



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**  
**CAMPUS DE LARANJEIRAS DO SUL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

**MARRIÊ LOUISE CAVALLI**

**CARACTERIZAÇÃO E EXTRAÇÃO DE FILMES DE CELULOSE BACTERIANA A**  
**PARTIR DO *SCOPY* DA KOMBUCHA**

**LARANJEIRAS DO SUL**

**2022**

**MARRIÊ LOUISE CAVALLI**

**CARACTERIZAÇÃO E EXTRAÇÃO DE FILMES DE CELULOSE BACTERIANA A  
PARTIR DO *SCOBY* DA KOMBUCHA**

Dissertação de mestrado, apresentada para o Programa de Pós - Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Bergler Bitencourt

Co-orientador(a): Dra. Cátia Tavares dos Passos Francisco

LARANJEIRAS DO SUL

2022

MARRIÊ LOUISE CAVALLI

**CARACTERIZAÇÃO E EXTRAÇÃO DE FILMES DE CELULOSE  
BACTERIANA A PARTIR DO SCOPY DA KOMBUCHA**

Dissertação de mestrado, apresentada para o Programa de Pós - Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

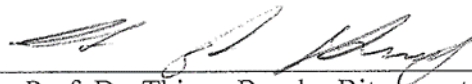
Orientador: Prof. Dr. Thiago Bergler Bitencourt.

Co-orientador(a): Dra. Cátia Tavares dos Passos Francisco.

Esta dissertação de mestrado foi defendida e aprovada pela banca em:

29/07/2022

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Thiago Bergler Bitencourt - UFFS  
Orientador



Prof. Dra. Cátia Tavares dos Passos Francisco - UFFS  
Co-orientadora



Prof. Dra. Gisele Louro Peres - UFFS  
Membro



Prof. Dra. Vânia Zanella Pinto - UFFS

Membro

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu gostaria de agradecer ao meu paizinho Oxalá, minha mãezinha Iansã e minha mãezinha Oxum, por toda a força, discernimento, tranquilidade, paz e direcionamentos que me transmitiram durante essa etapa, todo o aprendizado foi válido. Agradeço também a todos os Orixás que me deram força durante esse processo, meu pai Ogum, pai Oxóssi, pai Xangô e todos os Orixás, obrigada por todos os ensinamentos e força que me deram em cada etapa. Um agradecimento especial a dona Maria Padilha, que me ajudou em muitos momentos de escrita. Agradeço ao meu Pai espiritual, Gabriel Batista Maia, por todas as escutas, conselhos, puxões de orelhas (rs) e por todas as vezes que me levantou nesta fase, só você soube o quão difícil foram os acontecimentos durante todo esse processo, meu pai.

Meu maior agradecimento, em terra, vai para a minha mãe. Mãe, à você devo tudo que sou hoje, tudo que tenho e onde estou chegando agora, te amo mais do que qualquer coisa. Agradeço também, aos meus avós, que são extremamente importantes para mim e me trouxeram muita força, acalento e carinho durante esse processo, amo vocês, meus nonos. Agradeço ao Sondey e a Geraldina, pela suporte dado. Agradeço a toda minha família que de alguma forma me ajudou e esteve presente durante esse período: Yuna, André, Isabela, tia Lucila, minha madrinha Gisele e ao Gion, tio Pelé, tia Pida, Neu, Maiara, Juninho e todos os demais familiares. Agradeço também aos entes queridos que se foram durante esse processo, em especial, ao meu primo-irmão Dani, não foi nada fácil perder você durante esse período (cuida da gente aí de cima, gordão! Te amo). Não poderia deixar de agradecer aos meus pets: meu cachorro, Santista, que me acompanha a 17 anos, e minha gata, Pantufa, que chegou durante o mestrado para me trazer muitas alegrias, vocês me trouxeram muito conforto e força em momentos difíceis dessa etapa. Essa conquista é de todos vocês!

Agradeço aos meus amigos e todas as pessoas especiais que estão presentes em minha vida: Aline Machado, que tem sido uma das minhas bases fortes, Paulinha (obrigada por todas as conversas, cafés e chopps velhinhoos, te amo), Tiemi e Milena (minhas maiores conexões, em termos de amizade, amo vocês demais), Tiaguinho (meu melhor amigo que me ajudou muito com escuta, conselhos, conversas e bom humor hahaha, te amo bee), Carol (amizade de longa data, amo você), Karina e Pamela (obrigada pelas conversas e puxões de orelhas que de alguma forma influenciaram no andamento do mestrado, amo vocês viadinhos!), Carol e Paty

que trouxeram muitas risadas e momentos de descontração para aliviar o stress. Obrigada por toda a ajuda, força e suporte que me deram.

Agradeço ao meu orientador, professor Thiago, por lá no início ter aceitado entrar nesse barco comigo e ter comprado a minha ideia, obrigada por ter confiado e apostado em mim, por toda a orientação, correções, dúvidas que retirou e força que passou neste período. À minha co-orientadora, professora Cátia, que foi extremamente importante, com suas correções, observações e pontos levantados, obrigada por ter aceitado entrar nesse barco também e por ter me ouvido, antes mesmo de ingressar no mestrado. Agradeço a todos os professores que me deram aula durante o mestrado e que, de alguma forma, me trouxeram estímulo para seguir em busca desse sonho: professora Eduarda, professora Leda, professor Luciano, professor Ricardo. Um agradecimento mais do que especial para a professora Vânia, como eu sempre cito para os meus amigos, 50% desse mestrado devo à ti, pois lá no início, ainda enquanto estava fazendo uma matéria em turma especial, veio, conversou comigo, acreditou no meu potencial, puxou minha orelha para fazer a inscrição (rs) e segue até hoje me dando suporte, inclusive nas análises realizadas, obrigada por ter aceitado participar da minha banca e por tudo que me ajudou durante esse período. Agradeço também, a professora Gisele, por ter aceitado o convite de participar da banca.

Agradeço aos meus colegas de turma, que estavam presentes nas aulas, passando os mesmos perrengues que eu, e entendendo como ninguém, como era estar cursando o mestrado: Alana, Fran, Bruna, Alvino, vocês trouxeram alegria e deixaram o processo mais leve. Agradeço as conexões e vínculos criados a partir do mestrado, pessoal do Pará, essa parte é pra vocês: Camila, Ellen, Parazinho, obrigada pelos chopps, shows e momentos de descontração e conversa.

Agradeço à toda Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, por toda a estrutura disponibilizada para o desenvolvimento da pesquisa e do mestrado, como um todo, a todos os colaboradores presentes nela: Luana, que sempre esteve de prontidão para ajudar com as documentações, aos técnicos dos laboratórios Edmilson, Marcelo, Silvias e Marli, e também à Raquel e ao David, que me ajudaram muito nessa reta final de escrita e análises, com interpretação de resultados, correndo amostras, enfim, em boa parte do processo prático. Aos seguranças, que mesmo quando eu chegava de madrugada ou saía de madrugada, estavam lá de bom humor, para conversar, ajudar com alguma palavra, entregar chaves e cuidar dos laboratórios. Obrigada à todos.

Por fim, agradeço a Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, em especial ao C-LABMU e seu responsável, professor Sidnei, pelas análises realizadas, e todos os técnicos que contribuíram com a execução das mesmas, Vanessa, Hudson e Douglas.

Enfim, agradeço a todos por toda a força, ensinamentos, ajudas, conversas, puxões de orelhas e palavras transmitidas, que de alguma forma me ajudaram a chegar ao final dessa etapa. Todos os citados, tiveram, de alguma forma, alguma importância e peso durante esse processo. Um imenso obrigado e muita gratidão por ter vencido essa batalha.

## RESUMO

A celulose pode ser obtida de plantas, microrganismos ou representantes do filo *Chordata*. A sua obtenção em grandes quantidades e a busca por fontes alternativas de produção vem sendo largamente estudadas. Partindo deste ponto, a presente dissertação tem por objetivo extrair celulose bacteriana a partir do *SCOBY* da kombucha e caracterizá-la. O *SCOBY* é um consórcio microbiano, constituído por bactérias e leveduras capazes de produzir celulose. A metodologia encontra-se dividida em duas fases. Para a produção dos chás utilizados na kombucha, em ambas as fases, utilizou-se 20 g de chá verde, em infusão em 2 L de água fervente, por 10 minutos, sendo adicionado ao final 100 g de açúcar cristal. Na primeira fase, para a obtenção da celulose bacteriana, realizou-se o processo fermentativo utilizando *SCOBY* de fermentação pré-existente. A cada 14 dias o *SCOBY* filho formado era retirado e submetido à processo de branqueamento. Para o processo de branqueamento, utilizou-se hipoclorito de sódio (NaClO) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Na primeira fase, foram realizadas 10 fermentações, com 10 processos de branqueamento diferentes, tendo quantidade de NaClO variando entre 50 mL e 500 mL e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> variando entre 100 mL e 500 mL. Para a caracterização dos filmes obtidos, avaliou-se o rendimento de celulose bacteriana em percentual e em massa, correlacionando aos aspectos visuais como conformação, maleabilidade, integridade e coloração dos mesmos, no qual, o melhor resultado obtido foi no branqueamento 5, com rendimento de 20,97% e 68,76 g de celulose extraídos. Além disso, fez-se, também, as análises de FT-IR e DSC, buscando verificar a eficiência do processo de branqueamento e de extração da celulose. Na segunda fase, com base nos resultados obtidos na primeira fase, realizou-se padronização do início da fermentação a partir de um inóculo, a espessura de retirada dos filmes de tal processo entre 5-6 mm e a quantidade de NaClO e H<sub>2</sub>O adicionados no processo de branqueamento em 500 mL/300 mL, além do estudo de duas variáveis: quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizado no branqueamento e temperatura de secagem dos filmes. Foram realizados 4 processos fermentativos, com 4 processos de branqueamentos e temperaturas de secagem diferentes. Para a caracterização dos filmes, realizou-se análise de rendimento em percentual e massa, observando os aspectos visuais como conformação, integridade e maleabilidade, na qual, o melhor resultado obtido foi na amostra 2 com extração de 15,72% e 44,46 g de celulose. Além disso, fez-se as análises instrumentais de DSC, FT-IR, DRX e MEV, visando avaliar a pureza do material obtido, obtendo melhor resultado na amostra 4. E as análises de cor instrumental, grau de intumescimento e permeabilidade ao

vapor de água, pensando em futuras aplicações comerciais, com melhor resultado obtido na amostra 3. Concluiu-se que, dependendo de para qual finalidade a celulose bacteriana será extraída: alta quantidade/rendimento, aplicação comercial ou alta pureza, variam-se os parâmetros utilizados no processo de branqueamento e secagem.

