

Embalagem ativa a partir da funcionalização de biofilmes de celulose bacteriana

Active packaging based on the functionalization of bacterial cellulose biofilms

RESUMO

Larissa Gabrieli Stasiak
larissastasiak@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Samara Silva de Souza
samarasouza@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Gabriela Sperotto
gsperotto@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

João Pedro Maximino Gongora Godoi
jgodoi@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Naiana Cristine Gabiatti
naianagabiatti@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

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



A celulose é o polissacarídeo mais abundante na natureza. Amplamente empregada como biomaterial, a nanocelulose bacteriana diferencia-se da celulose vegetal por suas propriedades melhoradas, tais como morfologia nanométrica, alta capacidade de retenção de água, alto grau de polimerização, cristalinidade e ótimas propriedades mecânicas. A partir da funcionalização do biofilme, diversos produtos podem ser obtidos, um deles é a embalagem ativa. No presente trabalho, objetiva-se produzir e funcionalizar biofilmes de nanocelulose bacteriana a partir da modificação *in-situ* do meio de cultura com óleo essencial de cravo. Os biofilmes foram formados a partir do cultivo da cepa da bactéria *Komagataeibacter xylinus* ATCC® 53524, que foi cultivada em placas de 24 poços em meio Hestrin & Schramm (HS) e incubada em BOD a 30°C por 14 dias após a produção do pré-inóculo. Os resultados elucidados não garantiram a qualidade dos biofilmes modificados pelo método *in-situ*, o que requer trabalhos futuros para confirmar a funcionalização dos biofilmes produzidos.

PALAVRAS-CHAVE: Biomaterial. Óleo essencial. Nanocelulose.

ABSTRACT

Cellulose is the most abundant polysaccharide in nature. Widely used as a biomaterial, bacterial nanocellulose differs from plant cellulose by its improved properties such as nanometric morphology, high water holding capacity, high degree of polymerization, crystallinity and excellent mechanical properties. From the functionalization of the biofilm several products can be obtained, one of which is the active packaging. This work aims to produce and functionalize bacterial nanocellulose biofilms from the *in-situ* modification of the culture medium with essential clove oil. Biofilms were formed from the cultivation of the strain of bacterium *Komagataeibacter xylinus* ATCC® 53524™, which was cultivated in a 24-well plate in Hestrin & Schramm (HS) medium and incubated in BOD at 30°C for 14 days after the production of the pre-inoculum. The elucidated results did not guarantee the quality of biofilms modified by the *in-situ* method, which requires future work to confirm the functionalization of the biofilms produced.

KEYWORDS: Biomaterial. Essential oil. Nanocellulose.



INTRODUÇÃO

Encontrada na parede celular de vegetais, junto à lignina, pectina e hemicelulose, a celulose confere rigidez e estabilidade às plantas (DONINI et al., 2010). A celulose é grande objeto de estudo devido às diversas fontes alternativas de celulose na natureza e aos variados métodos de extração (SIQUEIRA; BRAS; DUFRESNE, 2010; HABIBI, 2014; ABITBOL et al., 2016; CHAKRABARTY; TERAMOTO, 2018). Dependendo do tipo de processamento utilizado, nanopartículas de celulose são formadas, o que aumenta ainda mais o campo de aplicação desse biomaterial.

Quando comparada à celulose vegetal, a nanocelulose bacteriana (NCB) diferencia-se por suas propriedades melhoradas, tais como morfologia nanométrica (CHEN; CHO; JIN, 2010), alta capacidade de retenção de água (SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010), alto grau de polimerização (DAHMAN; JAYASURIYA; KALIS, 2010), cristalinidade (ESA; TASIRIN; RAHMAN, 2014; MOHITE; PATIL, 2014) e ótimas propriedades mecânicas (BÄCKDAHL et al., 2006; CASTRO et al., 2011; HU et al., 2014), o que é conferido por meio de processos fermentativos de microrganismos, como as espécies *Gluconacetobacter*, *Komagataeibacter* e *Enterobacter* (JEREMIC et al., 2019).

Um dos microrganismos mais usados para a biossíntese de nanocelulose é a bactéria *K. xylinus*. Gram-negativa, quando em meio aeróbio, ela possui grande potencial de transformação de fonte de carbono, a glicose, em celulose. Além disso, a nanocelulose atua como uma barreira física com caráter higroscópico, que previne a desidratação e protege as bactérias de radiação ultravioleta (DONINI et al., 2010).

