



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

# Embalagem ativa de celulose bacteriana incorporada com extrato fluido de orégano

## *Active bacterial cellulose packaging incorporated with fluid extract of oregano*

Larissa Gabrieli Stasiak Vezentin\*, Samara Silva de Souza<sup>†</sup>,  
Gabriela Sperotto<sup>‡</sup>, João Pedro Maximino Gongora Godoi<sup>§</sup>, Naiana Cristine Gabiatti<sup>¶</sup>,  
Paula Fernandes Montanher<sup>‡</sup>

### RESUMO

Embalagens bioativas são uma alternativa à diminuição de desperdício de alimentos. A partir da funcionalização de biofilmes de celulose bacteriana é possível obter uma embalagem capaz de liberar compostos antioxidantes e antimicrobianos que aumentam o tempo de prateleira do produto e garantem o consumo de um produto embalado saudável. Os biofilmes foram obtidos pelo crescimento de bactérias da espécie *K. xylinus* ATCC® 53524 em meio HS, a 30°C durante 10 dias após a produção do pré-inóculo. O processo de incorporação do Extrato Fluido de Orégano (Bianquímica®) ocorreu após a purificação dos biofilmes produzidos, a fim de testar as melhores condições para maior absorção do extrato. Após cada processo, os biofilmes produzidos passaram pela análise de peso úmido e peso seco, e posterior análise de capacidade de retenção de água. Os resultados da pesquisa demonstram que os biofilmes incorporados por via úmida têm maiores valores de peso médio do que aqueles obtidos por via seca. Logo, para uma aplicação onde deseja-se que a substância incorporada à celulose bacteriana migre para o produto, é mais viável optar por uma incorporação via úmida.

**Palavras-chave:** Biofilme, Extrato, Orégano, Celulose Bacteriana

### ABSTRACT

Bioactive packaging is an alternative to reducing food waste. From the functionalization of bacterial cellulose biofilms it is possible to obtain a package that releases antioxidant and antimicrobial compounds that increase the shelf life of the product and ensure a healthy consumption of the packaged product. Biofilms were obtained by *K. xylinus* ATCC® 53524 growth in HS medium at 30°C for 10 days after the production of the pre-inoculum. The process of incorporation of the Fluid Extract of Oregano (Bianquímica®) occurred after the purification of the produced biofilms in order to test the best conditions for greater absorption of the extract. After each process, the produced biofilms were subjected to wet and dry weight analysis and subsequent analysis of water holding capacity. The research results demonstrate that the biofilms incorporated by the wet method have average weight values higher than those obtained by the dry method. Therefore, for an application in which it is desired that a substance incorporated in bacterial cellulose migrates to the product, it is more feasible to present it by wet incorporation.

**Keywords:** Biofilm, Extract, Oregano, Bacterial Cellulose

\* Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; [larissastasiak@alunos.utfpr.edu.br](mailto:larissastasiak@alunos.utfpr.edu.br)

<sup>†</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos; [samarasouza@utfpr.edu.br](mailto:samarasouza@utfpr.edu.br)

<sup>‡</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; [gsperotto@alunos.utfpr.edu.br](mailto:gsperotto@alunos.utfpr.edu.br)

<sup>§</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; [jgodoi@alunos.utfpr.edu.br](mailto:jgodoi@alunos.utfpr.edu.br)

<sup>¶</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; [naianagabiatti@utfpr.edu.br](mailto:naianagabiatti@utfpr.edu.br)

<sup>‡</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; [paulamontanher@utfpr.edu.br](mailto:paulamontanher@utfpr.edu.br)



## 1 INTRODUÇÃO

O desperdício de alimentos é um problema global, que tem impactos socioambientais consideráveis. Estima-se que cerca de 17% dos alimentos disponíveis para o consumo são desperdiçados (BRASIL, 2021). Em virtude disso, surge o questionamento: existem alternativas tecnológicas capazes de reduzir esse percentual? A resposta é sim! E é nesse cenário que surge a aplicação das embalagens bioativas.