**Palavras-chave:** Biocelulose. Biopolímeros. Branqueamento. Celulose microbiana. Peróxido de hidrogênio.



## ABSTRACT

Cellulose can be obtained from plants, microorganisms or representatives of the phylum Chordata. Its obtainment in large quantities and the search for alternative sources of production have been widely studied. Starting from this point, the present dissertation aims to extract bacterial cellulose from the SCOBY of kombucha and characterize it. SCOBY is a microbial consortium, consisting of bacteria and yeasts capable of producing cellulose. The methodology is divided into two phases. For the production of teas used in kombucha, in both phases, 20 g of green tea was infused in 2 L of boiling water for 10 minutes, with 100 g of crystal sugar being added at the end. In the first phase, to obtain bacterial cellulose, the fermentation process was carried out using SCOBY of pre-existing fermentation. Every 14 days, the formed son SCOBY was removed and submitted to the bleaching process. For the bleaching process, sodium hypochlorite (NaClO) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were used. In the first phase, 10 fermentations were carried out, with 10 different bleaching processes, with the amount of NaClO varying between 50 mL and 500 mL and of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varying between 100 mL and 500 mL. For the characterization of the films obtained, the bacterial cellulose yield in percentage and in mass was evaluated, correlating to visual aspects such as conformation, malleability, integrity and coloration of the same, in which the best result was obtained in bleaching 5, with yield of 20.97% and 68.76 g of cellulose extracted. In addition, FT-IR and DSC analyzes were also carried out, seeking to verify the efficiency of the bleaching and pulp extraction process. In the second phase, based on the results obtained in the first phase, the standardization of the beginning of fermentation was carried out from an inoculum, the thickness of the films removed from such a process between 5-6 mm and the amount of NaClO and H<sub>2</sub>O added in the bleaching process at 500 mL/300 mL, in addition to the study of two variables: amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> used in bleaching and drying temperature of the films. 4 fermentation processes were carried out, with 4 bleaching processes and different drying temperatures. For the characterization of the films, analysis of yield in percentage and mass was carried out, observing visual aspects such as conformation, integrity and malleability, in which the best result was obtained in sample 2 with extraction of 15.72% and 44.46 g of cellulose. In addition, instrumental analyzes of DSC, FT-IR, DRX and SEM were performed, aiming to evaluate the purity of the material obtained, obtaining better results in sample 4. And the analysis of instrumental color, degree of swelling and permeability to vapor of water, thinking about future commercial applications, with better results obtained in

sample 3. It was concluded that, depending on what purpose the bacterial cellulose will be extracted: high quantity/yield, commercial application or high purity, the parameters used in the bleaching and drying process.

**Keywords:** Biocellulose. Biopolymers. Bleaching. Microbial Cellulose. Hydrogen Peroxide.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 – Polímeros de condensação-adição e sua estrutura baseada na química orgânica.....  | 21 |
| Figura 2 – Estrutura química da celulose.....  | 21 |
| Figura 3 – Estrutura molecular da celulose com destaque para o anel aromático da macromolécula de fenilpropano.....                                | 23 |
| Figura 4 – Processo de conversão da celulose.....  | 24 |
| Figura 5 – Microrganismos presentes no SCOBY ( <i>Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts</i> ).....  | 34 |
| Figura 6 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de SCOBY contendo <i>Acetobacter</i> e <i>Saccharomyces</i> dentro da matriz de celulose..... | 35 |
| Figura 7 – Peças de vestuário produzidas a partir do SCOBY da kombucha.....  | 43 |
| Figura 8 – Fluxograma das etapas realizadas na primeira fase.....  | 45 |
| Figura 9 – Fluxograma das etapas realizadas na segunda fase.....   | 48 |
| Figura 10 – Imagem da amostra “branqueamento 4”, quantidade de NaClO adicionada atingiu 500 mL.....  | 57 |
| Figura 11 – Imagem da amostra “branqueamento 5” logo após adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....  | 58 |
| Figura 12 – Imagem da amostra “branqueamento 5” ao final do processo de branqueamento.....   | 58 |
| Figura 13 – Imagem da amostra “branqueamento 9”, secagem à 50°C em filme com espessura maior.....  | 59 |
| Figura 14 – Imagem da amostra “branqueamento 10”, secagem à 50°C em filme de espessura menor.....  | 60 |
| Figura 15 – Imagem da amostra “branqueamento 7”, secagem à 40°C.....   | 60 |
| Figura 16 – Espectro de infravermelho, amostras secas à 30°C.....  | 61 |
| Figura 17 – Espectro de infravermelho, amostras secas à 45°C.....  | 62 |
| Figura 18 – Espectro de infravermelho, amostras secas à 40°C.....  | 62 |
| Figura 19 – Espectro de infravermelho, amostras secas à 50°C.....  | 63 |
| Figura 20 – Curva de DSC referente a faixa de temperatura 0°C a 450°C.....   | 65 |
| Figura 21 – Curva de DSC referente as amostras secas à 30°C.....   | 66 |
| Figura 22 – Curva de DSC referente as amostras secas à 45°C.....   | 66 |
| Figura 23 – Curvas de DSC referente as amostras secas à 40°C.....  | 67 |
| Figura 24 – Curvas de DSC referente as amostras secas à 50°C.....  | 68 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 25 – Imagem dos filmes amostra 1 e amostra 2.....                                    | 70 |
| Figura 26 – Imagem dos filmes amostra 3 e amostra 4.....                                    | 70 |
| Figura 27 – Curva de perda de água, em massa, após a análise de grau de intumescimento...76 |    |
| Figura 28 – Espectros de infravermelho referente as amostras 1 a 4.....                     | 78 |
| Figura 29 – Curva de DSC das amostras 1 à 4.....  | 81 |
| Figura 30 – Difratoograma da amostra 1.....   | 83 |
| Figura 31 – Difratoograma da amostra 2.....   | 83 |
| Figura 32 – Difratoograma da amostra 3.....   | 84 |
| Figura 33 – Difratoograma da amostra 4.....   | 84 |
| Figura 34 – Micrografias das amostras 1 a 4 com aumento de 50x a 99x.....                   | 87 |
| Figura 35 – Micrografias das amostras 1 a 4 com aumento de 100x a 499x.....                 | 87 |
| Figura 36 – Micrografias das amostras 1 a 4 com aumento de 500x a 1kx.....                  | 88 |
| Figura 37 – Micrografias das amostras 1 a 4 com aumento de 2kx a 5kx.....                   | 89 |
| Figura 38 – Micrografias das amostras 1 a 4 com aumento de 10kx a 30kx.....                 | 90 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Quadro 1 – Comparativo entre as propriedades da celulose vegetal e celulose bacteriana.....   | 25 |
| Tabela 1 - Dados do processo de branqueamento – primeira fase.....  | 47 |
| Tabela 2 - Tempo e temperatura de secagem testados na primeira fase.....  | 48 |
| Tabela 3 – Delineamento experimental 2 <sup>2</sup> realizado na segunda fase.....  | 49 |
| Tabela 4 - Dados do processo de branqueamento.....  | 50 |
| Tabela 5 - Rendimento final de celulose em massa (g) e percentual (%)......   | 55 |
| Tabela 6 - Espessura dos filmes, rendimento final de celulose em massa (g) e percentual (%).....  | 69 |
| Tabela 7 - Resultados da análise de cor instrumental em escala CIELAB.....  | 72 |
| Tabela 8 - Resultados da análise de grau de intumescimento ( <i>Q</i> ).....  | 74 |
| Tabela 9 - Resultados da análise de permeabilidade ao vapor de água (PVA) (g.mm.m <sup>2</sup> .dia <sup>-1</sup> .kPa <sup>-1</sup> )..... | 77 |
| Tabela 10 – Índice de cristalinidade (%) das amostras 1 a 4.....  | 85 |

## SUMÁRIO

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>1.</b>    | <b>INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>2.</b>    | <b>OBJETIVOS.....</b>  | <b>18</b> |
| 2.1          | OBJETIVO GERAL.....  | 18        |
| 2.2          | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 18        |
| <b>3.</b>    | <b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>  | <b>19</b> |
| 3.1          | BIOPOLÍMEROS.....  | 19        |
| 3.2          | CELULOSE.....  | 22        |
| 3.3          | CELULOSE BACTERIANA.....   | 25        |
| 3.4          | KOMBUCHA.....  | 29        |
| 3.5          | SCOBY ( <i>Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts</i> ).....                               | 32        |
| 3.6          | PROCESSO DE BRANQUEAMENTO DA CELULOSE.....   | 37        |
| 3.7          | APLICAÇÕES COMERCIAIS - CELULOSE BACTERIANA E SCOBY.....                                     | 39        |
| <b>4.</b>    | <b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>  | <b>44</b> |
| 4.1          | MATERIAIS.....   | 44        |
| 4.1          | METODOLOGIA - PRIMEIRA FASE.....   | 44        |
| <b>4.2.1</b> | <b>Produção dos chás e processo fermentativo da kombucha.....</b>                            | <b>45</b> |
| <b>4.2.2</b> | <b>Obtenção dos filmes de celulose bacteriana.....</b>                                       | <b>46</b> |
| 4.3          | METODOLOGIA - SEGUNDA FASE.....  | 48        |
| <b>4.3.1</b> | <b>Produção dos inóculos e processo fermentativo.....</b>                                    | <b>49</b> |
| <b>4.3.2</b> | <b>Obtenção dos filmes de celulose bacteriana.....</b>                                       | <b>50</b> |
| 4.4          | CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE CELULOSE.....   | 50        |
| <b>4.4.1</b> | <b>Rendimento de celulose bacteriana correlacionado aos aspectos visuais dos filmes.....</b> | <b>51</b> |
| <b>4.4.2</b> | <b>Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier – FT-IR.....</b>              | <b>51</b> |
| <b>4.4.3</b> | <b>Calorimetria diferencial de varredura - DSC.....</b>                                      | <b>51</b> |
| <b>4.4.4</b> | <b>Análise de cor instrumental.....</b>  | <b>52</b> |
| <b>4.4.5</b> | <b>Grau de intumescimento (Q).....</b>   | <b>52</b> |
| <b>4.4.6</b> | <b>Permeabilidade ao vapor de água.....</b>  | <b>52</b> |
| <b>4.4.7</b> | <b>Difração por raios X - DRX.....</b>   | <b>53</b> |
| <b>4.4.8</b> | <b>Microscopia eletrônica de varredura - MEV.....</b>  | <b>53</b> |
| 4.5          | ANÁLISE ESTATÍSTICA.....   | 54        |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>5.</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>  | <b>55</b> |
| 5.1       | PRIMEIRA FASE.....  | 55        |
| 5.1.1     | Rendimento de celulose bacteriana correlacionado aos aspectos visuais dos filmes..... | 55        |
| 5.1.2     | Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier – FT-IR.....              | 61        |
| 5.1.3     | Calorimetria diferencial de varredura - DSC.....                                      | 65        |
| 5.2       | SEGUNDA FASE.....   | 68        |
| 5.2.1     | Rendimento de celulose bacteriana e aspectos visuais filmes.....                      | 68        |
| 5.2.2     | Análise de cor instrumental.....  | 72        |
| 5.2.3     | Grau de intumescimento (Q).....   | 74        |
| 5.2.4     | Permeabilidade ao vapor de água.....  | 76        |
| 5.2.5     | Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier – FT-IR.....              | 77        |
| 5.2.6     | Calorimetria diferencial de varredura - DSC.....                                      | 80        |
| 5.2.7     | Difração por raios X - DRX.....   | 82        |
| 5.2.8     | Microscopia eletrônica de varredura - MEV.....  | 86        |
| <b>6.</b> | <b>CONCLUSÃO.....</b>   | <b>92</b> |
|           | <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>95</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Polímero é um tipo de material formado pela repetição de macromoléculas, nas quais, ocorre a união de diversos monômeros através de ligações cruzadas e da reação de polimerização. Podem ser classificados quanto a sua ocorrência, sendo divididos em: sintéticos, também conhecidos como plásticos e, naturais. Os principais polímeros sintéticos existentes são as poliaminas (PA), polisulfonas (OS), policarbonatos, o polietileno (PE) e o polipropileno (PP). Já os polímeros naturais, também chamados de biopolímeros, são aqueles encontrados na natureza. Dentre eles podemos citar as proteínas, polinucleotídeos, polissacarídeos, gomas e a celulose (BASSETTI; PERES; PETRUS, 2003; BEDOR *et al.*, 2020; ROCHA *et al.*, 2013; VASQUES *et al.*, 2010).

A celulose (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub> é o biopolímero mais abundante no mundo. É considerada o principal componente estrutural das plantas, presente em todas as espécies do reino vegetal. Além delas, outros organismos são capazes de produzir celulose como representantes do filo *Chordata* (metazoários ou tunicos), fungos, leveduras, algas e bactérias. A celulose produzida por bactérias é conhecida por celulose bacteriana (BC), celulose microbiana ou biocelulose (ADITIAWATI *et al.*, 2021; AZEVEDO, 2011; CARREIRA *et al.*, 2011; JARAMILLO *et al.*, 2014; JEREMIC *et al.*, 2019; OLIVEIRA; CARMINATTI, 2016; RUIZ, 2004; SENNA *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2013; ZAETS *et al.*, 2014).