Os métodos de produção de NCB podem ser realizados em cultura dinâmica e estática. Em cultura agitada resulta em membranas assimétricas, de tamanhos variados ou esferas. Por outro lado, em cultura estática, os filmes são formados na interface ar/líquido, resultando em um filme regular (SILVA, 2017).

Tanto a cultura agitada, quanto a estática requerem um meio de cultura capaz de proporcionar o crescimento dos microrganismos produtores de nanocelulose. Comumente o cultivo das bactérias do gênero *K. xylinus* acontece em meio Hestrin & Shramm (HS), um meio de cultura definido que tem em sua formulação compostos como glicose, peptona, extrato de levedura, fosfato dissódico e ácido cítrico (CACICEDO et al., 2016).

Muitas são as modificações propostas tanto na formulação do meio de cultura quanto na matriz da NCB, que pode ser realizada durante a síntese (*in-situ*) ou após estar formado e purificado o biofilme (*ex-situ*), de modo que se obtenham resultados satisfatórios mediante às aplicações biotecnológicas requeridas (SILVA, 2017).

A modificação *in-situ* permite a formulação de compósitos por meio da difusão de materiais diretamente no meio de cultura durante a biossíntese, resultando em biofilmes com propriedades semelhantes às da substância incorporada (DONINI et al., 2010). Já a incorporação *ex-situ* destaca-se para aplicação de materiais exógenos diretamente na membrana purificada, evitando a degradação das substâncias durante os processos de purificação. É imprescindível, nesse processo, verificar a dimensão e polaridade das partículas, já que a nanocelulose apresenta

grande quantidade de grupos hidroxilas, que interagem melhor com substâncias de mesma polaridade (SHAH et al., 2013).

Em virtude da formação de microfibrilas de 20-100 nm de diâmetro, a NCB apresenta características mecânicas interessantes para o desenvolvimento de biomateriais com aplicações em áreas biotecnológicas, farmacêuticas, biomédicas e alimentícias (JEREMIC et al., 2019). Os biofilmes produzidos pelas bactérias apresentam, também, utilidade na formulação de embalagens ativas, quais têm a capacidade de, além de conter e proteger, aumentar o tempo de prateleira de um produto, a segurança e a qualidade, interagindo com o item de forma a garantir maior qualidade após o processo de embalagem (SILVA, 2017).

A formulação de filmes com potencial biotecnológico com a inclusão de óleo essencial permite obter uma embalagem com boas propriedades mecânicas, de transparência e de barreira ao vapor de água, que tem ainda, capacidade de liberação continuada de substâncias intrínsecas ao óleo essencial adicionado (ADEL et al., 2019).

Metabólitos secundários extraídos de plantas, os óleos essenciais apresentam uma composição variável conforme a espécie e região do vegetal. Os óleos são uma excelente alternativa na funcionalização de nanocelulose bacteriana. Por meio da incorporação nos biofilmes, os óleos conferem conservação indireta de produtos perecíveis, já que atuam como antimicrobianos e antioxidantes naturais. Além do mais, realçam o aroma característico de cada óleo essencial, sem a necessidade de inserção direta do conservante no próprio produto (ADEL et al., 2019).

O óleo de cravo-da-índia, composto majoritariamente por eugenol e β -cariofileno, tem efeito anti-inflamatório, anestésico, cicatrizante, antisséptico e ainda é amplamente empregado no tratamento de fungos e outros microrganismos, devido sua ação antimicrobiana (ALBUQUERQUE, 2019).

O mecanismo de ação antimicrobiana atua de modo que o eugenol tem a capacidade de permeabilizar a membrana citoplasmática, desestabilizando a célula, resultando na parada metabólica ou até mesmo a morte celular de bactérias. Em casos de fungos, ocorre a inibição da formação de hifas, impossibilitando a germinação dos mesmos. De tal modo, o óleo essencial de cravo-da-índia mostra-se eficiente na conservação de produtos perecíveis, que na dosagem correta, é capaz de inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis (ALBUQUERQUE, 2019).

MATERIAL E MÉTODOS

Os biofilmes foram formados a partir do cultivo da cepa da bactéria *Komagataeibacter xylinus* ATCC® 53524™, que foi cultivada em meio Hestrin & Schramm (HS). Para o preparo do meio de cultura foi utilizado glicose (20 g/L), peptona (5 g/L), extrato de levedura (5 g/L), fosfato dissódico (2,7 g/L) e ácido cítrico (1,15 g/L), sendo então ajustado o pH para a faixa de 6 a 6,5. A solução formada foi então autoclavada a 121°C por 20 minutos e armazenada em local fresco, de forma que a manipulação ocorreu apenas em câmara de fluxo laminar, de modo a garantir a esterilidade.