Essas embalagens são compostas de polímeros de origem biológica e tem a capacidade de fornecer um aumento no tempo de prateleira do produto e o fornecimento de um alimento embalado mais saudável, através da interação com o alimento, por meio da liberação de compostos antioxidantes e antimicrobianos que têm a capacidade de aumentar a segurança e a qualidade alimentar. Diversas alternativas vêm sendo aplicadas para o desenvolvimento das embalagens bioativas, dentre elas é possível destacar a utilização de incorporação de compostos bioativos, tais como antioxidantes, proteínas, vitaminas e lipídeos (ALMEIDA et al., 2015; ALBUQUERQUE, 2019).

Os extratos fluidos são compostos bioativos obtidos por infusão e destilação de matérias primas, de fontes naturais, em água e álcool etílico. Dentre os extratos utilizados, é possível destacar o de orégano, que tem ação antioxidante, devido à elevada concentração de vitamina A e carotenos, e antimicrobiana em virtude da presença de carvacrol e timol (BIANQUIMICA, 2021).

Além dos compostos bioativos, é válido fornecer uma matéria prima de fonte biológica para a produção da embalagem. É nesse contexto que surge a celulose bacteriana (CB). Produzida pelo mecanismo de biossíntese de microrganismos das espécies *Gluconacetobacter*, *Komagataeibacter* e *Enterobacter* (JEREMIC et al., 2019), a CB apresenta ótimas propriedades mecânicas (CASTRO et al., 2011; HU, 2014), morfologia nanométrica (CHEN; CHO; JIN, 2010), alto grau de polimerização e cristalinidade (MOHITE; PATIL, 2014) e alta capacidade de retenção de água (SAIBUATONG; PHISALAPHONG, 2010).

A produção dos biofilmes se dá por um mecanismo natural de conversão de uma fonte de carbono em celulose para a formação de uma barreira física com caráter higroscópico, que previne a desidratação e protege as bactérias de radiação ultravioleta (DONINI et al., 2010). A configuração do biofilme é alterada de acordo com o tipo de meio de cultura utilizado (SPEROTTO et al., 2021) e a adoção de uma cultura dinâmica ou estática. A diferença consiste na obtenção de biofilmes assimétricos e simétricos, respectivamente (ALBUQUERQUE, 2019).

Outro fator relevante é a funcionalização dos biofilmes produzidos, que pode acontecer pela incorporação de substâncias externas na matriz durante a biossíntese (*in-situ*) ou após a formação e purificação do biofilme (*ex-situ*). A escolha pelo método de funcionalização deve ser tomada a partir das características finais desejadas do biofilme (ALBUQUERQUE, 2019).

Devido as importantes propriedades do extrato fluido e fatores ligados a elevada demanda por produtos alimentícios com orégano, o presente projeto visa produzir uma embalagem bioativa de celulose bacteriana incorporada com extrato fluido de orégano que viabilize sua aplicação em laticínios, focando primeiramente em filmes para a intercalação de queijos fatiados, de modo a conferir sabor e aroma de orégano e permitir o aumento no tempo de prateleira do produto, por meio da ação antimicrobiana e antioxidante.

## 2 MÉTODO

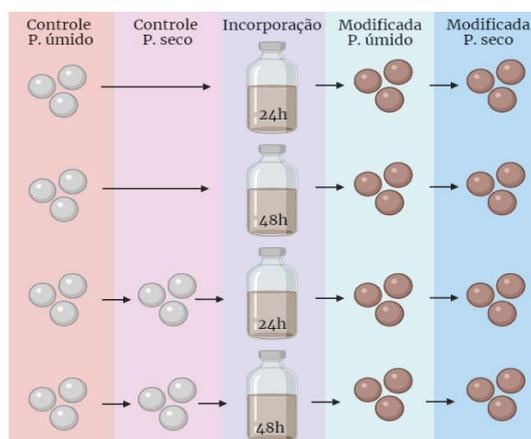
A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Dois Vizinhos. A pesquisa se insere em uma das metas do projeto NanoCel – Desenvolvimento de Plataformas de Nanocelulose Bacteriana.