A celulose microbiana e a celulose vegetal são quimicamente semelhantes, porém, existem diferenças quanto as propriedades físicas, mecânicas e morfológicas como a ausência de lignina e hemicelulose na celulose bacteriana, sendo uma celulose de alta pureza, diferença no grau de cristalinidade e grau de polimerização, com os índices da celulose microbiana sendo superiores em ambos, além de possuir maior comprimento, maior capacidade de absorção de água e módulo de Young mais elevado (CACICEDO *et al.*, 2016; COELHO *et al.*, 2020; GRANDE *et al.*, 2009a; JARAMILLO *et al.*, 2014; JEREMIC *et al.*, 2019; LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANIAN, 2021; LIMA *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2016; OLIVEIRA E CARMINATTI, 2016; YANG *et al.*, 2013).

A celulose bacteriana (BC) é produzida por vários gêneros de bactérias como o *Gluconacetobacter*, anteriormente chamado de *Acetobacter* e, atualmente, também conhecido como *Komagataeibacter*, a *Sarcina*, o *Agrobacterium*, o *Aerobacter*, o *Achromobacter*, o *Rhizobium*, entre outros. A bactéria de maior destaque quanto à eficiência produtiva é a *Gluconacetobacter xylinus* (anteriormente chamada de *Acetobacter xulinum*), também



chamada de *Komagataeibacter xylinus* (ADITIAWATI *et al.*, 2021; CACICEDO *et al.*, 2016; CARREIRA *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2018; MACHADO *et al.*, 2016; RÖMLING; GALPERIN, 2015; SHARMA; BHARDWAJ, 2019; SOARES; LIMA; SCHMIDT, 2021; TROVATTI *et al.*, 2011; VIEIRA, 2013; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

A BC é biodegradável, biocompatível, possui grande capacidade de absorção de água, alta cristalinidade e pureza, grande elasticidade, flexibilidade e resistência à altas temperaturas, além de possuir resistência a tração. Por conta desses fatores, vem sendo amplamente utilizada nas indústrias têxtil, médica e biomédica, alimentícia, farmacêutica, biotecnológica e na área do meio ambiente (CACICEDO *et al.*, 2016; COELHO *et al.*, 2020; GRANDE *et al.*, 2009b; JARAMILLO *et al.*, 2014; KUKHARENKO *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2018; MAYHUIRE *et al.*, 2019; NASCIMENTO *et al.*, 2019; OLIVEIRA E CARMINATTI, 2016; PEROTTI *et al.*, 2014; ZAETS *et al.*, 2014).

Novos métodos para aumento da produção de celulose bacteriana vem sendo estudados, assim como, novos microrganismos produtores e novas matérias-primas para o processo fermentativo (CACICEDO *et al.*, 2016; JEREMIC *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2019 OLIVEIRA E CARMINATTI, 2016). Os resíduos industriais de polpa de beterraba (CACICEDO *et al.*, 2016), abacaxi (CACICEDO *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2018), laranja (CACICEDO *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2018; MAYHUIRE *et al.*, 2019), melão (CACICEDO *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2018), palha de trigo (SHARMA; BHARDWAJ, 2019), sisal (PILLAI *et al.*, 2021), água de coco (CACICEDO *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2016), dentre outros, vem obtendo bons resultados como novas fontes para a fermentação. Além desses, o *SCOBY*, o qual, é formado durante a fermentação da bebida kombucha, tem se mostrado como alternativa para este processo (CACICEDO *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2018; YOUNESI; AKKUS; AKKUS, 2019).

A Kombucha é uma bebida fermentada, originária do Oriente, com seus primeiros relatos na China. Possui diversas propriedades terapêuticas descritas como efeito antimicrobiano, antioxidante, anticarcinogênico, antidiabético. É produzida a partir da fermentação do chá verde ou preto, adicionado de açúcar e de um *SCOBY*. O processo fermentativo pode ser afetado por vários fatores, como: temperatura e pH em que ocorre, taxa de oxigênio e CO<sub>2</sub> dissolvido, além da natureza e composição do meio e tipo de chá utilizado (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016; COELHO *et al.*, 2020; GREENWALT; STEINKRAUS;

LEDFORD, 2000; PALUDO, 2017; SCREERAMULU; ZHU; KNOL, 2000; VÁZQUEZ-CABRAL *et al.*, 2015).

O *SCOBY* (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*) é definido como uma associação simbiótica de bactérias e leveduras, constituída por proteínas, fibras e celulose. É considerado um biofilme sobrenadante natural, o qual, tem a função de iniciar o processo fermentativo da kombucha. Diversos tipos de microrganismos encontram-se presentes nessa associação, dentre eles: *Gluconacetobacter saccharivorans*, *Acetobacter* sp., *Gluconacetobacter* sp., *Gluconacetobacter europaeus*, *Acetobacter aceti*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Arxula adenivorans* (ANTOLAK; PIECHOTA; KUCHARSKA, 2021; COELHO *et al.*, 2020; HOHMANN; KUNZ; VANDRESEN, 2020; JARRELL; CAL; BENNETT, 2000; MELO *et al.*, 2021; SANTOS, 2016; SOARES; LIMA; SCHMIDT, 2021).

A celulose bacteriana tem mostrado importância em diversas aplicações comerciais, desde sua utilização na área de alimentos como espessante, emulsificante, substituto da gordura ou em sobremesas de baixa caloria, até aplicações na área médica e biomédica como curativo, substituto de pele natural e regenerador no processo de cicatrização de feridas (CARREIRA *et al.*, 2011; GRANDE *et al.*, 2009a; GRANDE *et al.*, 2009b; JARAMILLO *et al.*, 2014; KUKHARENKO *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2018; SANTOS, 2016; SHARMA; BHARDWAJ, 2019; VIEIRA, 2013).

Posto isso, por conta dos impactos ambientais causados pela extração de celulose vegetal, buscando destinar os resíduos gerados na produção da kombucha e buscando novas aplicações comerciais para a celulose microbiana como em embalagem de alimentos ou na substituição de membranas de filtração do leite, o presente trabalho tem por objetivo extrair e caracterizar membranas de celulose bacteriana, através do *SCOBY* presente na kombucha, pensando principalmente, em sua utilização para embutidos e no processo de filtração do leite.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Extrair e caracterizar membranas de celulose obtidas a partir da propagação de *SCOBY* de kombucha.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o rendimento de celulose microbiana obtida;
- Avaliar o método de branqueamento da celulose bacteriana, realizado em diferentes proporções de reagentes;
- Avaliar o efeito do tempo, da temperatura e das diferentes concentrações utilizadas no processo de branqueamento, sob a celulose bacteriana;
- Avaliar diferentes tempos e temperaturas e sua influência sob o processo de secagem da celulose bacteriana;
- Caracterizar a celulose extraída de acordo com o grau de intumescimento, índice de permeabilidade ao vapor de água, análise de cor instrumental, calorimetria diferencial de varredura (DSC), espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), Difração por Raios X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de superfície e fratura.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 BIOPOLÍMEROS

Os polímeros são um tipo de material formados pela repetição de estruturas pequenas, as macromoléculas, onde ocorre a união de diversos monômeros, que se agrupam através de ligações cruzadas e da reação de polimerização. Nesse processo, dependendo das condições em que a reação ocorre, podem ser formados polímeros que irão possuir de 2.000 a 100.000 monômeros, fazendo com que a massa molecular dos polímeros varie entre 56.000 e 2.800.000 unidades (ROCHA *et al.*, 2013; VASQUES *et al.*, 2010).

Diversos fatores são determinantes na propriedade e estruturação de um polímero: o tamanho de sua cadeia polimérica, os grupos funcionais dos monômeros e o tipo de ligação realizada entre eles, as condições em que ocorre a reação de polimerização (pressão, tempo, catalisador utilizado, etc.) e a velocidade com que tal reação irá ocorrer. Reações de polimerização em baixa pressão, irão gerar polímeros lineares com ramificações laterais curtas, já reações de polimerização em alta pressão, irão gerar cadeias de polímeros com ramificações laterais mais longas (ONER; SENGOZ, 2018; ROCHA *et al.*, 2013).

Podem ser classificados quanto à sua ocorrência, à forma molecular fixada por ligações químicas, à rotação dos átomos da cadeia em torno das ligações primárias (conformação), ao encadeamento das unidades monoméricas, ao arranjo dos átomos, ao modo de preparação, à condensação-adição, à etapa-cadeia, ao comportamento mecânico, as características de fusibilidade, à estrutura química e a variedade de meros que compõem a cadeia (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001). Neste trabalho, abordaremos apenas as classificações relacionadas aos biopolímeros, em especial, a celulose.

Quanto a sua ocorrência, são definidos como: sintéticos, também conhecidos como plásticos, e naturais. Os polímeros sintéticos são obtidos industrialmente, através de moléculas de baixo peso molecular. Os principais polímeros sintéticos conhecidos são: as poliaminas (PA), as polisulfonas (OS), os policarbonatos (PC), a polieterimida (PEI), o poli (fluoreto de vinilideno) (PVDF), o polietileno de alta densidade (PEAD), o polipropileno (PP), entre outros. Caracterizam-se por possuir resistência à ação de ácidos e bases (pH entre 2 e 12), além de resistirem a altas temperaturas (aproximadamente 100°C) e compostos clorados (200 ppm) (BASSETTI; PERES; PETRUS, 2003; ROCHA *et al.*, 2013).

Os polímeros naturais, também chamados de biopolímeros ou polímeros biodegradáveis, são aqueles encontrados na natureza, sendo susceptíveis à degradação por atividade biológica, como por exemplo: proteínas, polinucleotídeos, polissacarídeos, gomas, celulose, entre outros. Diversas são as vantagens descritas na utilização de biopolímeros em relação aos polímeros de base petroquímica, como: o fato de serem obtidos de fontes naturais (animais, plantas, bactérias e algas), não possuírem efeitos indesejáveis à longo prazo, possuírem extração de baixo custo, além de serem biocompatíveis e biodegradáveis. Por conta dos fatores citados, têm apresentado cada vez mais interesse por parte da indústria, principalmente das áreas ligadas à indústria de alimentos, biomedicina, indústria farmacêutica e do setor ambiental. Podem ser obtidos de diversas formas: disponíveis de maneira natural como os polissacarídeos (celulose, quitina, *etc.*), exopolissacarídeos e/ou proteínas (biofilmes), obtidos pela produção ou fermentação microbiana (celulose microbiana, *SCOPY*), ou quimicamente sintetizados a partir de biomassa (BEDOR *et al.*, 2020; VASQUES *et al.*, 2010).

Com relação as aplicações comerciais dos biopolímeros, estes, ganham destaque, pois, em sua maioria, são obtidos através de fermentação e são facilmente hidrolisáveis. A hidrólise dos biopolímeros produz moléculas de pequeno tamanho, que são absorvidas por microrganismos e se transformam em água e dióxido de carbono, além de serem convertidos em biomassa celular. Na área ambiental, os biopolímeros apresentam uso nos processos de biorremediação, recuperação de ambientes degradados, remediação de metais pesados e derivados de petróleo (BEDOR *et al.*, 2020).

Quanto à forma molecular fixada por ligações químicas existem três principais formas de apresentação: a linear, a ramificada e a reticulada. Dentro da forma linear destaca-se a celulose. Quanto ao modo de preparação subdividem-se em: polímeros de condensação e adição, e polímeros etapa e cadeia. Nos polímeros de condensação-adição, analisam-se as variações das reações de química orgânica envolvendo os grupos funcionais, como mostra a Figura 1. Já dentro da classificação etapa-cadeia, mostra-se o mecanismo de ação pelo qual os polímeros são formados. Os formados por etapa são produzidos por reação de polimerização em etapas e polímeros formados por cadeia são produzidos por reação de polimerização em cadeia (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

Figura 1 – Polímeros de condensação-adição e sua estrutura baseada na química orgânica.