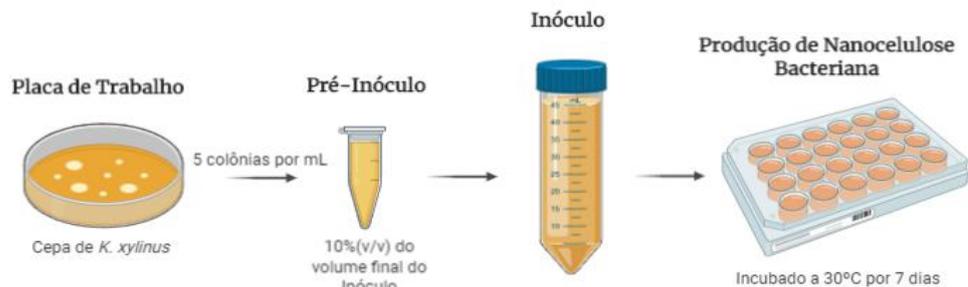
Na câmara de fluxo laminar, a reativação se deu a partir do descongelamento de uma alíquota de 1 mL de *K. xylinus* do estoque bacteriano, que foi transferido para um tubo de cultura contendo 4mL de meio HS. Após homogeneizado, 100 µL foram transferidos para uma placa com ágar, denominada placa de manutenção. Todo o material foi levado para a estufa incubadora BOD a 30°C por 7 dias.

Verificado o crescimento bacteriano, e formação de biofilme no meio líquido após o período de incubação, preparou-se um inóculo com um volume maior, numa proporção de 10% (v/v) do inóculo inicial. Após 7 dias a 30°C na BOD, a cultura foi homogeneizada e 800µL foram transferidos para tubos de eppendorfs contendo 200µL de glicerol esterilizado. Ainda no fluxo laminar, as alíquotas foram homogeneizadas e armazenadas em freezer para a manutenção do estoque.

Para a obtenção das placas de trabalho, preparou-se um inóculo com a proporção de 5 colônias, da placa de manutenção, para cada 1 mL de meio HS. Após homogeneizado, 100 µL do inóculo foram transferidos para cada placa com meio HS, sendo então incubadas em estufa BOD a 30°C por 7 dias. Verificado o crescimento, as placas de trabalho foram armazenadas em geladeira.

Os biofilmes foram produzidos em placas de 24 poços, a partir de um pré-inóculo baseado na proporção de 30 colônias da placa de trabalho a cada 6 mL de meio HS, por um período total de 7 dias a 30°C na BOD, como pode ser observado na Figura 1. Para a purificação, os biofilmes foram acondicionados em um béquer contendo uma solução 0,1 M de hidróxido de sódio por 24 horas a 50°C, de modo a garantir a remoção das bactérias presentes na rede de nanocelulose. De forma a neutralizar o pH dos biofilmes, eles foram lavados sete vezes com água deionizada e então seguiram para autoclave durante 15 minutos numa temperatura de 121°C.

Figura 1 – Esquema de Produção de Nanocelulose Bacteriana em placa de 24 poços



Fonte: Autoria Própria (2020)

Baseado no método de modificação *in-situ* da NCB, duas alternativas foram propostas objetivando a incorporação do óleo essencial de cravo nos biofilmes durante a biossíntese. A primeira utilizou-se do cultivo estático em uma placa de 24 poços. Na qual, a placa foi dividida em colunas de controle (C), óleo essencial de cravo (OE) e mistura de OEC e etanol na relação 1:1 (OE+E). Posteriormente, a placa permaneceu em incubadora BOD a 30°C por 7 dias, em cultivo estático. Ao final desse período, os biofilmes formados foram purificados e seguiram para processo de análise de incorporação.

A concentração e tempo de cultivo foram determinados ao longo da placa. De modo que na segunda e terceira colunas as soluções (com concentração de 1%) foram adicionadas após 48h de crescimento em BOD a 30°C. Após 72h do início do crescimento, o mesmo processo repetiu-se para os poços da quarta e quinta colunas. Já para a última coluna da placa, após 48h de cultivo foram adicionadas

as soluções numa concentração de 0,5%. Por fim, os biofilmes foram purificados e seguiram para autoclave, de modo a garantir a esterilidade.