Foi realizado o cultivo de *Komagataeibacter xylinus* ATCC® 53524™, em meio HS (HESTRIN; SCHRAMM, 1954). Essa cepa bacteriana foi reativada em câmara de fluxo laminar e o processo se deu pelo descongelamento de uma alíquota de 1 mL de *K. xylinus* do estoque bacteriano, que foi transferido para um tubo de cultura contendo 4 mL de meio HS. Após homogeneizado, 100 µL foram transferidos para uma placa com ágar, denominada placa de manutenção e mantida em incubadora BOD a 30°C por 7 dias. Para a obtenção das placas de trabalho, preparou-se um pré-inóculo a partir da placa de manutenção. 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. A produção de inóculo se baseou em 10% (v/v) de pré-inóculo preparado (usando a proporção de 5 colônias da placa de trabalho a cada 1 mL de meio HS) e o restante foi completado com meio HS. Esse inóculo foi distribuído nas placas de 24 poços e incubado por um período total de 3 dias a 30°C na BOD.

Os biofilmes produzidos passaram por um processo de purificação, de modo a eliminar as bactérias que permaneceram nas fibras. Os biofilmes foram mantidos em solução 0,1 M de hidróxido de sódio por 24 horas a 50°C, e em seguida foram lavados com água destilada (sete substituições de água a cada 15 minutos de permanência na estufa a 50°C), e submetidos à autoclave a 121°C por 20 minutos. Os biofilmes purificados foram pesados e tiveram seus valores registrados para análise de peso úmido e peso seco. Após a purificação, os biofilmes foram submetidos a uma modificação *ex-situ*, em dois diferentes tempos de exposição da celulose ao extrato (24h e 48h), tanto para os biofilmes úmidos, quanto para os secos.

A modificação da celulose bacteriana se baseou na incorporação de extrato fluido de orégano (Bianquímica®). Para o experimento, 20 mL de extrato foram acondicionados em quatro frascos de vidro. Em cada um, foram adicionados os biofilmes e após o tempo de exposição no extrato, foi novamente realizada a análise de peso úmido e peso seco de cada um dos biofilmes (Fig. 1).

**Figura 1 - Esquema de modificação e análise de Peso seco e Peso úmido dos biofilmes de celulose bacteriana.**



**Fonte: Autoria própria (2021)**

Para a análise de Peso úmido foi realizada a pesagem dos biofilmes (repetições de 12 biofilmes em cada condição de modificação) em balança analítica após a retirada do excesso de água presente nos biofilmes. Os valores de peso úmido dos biofilmes pré e pós-incorporação foram registrados. Em seguida, o material foi transferido para estufa a 50°C por cerca de cinco horas, até completa secagem. Após desidratados, os biofilmes foram pesados e os valores de peso seco dos biofilmes pré e pós-incorporação foram registrados. Por fim, registrados os valores de peso seco e peso úmido, foi possível realizar a análise de capacidade de retenção de água, do inglês *Water holding capacity* (WHC) através da fórmula de Shezad et al. (2010), representada pela Eq. 1.

$$\text{Capacidade de retenção de água (WHC)} = \frac{\text{Massa de água removida durante a secagem (g)}}{\text{Peso seco da amostra de celulose bacteriana (g)}} \quad (1)$$

A partir da Equação 1, é possível comparar a capacidade de reter água de cada uma das amostras, que dependendo da aplicabilidade, deve apresentar um WHC maior ou menor.

### 3 RESULTADOS

A placa de reativação apresentou um grande volume de colônias de bactérias e o pré-inóculo apresentou a formação de um espesso biofilme ao final do período de incubação de sete dias. Após a primeira reativação, foram produzidas as placas de manutenção e de trabalho. O cultivo de *K. xylinus* resultou na produção de 48 biofilmes, que após purificados, foram submetidos ao processo de modificação da nanocelulose, conforme mostrado no esquema da Fig. 1, resultando em amostras com diferentes massas. A Tabela 1 apresenta os valores de peso úmido e seco para cada uma das condições, controle e modificada (24h e 48h).