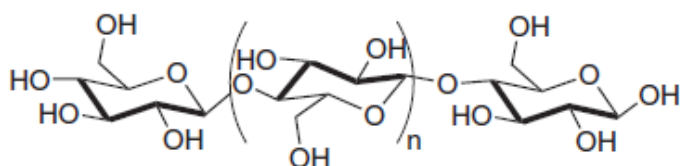
| Tipo de polímero   | Ligação característica  | Estrutura do polímero resultante  |
|--------------------|---|---|
| Poliamida          | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\   \quad    \\ -\text{N} - \text{C}- \end{array}$ | $\text{H}_2\text{N-R-N}_2\text{H} + \text{HO}_2\text{C-R}'\text{-CO}_2\text{H} \rightarrow \text{H-(NH-R- HCO-R}'\text{-CO-)}_n\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ $\text{H}_2\text{N-R-N}_2\text{H} + \text{ClOC-R}'\text{-COCl} \rightarrow \text{H-(NH-R- HCO-R}'\text{-CO-)}_n\text{Cl} + \text{HCl}$ $\text{H}_2\text{N-R-CO}_2\text{H} \rightarrow \text{H-(NH-R-CO-)}_n\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ |
| Proteína, lã, seda | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\   \quad    \\ -\text{N} - \text{C}- \end{array}$ | <p>Polímeros de polipeptídeos que ocorrem naturalmente</p> $\text{H-(NH-R-CONH-R}'\text{-CO-)}_n\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{N-R-CO}_2\text{H} + \text{H}_2\text{N-R}'\text{-CO}_2\text{H}$   |
| Poliéster          | $\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ -\text{C}-\text{O}- \end{array}$                          | $\text{HO-R-OH} + \text{HO}_2\text{C-R}'\text{-CO}_2\text{H} \rightarrow \text{H-(O-R-OCO-R}'\text{-CO-)}_n\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ $\text{HO-R-OH} + \text{R}''\text{O}_2\text{C-R}'\text{-CO}_2\text{R}'' \rightarrow \text{H-(O-R-OCO-R}'\text{-CO-)}_n\text{Cl} + \text{R}''\text{OH}$ $\text{HO-R-CO}_2\text{H} \rightarrow \text{H-(O-R-CO-)}_n\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$               |
| Celulose           | $-\text{O}-\text{C}-$   | <p>Ocorre naturalmente</p> $-(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_4)_n- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$   |

Fonte: LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001.

Com relação ao comportamento mecânico possuem três classes principais: plásticos, fibras e elastômeros. Essa classificação possui grande importância do ponto de vista tecnológico pois dita qual comportamento o polímero irá apresentar sob diferentes temperaturas e faixas de tensão. As fibras, das quais a celulose faz parte, possuem razão elevada entre comprimento e suas dimensões laterais, sendo compostas principalmente por macromoléculas lineares (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

Com relação à estrutura química, esta, refere-se ao “desenho estrutural” do polímero e a qual família ele pertence, como mostra a Figura 2. Por fim, quanto aos meros que compõem a cadeia tem-se que: polímeros formados por apenas um tipo de monômero são chamados de homopolímeros, já os formados por dois ou mais monômeros recebem o nome de copolímeros (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001; ROCHA *et al.*, 2013).

Figura 2 – Estrutura química da celulose.



Fonte: FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009.

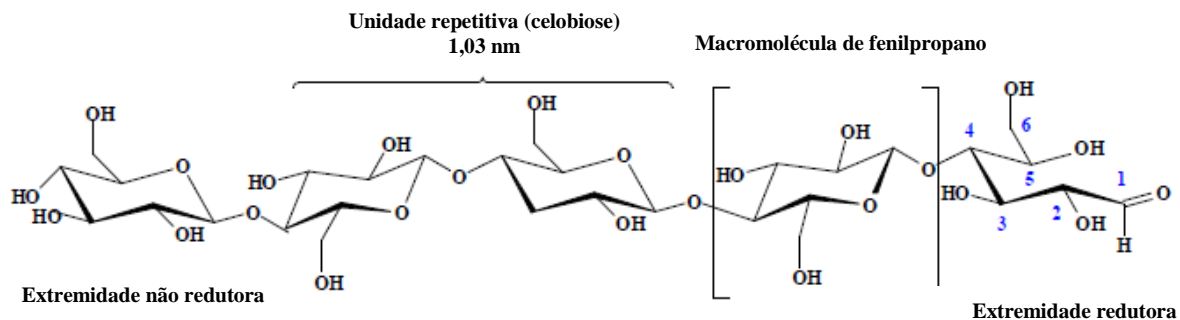
### 3.2 CELULOSE

A celulose (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub> é o biopolímero mais abundante no mundo. Foi isolada de madeira pela primeira vez em 1842, pelo químico francês Anselme Payen. É um polímero natural, sendo componente estrutural de todas as espécies do reino vegetal e principal elemento da parede celular das plantas. Possui como vantagens a biodegradabilidade, o fato de ser renovável, não tóxica e estar disponível à baixo custo. A sua principal desvantagem é o fato de ser insolúvel em solventes orgânicos convencionais como álcool etílico, álcool metílico, álcool propílico e cetonas, quando *in natura*. Devido ao crescente número de problemas ambientais causados pela utilização de polímeros sintéticos, tem aumentado a demanda por polímeros naturais de fontes renováveis e a celulose tem se mostrado uma importante alternativa nessa situação (AZEVEDO, 2011; RUIZ, 2004; SENNA *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2013).

O Brasil, por se tratar de um país tropical, apresenta vantagens climáticas para a sua produção. Em 2020, tornou-se o segundo maior produtor de celulose do mundo, com 21 milhões de toneladas produzidas e primeiro maior exportador da mesma, com 15,6 milhões de toneladas exportadas. A grande maioria da celulose produzido no país é derivada de eucaliptos. Devido à sua ampla comercialização vem sendo considerada uma nova *commodity* bioquímica (EPE, 2022; SENNA *et al.*, 2018; VIEIRA *et al.*, 2013).

Em termos de composição química e estrutura molecular, a celulose, em madeira, encontra-se ligada a hemicelulose e a lignina. A sua morfologia na parede celular caracteriza-se por ter várias camadas. É um polissacarídeo de cadeia linear não ramificada, fibroso, com configuração sindiotática e insolúvel em água. Possui moléculas de glicose unidas por ligações do tipo β(1→4) glicosídicas. Nela, os monômeros ficam dispostos de forma que estas glicoses fiquem rotacionadas a 180° umas das outras. A estrutura mínima de repetição é o dímero celobiose. Na Figura 3, verifica-se a estrutura molecular da celulose, com destaque para a celobiose e para a macromolécula de fenilpropano, a qual, é formada por um anel aromático. (AZEVEDO, 2011; OLIVEIRA; CARMINATTI, 2016; RUIZ, 2004; SENNA *et al.*, 2018; ZAETS *et al.*, 2014).

Figura 3 – Estrutura molecular da celulose com destaque para o anel aromático da macromolécula de fenilpropano.



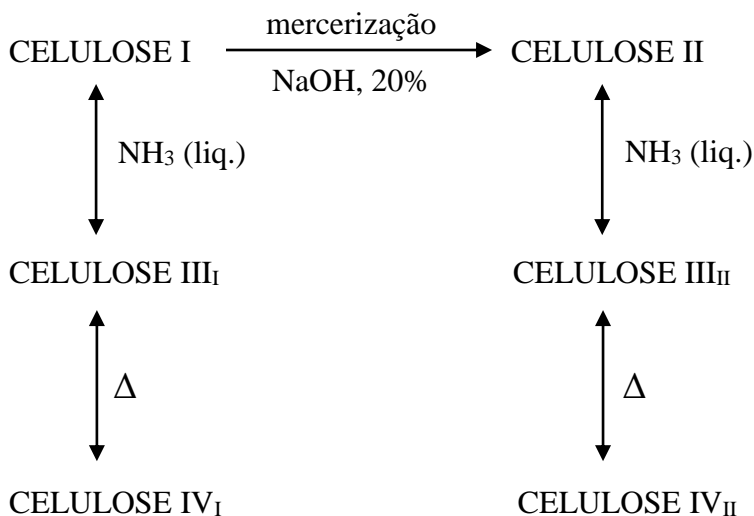
Fonte: AZEVEDO, 2011.

Nas plantas, a celulose está disposta sob forma de fibrilas que possuem entre 100 a 40.000 nm de comprimento. Essas fibrilas são divididas em duas regiões de desordem, as quais, podem ser hidrolisadas com ácido, gerando microfibrilas, nanofibrilas e celuloses de nanocristais. A lignina presente nas fibras é hidrofóbica, por isso há a necessidade de tratamento químico e térmico para a purificação. As interações de Van der Waals entre as cadeias poliméricas formam zonas com estruturas cristalinas, as quais, não permitem a passagem de água. Porém, nas zonas amorfas da celulose, pode ocorrer absorção, tornando-a mais macia e flexível. Esta absorção de água em tais zonas, só é possível devido à falta de espaços vazios na estrutura cristalina (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009; LORENZO-SANTIAGO; RENDÓN-VILLALOBOS, 2020).

Quanto aos tipos de celulose, tem-se: celulose I, celulose II, celulose III, celulose IV,  $\alpha$ -celulose,  $\beta$ -celulose e  $\gamma$ -celulose. Todos diferem entre si com relação as dimensões da célula unitária. A celulose I é a qual encontra-se *in natura*, biossintetizada naturalmente na natureza. Já a celulose II é obtida a partir da celulose I, através do processo de mercerização, regeneração ou solubilização em solução alcalina aquosa. Esta celulose é termodinamicamente mais estável, pois ocorre maior formação de ligações de hidrogênio. A celulose III irá surgir através do tratamento da celulose I ou II em amônia líquida a temperaturas inferiores à  $-30^{\circ}\text{C}$ , onde irá ocorrer recristalização da amostra após evaporação da amônia. Por fim, a celulose IV, é resultado do tratamento de qualquer um dos tipos de celulose em altas temperaturas sobtensão. Na figura 4, mostra-se como ocorre o processo de conversão das celuloses (AZEVEDO, 2011; RUIZ, 2004).



Figura 4 – Processo de conversão da celulose.



Fonte: AZEVEDO, 2011.

Além de ser encontrada em todas as espécies do reino vegetal e na base estrutural da parede celular das plantas, a celulose também pode ser produzida por alguns representantes do filo *Chordata* (metazoários ou túnicos), fungos, leveduras, algas e bactérias. A celulose produzida por bactérias recebe o nome de celulose bacteriana (BC). As principais bactérias produtoras pertencem aos gêneros: *Gluconacetobacter/Acetobacter*, *Komagataeibacter*, *Agrobacterium*, *Sarcina* e *Rhizobium*, sendo o microrganismo de maior destaque a *Gluconacetobacter xylinus*, anteriormente chamado de *Acetobacter xylinum*, pois é o mais eficiente produtor de celulose (ADITIAWATI *et al.*, 2021; CARREIRA *et al.*, 2011; JARAMILLO *et al.*, 2014; JEREMIC *et al.*, 2019; OLIVEIRA; CARMINATTI, 2016; RUIZ, 2004; ZAETS *et al.*, 2014).