A segunda alternativa evidenciou a biossíntese de nanocelulose de acordo com uma metodologia adaptada de Żywicka e colaboradores (ŻYWICKA et al., 2018). Em um Erlenmeyer de 50mL, preparou-se um meio de crescimento com volume total de 20mL, sendo a composição baseada em 10% de inóculo e 1% da emulsão 1:1 de óleo essencial de cravo e álcool etílico absoluto. Posteriormente, o ensaio permaneceu em incubadora BOD a 30°C por 7 dias, em cultivo estático (ŻYWICKA et al., 2018). Ao final desse processo, os biofilmes formados foram purificados e seguiram para a análise de incorporação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme esperado, quando concluído o período de sete dias de crescimento bacteriano em incubadora BOD a 30°C, a placa de reativação apresentava um grande volume de colônias de bactérias (Figura 2) e o pré-inóculo já havia um espesso biofilme formado (Figura 3).

Figura 2 - Placa de reativação



Fonte: Autoria Própria (2020)

Figura 3 - Pré-inóculo a partir de reativação em meio líquido

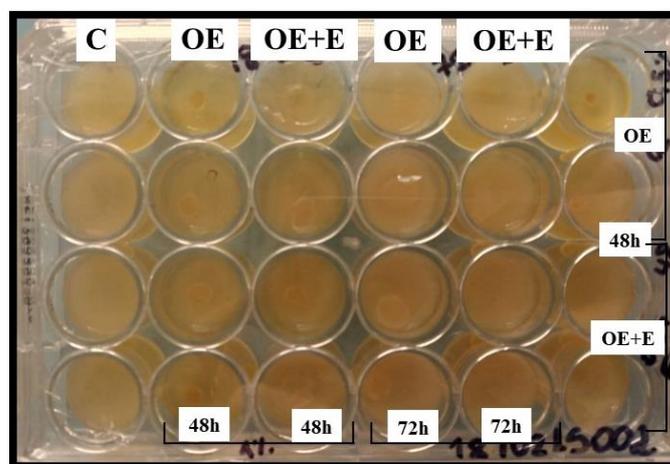


Fonte: Autoria Própria (2020)

Os biofilmes de nanocelulose bacteriana foram produzidos conjuntamente às soluções de incorporação *in-situ*, de modo que o mesmo processo de produção e purificação foi empregado tanto para as membranas de controle quanto para as modificadas.

Dos resultados obtidos, a incorporação do óleo essencial de cravo, pelo método *in-situ*, não se mostrou eficiente no período analisado. Como é notório na Figura 4, pontuais gotículas de óleo ficaram concentradas sobre o biofilme, de modo que ao retirar as membranas do meio de crescimento, foi nítido que não houve a formação de uma única fase e nem foi possível obter a incorporação de óleo nos biofilmes.

Figura 4 - Placa de 24 poços após o cultivo de 7 dias em BOD a 30°C



Fonte: Autoria Própria (2020)

De acordo com Lindman e colaboradores (LINDMAN; KARLSTRÖM; STIGSSON, 2010), os resultados obtidos na tentativa de incorporação do óleo essencial nos biofilmes de NCB pelo método *in-situ*, confirmam a sua característica anfifílica, já que possui fortes ligações de hidrogênio entre as moléculas de celulose que a constitui.

Com o intuito de facilitar o processo de incorporação à matriz, pesquisadores relataram o emprego de emulsões de óleo essencial e Triton™ X-100 aplicadas durante a biossíntese dos biofilmes, tendo como resultado filmes com poros uniformes ao longo da superfície (HU et al., 2014).

Por fim, devido a suspensão das aulas devido a pandemia do Covid-19, a segunda alternativa de incorporação *in-situ* do óleo essencial de cravo aos biofilmes, não chegou a ser realizada.

Entretanto, como Żywicka e colaboradores (ŻYWICKA et al., 2018) demonstraram que o uso de Erlenmeyer propicia um aumento significativo no rendimento da produção de NCB, em virtude da diminuição na fricção entre a nanocelulose e a parede inclinada do Erlenmeyer.

Espera-se, portanto que ao utilizar metodologia semelhante a de Żywicka e colaboradores (ŻYWICKA et al., 2018), a biossíntese de NCB tenha um melhor rendimento, além de possibilitar a incorporação *in-situ* do óleo essencial de cravo nos biofilmes de nanocelulose bacteriana.

CONCLUSÃO

O presente trabalho foi capaz de atingir alguns dos objetivos propostos como a propagação, estoque e reativação de cepa bacteriana, preparações de meios e reagentes necessários para produção e purificação dos biofilmes, preparação de placas de trabalho, definição de parâmetros ótimos, tipo de cultura (estática) e tempo de cultivo, crescimento dos biofilmes e esterilização. Entretanto, com resultados ainda iniciais, não foi possível avaliar todas as estratégias de funcionalização de biofilmes de nanocelulose bacteriana para embalagens, sendo necessário testes futuros que comprovem a eficácia dos métodos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UTFPR pelo apoio à pesquisa, pelos laboratórios e equipamentos disponíveis. Agradeço a Prof^ª Dr^ª Naiana Cristine Gabiatti e Prof^ª Dr^ª Paula Fernandes Montanher pela colaboração com o fornecimento de materiais para o presente trabalho. Finalmente, agradeço indefinidamente à Prof^ª Dr^ª Samara Silva de Souza pela orientação no projeto.

