_Industrial_Waste_and_by-Product_Streams. Acesso em: 27 set. 2020.