A celulose vegetal (CV) e a celulose bacteriana (BC) são quimicamente semelhantes, porém, morfologicamente diferentes. A celulose vegetal necessita de processos de purificação complexos e altamente poluentes, por conter lignina e hemicelulose presentes junto à parede celular das plantas, variando de acordo com a espécie. Já a celulose bacteriana necessita de processo de purificação ou pré-tratamento mais simples, sendo sintetizada com arquitetura de uma rede ultrafina de microfibrilas em forma de fita, tendo de 20-100 nm de diâmetro. Além disso, o grau de polimerização da CV é maior que o da BC, 13.000 a 14.000 e 2.000 a 6.000, respectivamente, e o índice de cristalinidade da BC é mais elevado. O quadro 1 mostra as principais diferenças entre elas (ADITIAWATI *et al.*, 2021; JEREMIC *et al.*, 2019; OLIVEIRA; CARMINATTI, 2016; SENNA *et al.*, 2017; VIEIRA *et al.*, 2013).

Quadro 1 – Comparativo entre as propriedades da celulose vegetal e celulose bacteriana.

| Propriedades                  | Celulose vegetal                | Celulose bacteriana |
|-------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| <b>Cristalinidade</b>         | 56% - 65%                       | 65% – 79%           |
| <b>Grau de polimerização</b>  | 300 – 1700                      | 800 – 10000         |
| <b>Comprimento das fibras</b> | 1,4 – 4,0 x 10 <sup>-2</sup> mm | 70 mm – 80 mm       |
| <b>Módulo de Young</b>        | 5,5 GPa – 12,6 GPa              | 15 GPa – 30 GPa     |
| <b>Conteúdo de Água</b>       | 60%                             | 98,50%              |

Fonte: OLIVEIRA; CARMINATTI, 2016.

Algumas vantagens estruturais da BC com relação a CV também se destacam como: pureza da BC superior a 90%, por não possuir a lignina e hemicelulose, custos e tempo de produção mais baixos, maior capacidade de retenção de água e hidrofiliçidade e maior aplicabilidade comercial, especialmente nas indústrias biotecnológicas, farmacêutica, médica e alimentícia (ADITIAWATI *et al.*, 2021; JEREMIC *et al.*, 2019; OLIVEIRA; CARMINATTI, 2016; SENNA *et al.*, 2017; VIEIRA *et al.*, 2013).

### 3.3 CELULOSE BACTERIANA

A celulose é um biopolímero obtido através de plantas e vegetais, algas, bolores, leveduras, fungos, metazoários (túnicos) pertencentes ao filo *Chordata* e bactérias. A celulose produzida por bactérias é conhecida como celulose bacteriana (BC), celulose microbiana ou biocelulose. Foi descrita pela primeira vez pelo o químico inglês Adrian J. Brown, como componente chave de uma película gelatinosa formada na fermentação do vinagre (ADITIAWATI *et al.*, 2021; CARREIRA *et al.*, 2011; JARAMILLO *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2015; RÖMLING; GALPERIN, 2015; TROVATTI *et al.*, 2011; ZAETS *et al.*, 2014).

A celulose bacteriana (BC) é um polissacarídeo que se apresenta como um tipo especial de nanocelulose produzida pelos microrganismos. Nas últimas décadas vem ganhando notoriedade devido ao desenvolvimento da química verde. É quimicamente semelhante à celulose vegetal, porém, com propriedades físicas, mecânicas e morfológicas diferentes, sendo livre de hemicelulose e lignina e considerada um composto de alta pureza. Além disso, a BC é facilmente purificada através da utilização de NaOH (hidróxido de sódio) (CACICEDO *et al.*, 2016; GRANDE *et al.*, 2009b; LIU; CATCHMARK, 2019; MACHADO *et al.*, 2016; SHARMA; BHARDWAJ, 2019).

A BC possui outras características que a tornam superior a celulose vegetal, como alta cristalinidade (65%-90%), o que lhe fornece maior resistência mecânica, alto grau de polimerização (2000 a 6000), resistência à tração, alta capacidade de retenção de água (cerca de 100x maior), módulo de Young mais elevado, biocompatibilidade e biodegradabilidade. A celulose produzida pelas bactérias é sintetizada como microfibrilas no formato de fita. Essas microfibrilas possuem um décimo do tamanho das fibras da celulose vegetal, sendo cerca de 100 vezes menores, com aproximadamente 20-100 nm de diâmetro. A produção das microfibrilas bacterianas exige menor tempo do que as fibras da celulose vegetal, sendo considerada uma produção mais eficiente e eficaz. Por conta desses fatores, a celulose microbiana vem sendo testada como substituta para a celulose vegetal (ADITIAWATI *et al.*, 2021; CACICEDO *et al.*, 2016; CARREIRA *et al.*, 2011; COELHO *et al.*, 2020; GRANDE *et al.*, 2009b; JARAMILLO *et al.*, 2014; JEREMIC *et al.*, 2019; KUKHARENKO *et al.*, 2014; MACHADO *et al.*, 2016; OLIVEIRA E CARMINATTI, 2016; YANG *et al.*, 2013).

Além disso, a BC possui estabilidade sob altas temperaturas (temperatura de decomposição variando de 340 a 370 °C), pressão, irradiação e outros fatores ambientais, alta resistência à umidade, alta elasticidade, boa permeabilidade, boa estabilidade química, grande porosidade (principalmente quando hidratada) e conformabilidade. Além disso, pode ser facilmente seca, transformando-se em filmes finos e é atóxica. Suas nanofibras possuem de 2-4 nm de diâmetro, podendo chegar à 100 µm de comprimento (CACICEDO *et al.*, 2016; GRANDE *et al.*, 2009a; KUKHARENKO *et al.*, 2014; LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANIAN, 2021; MACHADO *et al.*, 2018; MAYHUIRE *et al.*, 2019; NASCIMENTO *et al.*, 2019; PEROTTI *et al.*, 2014; TROVATTI *et al.*, 2011; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018; ZAETS *et al.*, 2014).

Por conta disso, a celulose microbiana vem se mostrando uma importante alternativa na substituição da celulose vegetal, pois ajuda a resolver os problemas de impacto ambiental causados pela extração da celulose vegetal, como a perda de grandes quantidades de floresta, enfraquecimento do solo, extinção da fauna e flora nativas e aumento do aquecimento global. Além disso, tem demonstrado grande interesse e aplicabilidade na biomedicina e medicina, na produção de medicamentos e produtos farmacêuticos, como material óptico, curativo, na regeneração tecidual e no processo de cicatrização de feridas, úlceras, escoriações e queimaduras de pele, na engenharia, eletrônicos e biotecnologias como *scaffolds* e membranas para dispositivos de áudio, bioenergia, bioplásticos, biorrefinação, nas indústrias de embalagens, têxtil, tratamento de águas residuais e efluentes, cosméticos, alimentos,

equipamentos militares e na produção de combustível. Na indústria de alimentos tem sido utilizada como aditivo alimentar para aumentar a estabilidade térmica, texturizar e substituir gorduras (CARREIRA *et al.*, 2011; COELHO *et al.*, 2020; GRANDE *et al.*, 2009a; GRANDE *et al.*, 2009b; GRUBE *et al.*, 2016; JARAMILLO *et al.*, 2014; KUKHARENKO *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2018; LIU; CATCHMARK, 2019; NASCIMENTO *et al.*, 2019; OLIVEIRA E CARMINATTI, 2016; YOUNESI; AKKUS; AKKUS, 2019).

Por muito tempo acreditou-se que as bactérias viviam de maneira isolada, porém, atualmente sabe-se que estas vivem em consórcios compostos por vários tipos de microrganismos. Diversos gêneros de microrganismos são capazes de produzir celulose, dentre eles: *Gluconacetobacter* (anteriormente chamado de *Acetobacter*), *Sarcina*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Dickeya*, *Erwinia*, *Burkholderia* spp. e *Alcaligenes*. No entanto, o gênero de maior destaque é o *Gluconacetobacter*, o qual, compreende várias espécies de bactérias, como: *Gluconacetobacter hansenii*, *Gluconacetobacter nataicola* e *Gluconacetobacter xylinus* (anteriormente chamada de *Acetobacter xulinum*). Esta última, é considerada a produtora de maior destaque e eficiência, pois é capaz de atingir alto rendimento de produção de BC, cerca de 7-8 g/L em escala industrial. Há cerca de 9 anos, as bactérias do gênero *Gluconacetobacter/Acetobacter* foram reclassificadas novamente como *Komagataeibacter*, porém, alguns autores ainda se referem pelo antigo nome. As bactérias do gênero *Komagataeibacter/Gluconacetobacter* são gram-negativas, não patogênicas, estritamente aeróbicas, caracterizadas por produzir ácido acético a partir do etanol e oxidar acetato e lactato em dióxido de carbono e água. Além disso, são capazes de converter fontes de carbono como glicose, glicerol, sacarose, frutose e manitol, em temperaturas (25°C-30°C) e faixa de pH (3-7) ideais. Podem ser encontradas em diversas plantas, frutas e vegetais, na microbiota secundária de material vegetal em decomposição, no processo de acidificação de sucos de frutas e bebidas alcoólicas e em membranas de celulose na interface ar/líquidos desses sucos, misturas de vegetais e frutas em culturas estáticas (ADITIAWATI *et al.*, 2021; CACICEDO *et al.*, 2016; GRUBE *et al.*, 2016; JARAMILLO *et al.*, 2014; JERICIC *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2016; RÖMLING; GALPERIN, 2015; SOARES; LIMA; SCHMIDT, 2021; TROVATTI *et al.*, 2011; VIEIRA, 2013; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2013).

Vários fatores podem afetar o rendimento da BC, por exemplo, tipo de microrganismo utilizado, fermentação realizada em cultura estática ou não, temperatura em que a mesma ocorre, quantidade de sacarose, concentração de nitrogênio e tempo de incubação. Em condições apropriadas, a conversão de substrato de carbono em celulose pode atingir índices de 50%. Em processos fermentativos estáticos é formada uma membrana espessa e gelatinosa, a qual, fica acumulada na superfície do meio de cultivo. Já em processos fermentativos mantidos sob agitação, a celulose é produzida em forma de suspensão fibrosa, esferas ou *pellets* (CACICEDO *et al.*, 2016; CARREIRA *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2016; OLIVEIRA E CARMINATTI, 2016; SOARES; LIMA; SCHMIDT, 2021; VIEIRA, 2013; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

As bactérias são capazes de produzir duas formas de celulose: celulose I e celulose II. A celulose I é um polímero em forma de fita, sendo composta por feixes de microfibrilas. Já a celulose II é um polímero amorfo sintetizado através de transformações enzimáticas da celulose I, sendo termodinamicamente mais estável. No processo de produção da celulose, as bactérias inicialmente aumentam sua população através do consumo do oxigênio dissolvido no meio. Após, elas sintetizam certa quantidade de celulose para o meio líquido, e apenas as bactérias que estão na interface ar/meio mantem suas atividades e continuam a produzir celulose em camadas sobrepostas. Conforme o processo fermentativo vai avançando, a espessura da membrana formada vai aumentando, gerando novas camadas próximas a superfície. O desenvolvimento do filme de celulose, juntamente com as ligações de hidrogênio e C-H continuam durante todo o processo fermentativo. Através da difração em raios X é possível identificar o tipo de celulose, onde a celulose I apresenta estrutura cristalina (ADITIAWATI *et al.*, 2021; LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANIAN, 2021; SOARES; LIMA; SCHMIDT, 2021; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

Diversas avaliações podem ser utilizadas para observar a pureza, polimorfismo e estrutura das fibras na celulose bacteriana, dentre elas: difração em raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), ressonância magnética nuclear CP/MAS <sup>13</sup>C e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). Dentre as técnicas citadas, o método analítico mais simples é o FT-IR, sendo considerado amigo do ambiente, pois não requer pré-tratamento da amostra. Na difração em raios X, é possível realizar a identificação das estruturas químicas presentes na celulose (GRUBE *et al.*, 2016; LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANIAN, 2021; SHARMA; BHARDWAJ, 2019).