REFERÊNCIAS

ABITBOL, T. et al. Nanocellulose, a tiny fiber with huge applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 76–88, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2016.01.002>.

ADEL, A. M. et al. Inclusion complex of clove oil with chitosan/ β -cyclodextrin citrate/oxidized nanocellulose biocomposite for active food packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 20, p. 100307, jun. 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214289418301637>. Acesso em: 21 ago. 2019.

ALBUQUERQUE, R. M. B. **Biodegradável À Base De Celulose Bacteriana (Cb) E Polihidroxibutirato (Phb) para Aplicação Como Embalagem Ativa Biodegradável À Base De Celulose Bacteriana (Cb) E Polihidroxibutirato (Phb) Para Aplicação Como Embalagem Ativa**. 2019. Universidade Católica de Pernambuco, 2019. Disponível em: http://tede2.unicap.br:8080/bitstream/tede/1112/5/rodrigo_melo_bezerra_albuquerque.pdf.

BÄCKDAHL, H. et al. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 2141–2149, mar. 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961205009993>.

CACICEDO, M. L. et al. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 172–180, ago. 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852416302085>. Acesso em: 24 ago. 2019.

CASTRO, C. et al. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 96–102, 11 fev. 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861710008854>.

CHAKRABARTY, A.; TERAMOTO, Y. Recent advances in nanocellulose composites with polymers: A guide for choosing partners and how to incorporate them. **Polymers**, v. 10, n. 5, 2018.

CHEN, P.; CHO, S. Y.; JIN, H.-J. Modification and applications of bacterial celluloses in polymer science. **Macromolecular Research**, v. 18, n. 4, p. 309–320, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13233-010-0404-5>.

DAHMAN, Y.; JAYASURIYA, K. E.; KALIS, M. Potential of Biocellulose Nanofibers Production from Agricultural Renewable Resources: Preliminary Study. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 6, p. 1647–1659, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-010-8946-8>.

DONINI, Í. A. N. et al. BIOSÍNTESE E RECENTES AVANÇOS NA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA. **Eclética Química Journal**. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-46702010000400021>. Acesso em: 24 ago. 2019.

ESA, F.; TASIRIN, S. M.; RAHMAN, N. A. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 113–119, 2014.

HABIBI, Y. Key advances in the chemical modification of nanocelluloses. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 5, p. 1519–1542, 2014.

HU, W. et al. Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1043–1060, 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861713010047>.

JEREMIC, S. et al. Production of bacterial nanocellulose (BNC) and its application as a solid support in transition metal catalysed cross-coupling reactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 351–360, maio 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813018349213>. Acesso em: 24 ago. 2019.

LINDMAN, B.; KARLSTRÖM, G.; STIGSSON, L. On the mechanism of dissolution of cellulose. **Journal of Molecular Liquids**, v. 156, n. 1, p. 76–81, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2010.04.016>.

MOHITE, B. V.; PATIL, S. V. A novel biomaterial: bacterial cellulose and its new era applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 101–110, 1 mar. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/bab.1148>.

SAIBUATONG, O.; PHISALAPHONG, M. Novo aloe vera–bacterial cellulose composite film from biosynthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 455–460, jan. 2010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861709004949>. Acesso em: 24 ago. 2019.

SHAH, N. et al. Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1585–1598, nov. 2013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861713007996>. Acesso em: 24 ago. 2019.

SILVA, G. B. S. da. **Desenvolvimento E Caracterização De Membranas De Celulose Bacteriana Visando Aplicação Em Embalagens Ativas**. 2017. Disponível em: https://www.univille.edu.br/account/mep/VirtualDisk.html/downloadDirect/1246117/Dissertacao_Final_Giulia_Bressan_Soratto_da_Silva.pdf.

SIQUEIRA, G.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Cellulosic bionanocomposites: A review of preparation, properties and applications. **Polymers**, v. 2, n. 4, p. 728–765, 2010.

ŻYWICKA, A. et al. Bacterial cellulose yield increased over 500% by supplementation of medium with vegetable oil. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.126>. Acesso em: 18 abr. 2020.