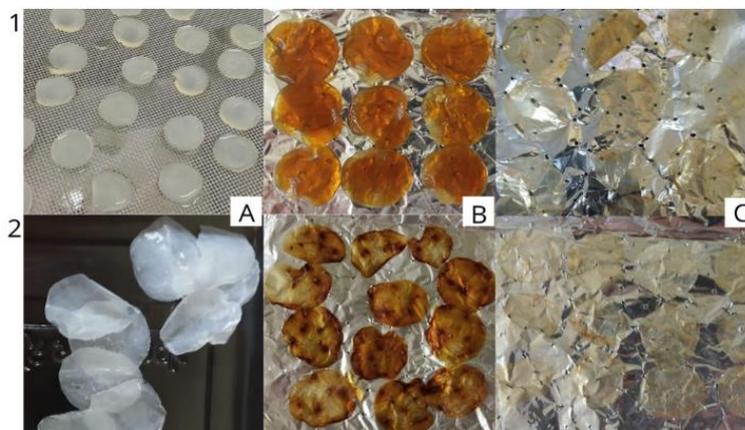
**Tabela 1 - Média das massas e capacidade de retenção de água dos biofilmes pré e pós modificação**

| Biofilmes                     | $\bar{X}$ Peso úmido (g) | $\bar{X}$ Peso seco (g) | WHC (%) |
|-------------------------------|--------------------------|-------------------------|---------|
| Controle (para análise úmida) | 0,2302 ± 0,0536          | -                       | -       |
| Modificada 24h (úmida)        | 0,1969 ± 0,0566          | 0,0182 ± 0,0029         | 15,07   |
| Modificada 48h (úmida)        | 0,2899 ± 0,0360          | 0,0182 ± 0,0020         | 14,93   |
| Controle (para análise seca)  | 0,1868 ± 0,0228          | 0,0023 ± 0,0002         | 82,02   |
| Modificada 24h (seca)         | 0,0086 ± 0,0028          | 0,0025 ± 0,0003         | 2,51    |
| Modificada 48h (seca)         | 0,0079 ± 0,0014          | 0,0025 ± 0,0004         | 2,16    |

Fonte: Autoria própria (2021)

Os resultados apresentados na Tabela 1, mostram uma diferença expressiva entre os biofilmes que foram submetidos ao processo de incorporação enquanto ainda úmidos (análise úmida), e aqueles que passaram primeiramente pelo processo de secagem (análise seca).

**Figura 2 - Principais Biofilmes obtidos no processo de produção e modificação de celulose bacteriana. Biofilmes hidratados (1) e secos (2) para as condições de controle (A), análise úmida (B) e análise seca (C).**



Fonte: Autoria própria (2021)



É evidente que mesmo após a secagem dos biofilmes de análise úmida mantiveram maiores massas do que os de análise seca. A diferença entre os biofilmes pode ser observada pela Fig. 2, em que dispõe os biofilmes obtidos em cada um dos processos de secagem.

#### 4 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos foi possível verificar que as características dos biofilmes variam de acordo com o processo escolhido. Isso é determinante nas propriedades do material, uma vez que esses biofilmes podem ser usados em diversas áreas com o intuito ou não de liberar as propriedades provenientes do extrato fluido de orégano usado. Devido a pandemia pelo COVID-19 e dificuldades para realização das atividades de pesquisa não foi possível avançar com os testes de caracterização dos biofilmes e avaliação da aplicabilidade. Pretende-se caracterizar os biofilmes e realizar análises de antioxidantes para avaliar o potencial desse biofilme como embalagem de intercalação de fatias de queijo. Além de proporcionar um sabor diferenciado, acredita-se que as propriedades antioxidantes e antimicrobianas do extrato possam permear o produto e conceder um maior tempo de prateleira ao produto, atuando diretamente na redução do desperdício de alimentos.

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Dois Vizinhos, pelo suporte analítico na realização deste trabalho. Aos colegas do grupo de pesquisa, às professoras Naiana Gabiatti e Paula Montanher pelas contribuições, e à Professora Dr<sup>a</sup> Samara Silva de Souza pela orientação da pesquisa.

#### REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, Rodrigo Melo Bezerra de. **Desenvolvimento de uma blenda biodegradável à base de celulose bacteriana (CB) e polihidroxibutirato (PHB) para aplicação como embalagem ativa para alimentos**. 2019. 131 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Desenvolvimento em Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2019.
- ALMEIDA, Ana Carolina Sergio; FRANCO, Elisângela Aparecida Nazário; FRANCO, Elisângela Aparecida Nazário; PESSANHA, Kênia Letícia Ferreira; MELO, Nathália Ramos. Aplicação de nanotecnologia em embalagens de alimentos. **Polímeros**, Rio de Janeiro, v. 25, p. 89-97, ago. 2015. BIANQUIMICA (São Paulo). **Extrato Fluido De Orégano - Com 200ml**. Disponível em: <https://bianquimica.com.br/item/Extrato-Fluido-De-Oregano-%252d--Com-200ml.html>. Acesso em: 02 set. 2021.
- BRASIL. Roberta Zandonai. Programa das Nações Unidas Para O Meio Ambiente (ed.). **ONU: 17% de todos os alimentos disponíveis para consumo são desperdiçados. 17% de todos os alimentos disponíveis para consumo são desperdiçados**. 2021. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/114718-onu-17-de-todos-os-alimentos-disponiveis-para-consumo-sao-desperdicados>. Acesso em: 02 set. 2021.
- CASTRO, Cristina; ZULUAGA, Robin; PUTAUX, Jean-Luc; CARO, Gloria; MONDRAGON, Iñaki; GAÑÁN, Piedad. Structural characterization of bacterial cellulose produced by



- Gluconacetobacter swingsii sp. from Colombian agroindustrial wastes. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 96-102, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.072>.
- CHEN, Peng; CHO, Se Youn; JIN, Hyoung-Joon. Modification and applications of bacterial celluloses in polymer science. **Macromolecular Research**, v. 18, n. 4, p. 309-320, abr. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13233-010-0404-5>.
- DONINI, Igor A. N.; SALVI, Denise T. B. de; FUKUMOTO, Fabiana K.; LUSTRI, Wilton R.; BARUD, Hernane S.; MARCHETTO, Reinaldo; MESSADDEQ, Younes; RIBEIRO, Sidney J. L.. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v. 35, n. 4, p. 165-178, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-46702010000400021>.
- HESTRIN, S.; SCHRAMM, M.. Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose\*. **Biochemical Journal**, v. 58, n. 2, p. 345-352, 1 out. 1954. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bj0580345>.
- HU, Weili; CHEN, Shiyang; YANG, Jingxuan; LI, Zhe; WANG, Huaping. Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1043-1060, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.102>.
- JEREMIC, Sanja; DJOKIC, Lidija; AJDAČIĆ, Vladimir; BOŽINOVIĆ, Nina; PAVLOVIC, Vladimir; MANOJLOVIĆ, Dragan D.; BABU, Ramesh; SENTHAMARAIKANNAN, Ramsankar; ROJAS, Orlando; OPSENICA, Igor. 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. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.154>.
- MOHITE, Bhavna V.; PATIL, Satish V.. A novel biomaterial: bacterial cellulose and its new era applications. **Biotechnology And Applied Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 101-110, 4 fev. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bab.1148>.
- SAIBUATONG, Ong-Ard; PHISALAPHONG, Muenduen. Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 455-460, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.039>.
- SHEZAD, O., KHAN, S., KHAN, T., PARK, J. K. Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simple fed-batch cultivation strategy. **Carbohydrate**. 2010
- SPEROTTO, Gabriela; STASIAK, Larissa Gabrieli; GODOI, João Pedro Maximino Gongora; GABIATTI, Naiana Cristine; SOUZA, Samara Silva de. A review of culture media for bacterial cellulose production: complex, chemically defined and minimal media modulations. **Cellulose**, v. 28, n. 5, p. 2649-2673, 16 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10570-021-03754-5>.