Os principais desafios na produção da celulose microbiana estão ligados a sua inserção no mercado com preços competitivos, busca por novos microrganismos e fontes produtivas e de alta produção. Quando comparado a celulose vegetal, possui produção de baixa eficiência, longo tempo necessário para bom rendimento e altos custos, principalmente pelas matérias primas (glicose) e meios de cultura específicos utilizados, como o HS (*Hestrin e Schramm* 1954). Também encontra dificuldades em manter um sistema axênico e condições exatas de crescimento de bactérias específicas por um longo tempo. Novas fontes de matéria-prima de resíduos industriais tem sido analisadas visando a produção de BC como polpa de beterraba, abacaxi, extrato de uva, casca de cereja, casca de café, romã, melão, melancia, laranja, tomate, palha de trigo, casca de soja, entre outros, além de busca por novos substratos, incluindo açúcares e álcoois (manitol, sorbitol, lactase) que atuem como fonte de carbono. Além disso, novos microrganismos produtores de celulose e formas de otimizar/aumentar a produção dos já citados, tem sido amplamente pesquisados (*CACICEDO et al.*, 2016; *JEREMIC et al.*, 2019; *MACHADO et al.*, 2016; *MACHADO et al.*, 2018; *MAYHUIRE et al.*, 2019; *NASCIMENTO et al.*, 2019; *OLIVEIRA E CARMINATTI*, 2016; *PILLAI et al.*, 2021; *SHARMA; BHARDWAJ*, 2019; *YOUNESI; AKKUS; AKKUS*, 2019).

### 3.4 KOMBUCHA

A kombucha é uma bebida fermentada originária do Oriente, com seus primeiros relatos na China, seguido de Rússia e Alemanha. É frequentemente citada na literatura também como *tea fungus* "fungos do chá", apesar de não conter nenhum fungo envolvido no processo fermentativo. Ganhou grande popularidade nos últimos anos devido as propriedades terapêuticas que apresenta como efeito antimicrobiano, antioxidante, anticarcinogênico, antidiabético e fator antiobesidade, além de ser utilizada no tratamento de úlceras gástricas, colesterol alto, apresentar impacto no sistema imune e desintoxicar o fígado (*CHAKRAVORTY et al.*, 2016; *COELHO et al.*, 2020; *PALUDO*, 2017; *SCREERAMULU; ZHU; KNOL*, 2000).

É feita a partir da fermentação do chá preto ou chá verde (*Camellia sinensis*) adicionado de açúcar. O chá possui fonte de nitrogênio necessária para os microrganismos, as quais, são liberadas durante o processo de cocção, como purinas, xantinas, cafeína, teofilina e alcaloides. Em termos do tipo de chá utilizado, a diferença se deve a forma de processamento de ambos. Enquanto o chá preto é obtido a partir das folhas esmagadas e deixadas expostas a

alta umidade, causando oxidação dos polifenóis presentes, sendo assim, mais aromático e mais escuro, o chá verde é submetido ao vapor com as folhas ainda frescas, nisso, o calor inativa as enzimas presentes, evitando a oxidação. Além disso, o chá verde possui maior atividade antimicrobiana em relação ao chá preto (COELHO *et al.*, 2020; GREENWALT; STEINKRAUS; LEDFORD, 2000; VÁZQUEZ-CABRAL *et al.*, 2015).

Com relação a quantidade de chá e açúcar utilizados e o tempo de imersão em água fervida, estes podem variar. Os parâmetros mais utilizados são 10 minutos de imersão após fervura da água, utilizando-se cerca de 10 g/L de chá e 50 g/L de açúcar. Primeiro, ferve-se a água e adiciona-se o chá, deixando-o em imersão, em seguida, o mesmo é coado e coloca-se o açúcar, mexendo até dissolver. Após este processo, o chá é resfriado a temperatura ambiente e adicionado ao *SCOBY*, evitando assim, a inativação ou morte das bactérias presentes no mesmo. Para uma primeira fermentação, tem-se a utilização de um volume de kombucha já fermentado anteriormente, normalmente de 5 à 10% v/v, junto à 10% v/v (em média) de um *SCOBY*. A partir do 5º dia, já pode-se observar o início da formação de um *SCOBY* filho sobre a kombucha mãe (CHAKRAVORTY *et al.*, 2016; COELHO *et al.*, 2020; DUFRESNE; FARNWORTH, 2000).

Deve atentar-se ao ambiente e utensílios utilizados durante o processo de fabricação do chá e processo fermentativo, tomando-se bastante cuidado com a higienização e esterilização deles, pois se estes estiverem contaminados e ocorrer contaminação durante o início do processo de fabricação da bebida, toda a cadeia produtiva estará contaminada. Devido à grande formação de ácidos por parte das bactérias durante o processo fermentativo, o qual atinge pH final entre 2,7 e 3,2, recipientes com baixo índice corrosivo devem ser utilizados, sendo os mais indicados o vidro e o aço inoxidável, pois casos de intoxicação por parte do consumidor já foram registrados devido a migração de compostos tóxicos presentes nos recipientes utilizados, principalmente os que contem chumbo em sua composição e as cerâmicas (COELHO *et al.*, 2020; PALUDO, 2017).

Quanto ao processo fermentativo, este pode ser afetado por diversos fatores como temperatura, pH, quantidade de oxigênio, CO<sub>2</sub> dissolvido, natureza e composição do meio. Qualquer variação nesses fatores pode afetar a taxa de fermentação, o desempenho, as propriedades sensoriais, a qualidade nutricional e outras propriedades físico-químicas do produto final (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

Tal processo ocorre devido a presença de uma colônia simbiótica de bactérias e leveduras conhecida como *SCOBY* (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*) ou “kombucha

mãe”, a qual, utiliza o açúcar como substrato. Esta colônia é formada majoritariamente por celulose bacteriana. Em termos de tempo de fermentação, existem relatos de 7 a 60 dias de processo fermentativo, onde a maioria dos autores utiliza entre 7 a 10 dias, porém, com melhores resultados obtidos com 15 dias de fermentação. Já com relação a temperatura, esta varia entre 22°C a 30°C, com pH em torno de 2,5 a 4,6. Além disso, a quantidade de nitrogênio deve encontrar-se em torno de 0,7 g/L e a acidez total entre 4 e 5 g/L, para que se tenha uma bebida de sabor agradável e ácida (COELHO *et al.*, 2020; FU *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2016; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

Diversas são as bactérias e leveduras encontradas na kombucha, podendo variar de acordo com o inóculo utilizado no processo fermentativo. Pode-se citar como principais constituintes: *Komagataeibacter*, *Gluconabacter*, *Acetobacter* sp., bactérias ácido lácticas (*Lactococcus* em sua maioria), *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulasporea delbrueckii*, *Brettanomyces brucei*, dentre outros. Em geral, todas as bactérias e leveduras encontradas na kombucha, encontram-se no *SCOBY* também (FU *et al.*, 2014; PALUDO, 2017; SCREERAMULU; ZHU; KNOL, 2000; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

Enquanto as leveduras presentes no *SCOBY* hidrolisam a sacarose em glicose e frutose, convertendo-as em etanol, dióxido de carbono e glicerol, as bactérias oxidam o etanol, transformando-o em acetaldeído e, após, em ácido acético, principal composto químico da bebida. Além disso, outros ácidos orgânicos são gerados como produtos dessa fermentação, dentre eles ácido glucorônico, ácido glucônico, ácido láctico, ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido fólico, ácido oxálico, ácido pirúvico e ácido úsnico. Todos os ácidos gerados possuem atividade antimicrobiana, evitando assim, que bactérias patogênicas contaminem a bebida durante o processo fermentativo. O ácido acético é o responsável pelo aroma e sabor ácido da bebida. Já o ácido láctico está presente em maiores proporções em kombuchas preparadas com chá verde ao invés de chá preto. Por fim, o ácido glucorônico, é considerado por diversos autores, o principal agente terapêutico da bebida, pois possui poder desintoxicante ao fígado, já que se liga com os compostos tóxicos presentes no mesmo, permitindo que essas substâncias sejam excretadas com maior eficiência pelo rim, além de ser um dos precursores na biossíntese de vitamina C (COELHO *et al.*, 2020; PALUDO, 2017; TEOH; HEARD; COX, 2004; VÁZQUEZ-CABRAL *et al.*, 2015; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).



Além da presença de ácidos e etanol, diversas vitaminas, minerais, aminoácidos e polifenóis estão presentes na kombucha, como: vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, vitamina C, cobre, ferro, zinco, manganês, níquel, chumbo, cobalto, cromo, cádmio, fluoreto, cloreto, brometo, iodeto, nitrato, fosfato, sulfato, epicatequinas, epigallocatequina, galato de epicatequina e galato de epigallocatequina. No entanto, a presença ou ausência e a quantidade/concentração de todos estes metabólitos depende da fonte de inóculo utilizada, da concentração de açúcar e chá, do tempo de fermentação e da temperatura da mesma (COELHO *et al.*, 2020; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

Em relação ao produto final, a bebida é levemente gaseificada, possuindo sabor ligeiramente ácido e carbonatado, o que facilita à aceitação por parte do consumidor. Atualmente, tem sido utilizada como substituto de baixo teor alcoólico em relação a vinhos e espumantes (COELHO *et al.*, 2020).

Por fim, com relação a parte legislativa, o Brasil é o único país no mundo que possui legislação específica referente a kombucha. Através da instrução normativa (IN) nº 41, de setembro de 2019, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), definiu-se o Padrão de Identidade e Qualidade da kombucha em todo território nacional. Nela, inclui-se a definição, classificação, orientações de rotulagem e parâmetros analíticos, composição (ingredientes obrigatórios e opcionais) e as proibições relacionadas à produção e comercialização da bebida no Brasil. Nos EUA, em seu código alimentar, cita-se apenas que a fermentação da kombucha não deve ultrapassar 10 dias, quando destinado ao consumo humano, pois pode atingir níveis de ácidos orgânicos prejudiciais à saúde. Além disso, na Pensilvânia – EUA, um documento contendo diretrizes sobre a kombucha foi publicado, visando controlar o processo e garantir a segurança alimentar da mesma aos consumidores. Nele, cita-se que o pH da bebida deve ser monitorado durante todo o processo, não devendo ser superior a 4,2 ou inferior a 2,5 para evitar contaminação microbológica e acidificação da mesma (COELHO *et al.*, 2020; VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018).

### 3.5 SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*)

O SCOBY é composto pela associação simbiótica de bactérias e leveduras, constituído majoritariamente por celulose, além de fibras e proteínas. Também conhecido como “elixir de longa vida”, “cogumelo milagroso”, “bactéria do chá vermelho”, “esponja de chá kombucha”, “cogumelo japonês”, “kombucha mãe”, “*tea fungus*”, é considerado um biofilme

sobrenadante, o qual, inicia o processo de fermentação da kombucha. O termo SCOBY surgiu na década de 1990, criado por Len Ponzio, visando distinguir o novo filme formado na kombucha de sua cultura mãe inicial, o que com o passar dos anos, perdeu seu propósito original (JARRELL; CAL; BENNETT, 2000; MELO *et al.*, 2021; SOARES; LIMA; SCHMIDT, 2021).

Este consórcio microbiano, é considerado um tipo de celulose bacteriana. Esta celulose, possui microfibrilas 100 vezes menores que as de celulose vegetal, portanto, tem sido utilizado como fonte alternativa na substituição da mesma. Além disso, o processo de branqueamento da celulose bacteriana é menos agressivo e com a utilização de reagentes menos tóxicos, quando comparado à celulose vegetal (LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANAIN, 2021).

Estudos realizados mostram que na composição do SCOBY, além de celulose, pode-se encontrar proteína bruta, fibra bruta, lipídio bruto, fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN), além de minerais e aminoácidos como potássio, fósforo, cálcio, magnésio, sódio, zinco, ácido glutâmico e lisina (LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANAIN, 2021).

Quanto à composição microbiana, pode-se observar as principais bactérias e leveduras na Figura 5, sendo, em sua maioria, bactérias ácido lácticas. A principal delas para a formação do SCOBY, devido ao poder de produção de celulose, é do gênero *Komagataeibacter* (2012), anteriormente chamado de *Gluconacetobacter*, a *Komagataeibacter xylinus* ou *Acetobacter xylinum* como era conhecida. Já as oito comunidades microbianas mais citadas são: *Gluconacetobacter saccharivorans*, *Acetobacter* sp., *Gluconacetobacter* sp., *Gluconacetobacter europaeus*, *Acetobacter aceti*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Arxula adenivorans*. Porém, diferentes condições como origem do SCOBY, clima, localização geográfica, tipo de chá, tipo de açúcar utilizado, temperatura e tempo de fermentação, podem afetar quantitativamente e qualitativamente a composição do mesmo (ANTOLAK; PIECHOTA; KUCHARSKA, 2021; COELHO *et al.*, 2020; HOHMANN; KUNZ; VANDRESEN, 2020; SANTOS, 2016; SOARES; LIMA; SCHMIDT, 2021).

Figura 5 – Microrganismos presentes no SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*).

| Bacteria                            | Yeast                           |                                    |
|-------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| <i>Acetobacter</i> sp.              | <i>Arxula adenivorans</i>       | <i>Kluyveromy</i>                  |
| <i>Acetobacter aceti</i>            | <i>Brettanomyces lambicus</i>   | <i>Lachancea thermotolerans</i>    |
| <i>Acetobacter pasteurianus</i>     | <i>Brettanomyces claussenii</i> | <i>Lachancea fermentati</i>        |
| <i>Acetobacter nitrogenifigens</i>  | <i>Brettanomyces custersii</i>  | <i>Lachancea kluyveri</i>          |
| <i>Acetobacter peroxydans</i>       | <i>Candida kefyr</i>            | <i>Merimblaingelheimense</i>       |
| <i>Bacterium gluconicum</i>         | <i>Candida krusei</i>           | <i>Meyerozyma caribbic</i>         |
| <i>Enterobacter cancerogenus</i>    | <i>Candida stellata</i>         | <i>Meyerozyma guilliermondii</i>   |
| <i>Enterobacter cloacae</i>         | <i>Candida stellimalicola</i>   | <i>Mycoderma</i> sp.               |
| <i>Enterobacter ludwigii</i>        | <i>Candida tropicalis</i>       | <i>Mycotorula</i> sp.              |
| <i>Gluconacetobacter kombuchae</i>  | <i>Candida parapsilosis</i>     | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>    |
| <i>Gluconacetobacter europaeus</i>  | <i>Debaryomyces hansenii</i>    | <i>Saccharomyces ludwig</i>        |
| <i>Gluconobacter saccharivorans</i> | <i>Dekkera anomala</i>          | <i>Saccharomycodes ludwigii</i>    |
| <i>Gluconobacter oxydans</i>        | <i>Dekkera bruxellensis</i>     | <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> |
| <i>Komagataeibacter xylinus</i>     | <i>Eremothecium ashbyii</i>     | <i>Schizosaccharomyces pombe</i>   |
| <i>Komagataeibacter rhaeticuse</i>  | <i>Eremothecium cymbalariae</i> | <i>Starmeraamethionina</i>         |
| <i>Komagataeibacter hansenii</i>    | <i>Halomonas</i> sp.            | <i>Starmeracaribae</i>             |
| <i>Lactobacillus fermentum</i>      | <i>Hanseniaspora uvarum</i>     | <i>Pichia fermentans</i>           |
| <i>Oenococcus oeni</i>              | <i>Hanseniaspora meyeri</i>     | <i>Pichia mexicana</i>             |
|                                     | <i>Hanseniaspora valbyensis</i> | <i>Sporopachydermialactativor</i>  |
|                                     | <i>Hanseniaspora vineae</i>     | <i>Torulasporea delbrueckii</i>    |
|                                     | <i>Herbaspirillum</i> sp.       | <i>Torulopsis</i> sp.              |
|                                     | <i>Kazachstania telluris</i>    | <i>Zygowilliopsis californica</i>  |
|                                     | <i>Kazachstania exigua</i>      | <i>Zygosaccharomyces bailii</i>    |
|                                     | <i>Kloeckera apiculata</i>      |                                    |

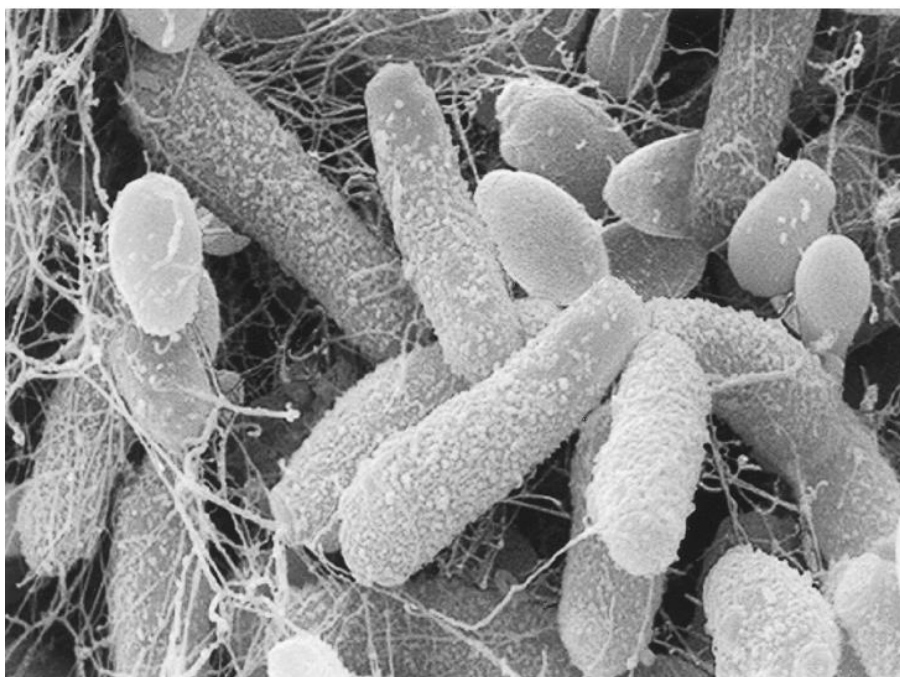
Fonte: SOARES; LIMA; SCHMIDT, 2021.

Além das bactérias e leveduras citadas na figura acima, diversos autores relatam a presença de outros microrganismos como *Brettanomyces intermedius*, *Candida famata*, *Candida obtusa*, *Candida colliculosa*, *Pichia membranaefaciens*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Acetobacter intermedius*, *Acetobacter peroxydans*, *Komagataeibacter medellinensis*, *Komagataeibacter nataicola*, *Saccharomyces bisporus*, *Starmerella davenpoortii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, bactérias dos gêneros *Allobaculum*, *Ruminococcaceae*, *Propionibacterium*, *Thermus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* e *Bifidobacterium*. *R. mucilaginosa* é uma levedura contaminante, considerada comum em alimentos e bebidas, estando presente naturalmente no ambiente (ANTOLAK; PIECHOTA; KUCHARSKA, 2021; COELHO *et al.*, 2020; GREENWALT;

STEINKRAUS; LEDFORD, 2000; PALUDO, 2017; SANTOS, 2016; TEOH; HEARD; COX, 2004; VILLARREAL-SOTO *et al*, 2018).

A atividade da enzima citocromo oxidase é utilizada para caracterizar a relação simbiótica que ocorre no consórcio. Através de tal atividade, descobriram que as bactérias e leveduras presentes, estão dispostas em bandas e camadas dentro da rede de celulose. A Figura 6 demonstra através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), a presença de *Acetobacter* e *Saccharomyces* dentro da matriz celulósica (GREENWALT; STEINKRAUS; LEDFORD, 2000).

Figura 6 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *SCOBY* contendo *Acetobacter* e *Saccharomyces* dentro da matriz de celulose.



Fonte: GREENWALT; STEINKRAUS; LEDFORD, 2000.

Soares, Lima e Schmidt (2021) citam que os microrganismos fermentadores como *Zygosaccharomyces* sp., *Torulaspora delbrueckii* e *Schizosaccharomyces pombe* mostram-se presentes no início do processo fermentativo, enquanto os microrganismos ácidos-tolerantes como a *Dekkera* sp. e *Candida stellata*, são encontrados apenas após a fermentação do ácido acético. Já Antolak, Piechota e Kucharska (2021) citam que dos microrganismos presentes, as leveduras são as principais produtoras de etanol, enquanto as bactérias, utilizam esse etanol, fazendo sua conversão em ácidos diversos.

As películas de *SCOBY*, mãe e filhos, formam-se em camadas de baixo para cima,

onde o filme mais próximo ao topo/superfície é sempre o filme mais recente, e o último, na parte de baixo da fermentação, é a “kombucha mãe” ou “SCOBY mãe”. Estes filmes podem ser facilmente separados. A cada 2 ou 3 dias um novo filme é formado e, com o crescimento dele, ocorre a indução para formação de novas membranas mais espessas. O formato depende do recipiente onde foi colocado, pois ele irá adotar o formato do local onde irá ocorrer o processo fermentativo. A sua espessura e coloração variam de acordo com o tempo de fermentação, concentração de açúcar e chá utilizado. Conforme o tempo de fermentação passa, algumas modificações na comunidade de leveduras são observadas, porém, quanto as bactérias, nenhuma alteração foi notada. Esse biofilme formado, auxilia na fixação e proteção das células em condições desfavoráveis como radiação ultravioleta, alta pressão hidrostática e outros desafios ambientais, além de ajudar a expor as bactérias à um ambiente aeróbico, essencial para o processo fermentativo e possuir atividade capaz de inibir o crescimento de potenciais bactérias patogênicas contaminantes (COELHO et al., 2020; LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANAIN, 2021; SANTOS, 2016).

Algumas características físicas devem ser observadas para sugerir uma cultura microbiana de qualidade. A espessura do biofilme deve variar entre 6 mm e 12 mm, pois caso seja muito fino pode ser facilmente contaminado ou, se muito grosso, pode dificultar a passagem de oxigênio, além de sua coloração, a qual, deve variar de branco à marrom claro. SCOBY’S saudáveis sempre irão produzir novas culturas e, estas, devem ser resistentes à ruptura quando pressionadas entre o polegar e o dedo indicador (SOARES; LIMA; SCHMIDT, 2021).

Para a caracterização do SCOBY diversas técnicas podem ser utilizadas como: microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), onde a conformação das fibras será analisada; difração em raios-X (DRX), onde analisa-se as diferentes formas da celulose e sua cristalinidade e; análise termogravimétrica onde descobre-se a temperatura de degradação, a qual, ocorre em torno de 298°C. Pode-se utilizar também como análise correlata a termogravimétrica, o DSC (*Differential Scanning Calorimetry*), que apesar de possuir como finalidade a análise das transições de fase (sólido, líquido e gasosos) de um material, também nos mostra o ponto de degradação da celulose. Por fim, pode-se realizar o FT-IR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), onde apresentam-se as faixas de transmitância do material, tendo como característicos para o SCOBY 5 grupos funcionais: ligação de hidrogênio grupo O-H em 3345 cm<sup>-1</sup>, carboxila grupo CH<sub>2</sub> em 2898 e 1314 cm<sup>-1</sup>, grupos H-O-H entre 1644 e 1650 cm<sup>-1</sup> para taxa de absorção de água, polihidroxila grupo C-O

em  $1107\text{ cm}^{-1}$  indicando formação do mesmo a partir da glicose e seus derivados, e grupo C-O-C entre  $1050$  e  $1055\text{ cm}^{-1}$ , indicando ligação glicosídica de um polímero, no caso, a celulose (ADITIAWATI *et al.*, 2021; LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANAIN, 2021).

### 3.6 PROCESSO DE BRANQUEAMENTO DA CELULOSE

O processo de branqueamento difere entre a celulose microbiana e a celulose vegetal. Enquanto a celulose vegetal necessita de um processo de purificação e branqueamento extremamente complexo, demorado, dispendioso e altamente poluente, a celulose bacteriana possui processo de purificação simples, barato e amigo do ambiente. Além disso, a celulose microbiana não gera efluentes tóxicos durante seu processo de branqueamento. Já o processo de purificação e branqueamento da CV é responsável pela maior carga de efluentes das indústrias de polpa celulósica, cerca de  $20\text{-}40\text{ m}^3$  são gerados por tonelada de polpa produzida. Isso contribui com 50% da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (AMARAL *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2017; OLIVEIRA; CARMINATTI, 2016).

O branqueamento é um processo físico-químico que visa branquear a polpa celulósica por meio da remoção e/ou modificação das substâncias que proporcionam a cor à polpa, melhorando sua alvura. Alguns parâmetros são considerados nesse processo, como: mínima danificação as fibras, mínima formação de grupos carbonila, baixa perda de rendimento, baixo custo e mínimo impacto ambiental. A principal função do branqueamento na celulose vegetal é a remoção da hemicelulose e lignina ou de resíduos de lignina que fiquem presentes de tratamentos anteriores. Na celulose microbiana, este tratamento possui função de remoção de resíduos secundários do processo fermentativo, como ácidos nucleicos e metabólicos das bactérias, células mortas e resíduo dos açúcares e chá utilizados (AZEVEDO, 2011; SEDERAVIČIŪTĒ; BEKAMPIENĒ; DOMSKIENĒ, 2019).

Os agentes de branqueamento utilizados são: oxidantes (Cloro (C)), dióxido de carbono (D), oxigênio (O), ozônio (Z), peróxido de hidrogênio (P) e agentes alcalinos (E). Durante este processo, a lignina e outros cromóforos que conferem cor a celulose, são oxidados, tornando-se solúveis em meio alcalino. A maioria dos agentes oxidantes possuem cloro em sua base, tendo toxicidade elevada. Além disso, outros compostos tóxicos gerados durante a extração são os clorofenóis, cloroligninas, ácidos orgânicos, resinas ácidas, dioxinas e seus derivados, além da presença das próprias fibras residuais (ALMEIDA, 2002; AMARAL *et al.* 2013; AZEVEDO, 2011).

O processo de purificação e branqueamento da celulose bacteriana é relativamente simples e fácil quando comparado ao utilizado para a CV. Este, não produz grande quantidade de efluentes tóxicos e possui alto índice de pureza, pois a celulose microbiana é livre de hemicelulose e lignina. Por ser bastante simples, constitui-se basicamente na lavagem da BC com água por diversas vezes ou na utilização de tratamento alcalino, visando a lise das células. Por conta desses fatores, a BC tem se apresentado como uma importante alternativa na substituição da celulose vegetal (GRUBE *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2015).

O tratamento alcalino consiste basicamente na aplicação de NaOH, porém, outras soluções também podem ser utilizadas como KOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pode ser seguido de uma incubação em HCl e neutralização com ácido acético ou aquecimento e fervura (GRUBE *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2015; SEDERAVIČIŪTĖ; BEKAMPIENĖ; DOMSKIENĖ, 2019). Através da utilização de processos mais agressivos ou da utilização de mais de uma etapa no processo de branqueamento, ocorre alteração da celulose I ou celulose nativa para celulose II ou III (GRUBE *et al.*, 2016; SEDERAVIČIŪTĖ; BEKAMPIENĖ; DOMSKIENĖ, 2019; SOARES; LIMA; SCHMIDT, 2021). Diversos autores citam a utilização de NaOH no processo de branqueamento em diferentes concentrações e tempo/temperatura: NaOH 0,1 M à 30°C por 20 minutos, NaOH à 80°C por 20 minutos (JARAMILLO, 2014; SEDERAVIČIŪTĖ; BEKAMPIENĖ; DOMSKIENĖ, 2019), NaOH 1 M e 4 M, NaOH 0,5%, 1%, 2% e superiores (em geral, não ultrapassa 5%, pois concentrações acima de 6% podem alterar a estrutura cristalina da celulose), com tempos que chegam a 6/7 dias, à uma temperatura de 70°C/80°C ou fervura à 100°C com tempo variando entre 30 minutos à 48 horas (LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANIAN, 2021; LIMA *et al.*, 2015; SEDERAVIČIŪTĖ; BEKAMPIENĖ; DOMSKIENĖ, 2019). Além disso, citam a combinação de outros reagentes junto ao NaOH, como: NaOH 1 M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% à 80°C por 1h (LIMA *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2018; SEDERAVIČIŪTĖ; BEKAMPIENĖ; DOMSKIENĖ, 2019; NASCIMENTO *et al.*, 2019) ou a utilização de NaOH precedido de lavagem em água destilada: lavagem por 3 dias, com 5 trocas de água diárias, após, aquecimento à 80°C por 50 minutos e adição de NaOH 0,1 M (SEDERAVIČIŪTĖ; BEKAMPIENĖ; DOMSKIENĖ, 2019) ou lavagem da membrana em 1 L de água destilada e após adição de 2 L de NaOH 2% à 80°C por 1h SEDERAVIČIŪTĖ; BEKAMPIENĖ; DOMSKIENĖ, 2019). Outros reagentes como: KOH 5% em temperatura ambiente por 14h (SEDERAVIČIŪTĖ; BEKAMPIENĖ; DOMSKIENĖ, 2019), dodecil sulfato de sódio 2% à 60°C (SEDERAVIČIŪTĖ; BEKAMPIENĖ; DOMSKIENĖ, 2019) e hidróxido de sódio 1,0 M à 90°C seguido da adição

de hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio também são citados (LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANIAN, 2021). Todos os processos de branqueamento são seguidos de lavagem dos filmes de celulose em água destilada para remoção total dos reagentes utilizados. A intensidade do branqueamento depende da espessura da membrana (LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANIAN, 2021; SOARES; LIMA; SCHMIDT, 2021).

### 3.7 APLICAÇÕES COMERCIAIS – CELULOSE BACTERIANA E *SCOPY*

A associação simbiótica de bactérias e leveduras *SCOPY*, tem se apresentado como importante alternativa na indústria têxtil. Sua principal relevância é como potencial substituto do algodão, pois possui textura flexível, é considerado mais barato e ecológico, degrada de forma rápida e possui coloração marrom próxima ao do couro. As únicas desvantagens visando sua utilização em larga escala são o fato de as peças produzidas absorverem água facilmente, o que faz com que o *SCOPY* volte ao seu formato original, e a difícil produção em grandes quantidades, principalmente pela espessura dos filmes gerados (ADITIAWATI *et al.*, 2021).

A celulose bacteriana possui características singulares quanto trata-se de aplicações comerciais, como boas propriedades mecânicas, capacidade de absorção de água, porosidade, estabilidade e moldabilidade. Vem sendo empregada nas mais diversas áreas, como: têxtil, médica e biomédica, biotecnologias, nanotecnologias e eletrônicos, meio ambiente, cosméticos, indústria alimentícia e farmacêutica, fabricação de papel, equipamentos militares, entre outras. A sua primeira utilização foi na área de alimentos, como “nata de coco” ou “polpa de coco”, resultado da fermentação da água de coco. Originária nas Filipinas, na década de 1990, é produzida em forma de grossas camadas de celulose, as quais, são cortadas em pequenos cubos uniformes, lavadas, fervidas e cozidas com açúcar, sendo consumidas juntamente com sobremesas de baixa caloria, saladas, coquetéis de frutas, geleias e refrescos. Vem ganhando notável popularidade em países como Japão, Coreia e Estados Unidos da América (COELHO *et al.*, 2020; GRANDE *et al.*, 2009a; GRANDE *et al.*, 2009b; GRUBE *et al.*, 2016; JARAMILLO *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2015; SANTOS, 2016; VIEIRA, 2013).

Dentro da área médica, biomédica e da odontologia existe uma infinidade de aplicações, como em regeneração tecidual, curativos, processo de cicatrização de feridas como substituto da pele natural, andaimes na engenharia de tecidos, reconstrução de



cartilagens, substituto de vasos sanguíneos e recuperação de tecido periodontal. Por ser biocompatível, atóxica, antialérgica, esterilizável, possuir boa resistência, ser seletivamente permeável e de custo acessível, sua maior utilização tem sido na regeneração tecidual guiada (RTG) *in vivo*. A RTG trabalha o processo de cicatrização natural do indivíduo, buscando sempre resultados mais próximos aos produzidos pelo próprio organismo. Quando a lesão tecidual ocorre, há preenchimento por tecido fibroso na área afetada, por isso, é necessário a inserção de uma barreira física, nesse caso, uma membrana de celulose microbiana, para que tal tecido não seja formado. A BC tem apresentado grande potencial de aplicação em processos cicatrizativos, sendo utilizada em situações de queimaduras superficiais e profundas, dermoabrasões mecânicas, escaras de decúbito e úlceras por estase venosa e/ou arterial. Tem sido utilizada também em cirurgias neurológicas como *stents* para substituição da dura-máter em casos de tumores e traumas e na produção de medicamentos, principalmente antibióticos (CARREIRA *et al.*, 2011; GRANDE *et al.*, 2009a; GRANDE *et al.*, 2009b; KUKHARENKO *et al.*, 2014; SHARMA; BHARDWAJ, 2019; VIEIRA, 2013).

Cavalcanti e colaboradores (2017) realizaram estudos para avaliar a eficácia da utilização de membranas de celulose bacteriana no tratamento de úlceras venosas em membros inferiores. No total, 25 pacientes foram testados, durante 120 dias. As membranas apresentaram bons resultados como curativo para tratamento das úlceras, reduzindo sua extensão e a dor local, interrompendo de forma precoce o uso de analgésicos e sem apresentar processo infeccioso ou reações inflamatórias. Já Maia *et al.* (2019) realizaram estudos semelhantes, visando avaliar o uso de curativos produzidos em forma de filme associados à um gel, ambos feitos a partir de celulose microbiana, para tratamento de feridas isquêmicas em membros inferiores, após a realização da cirurgia de revascularização. 24 pacientes foram avaliados por um período de 90 dias, observando-se redução de 55% da extensão das feridas nos primeiros 30 dias e, ao final, a taxa de cicatrização total foi de 34,8%, indicando que o filme associado ao gel, pode ser uma alternativa no tratamento desse tipo de ferida.

Silveira e colaboradores (2016) e Pinho *et al.* (2020) realizaram enxertos de celulose microbiana em pacientes com perfuração da membrana do tímpano, demonstrando que a celulose bacteriana é eficiente para o tratamento deste tipo de lesão, sendo segura, de baixo custo, com cirurgia minimamente invasiva e ajudando na recuperação funcional e sintomática imediata.

Coelho *et al.* (2019) desenvolveram lentes de contato a partir de celulose bacteriana e avaliaram a toxicidade do material visando garantia da segurança para futuras

comercializações por parte da indústria. Não houve identificação de citotoxicidade, porém, os pesquisadores identificaram genotoxicidade nas lentes. Apesar de terem apresentado boa cristalinidade, transparência e aplicabilidade, são necessários mais estudos para eliminação da toxicidade observada e possível comercialização.

No campo tecnológico, biotecnológico e de eletrônicos, a celulose bacteriana vem sendo empregada como diafragma em fones de ouvido, dispositivos de áudio, papel eletrônico, transdutores eletroacústicos, componente de dispositivos ópticos de alta precisão, biossensores, composição de telas de cristal líquido e suporte OLED (CARREIRA *et al.*, 2011; GRANDE *et al.*, 2009a; OLIVEIRA; CARMINATTI, 2016).

Na indústria de alimentos, por conta de sua alta pureza, hidrofiliçidade, capacidade de absorção de líquidos e flexibilidade, vem sendo utilizada na produção de produtos fermentados, iogurtes, em açúcar fermentável, como aditivo alimentar de baixa caloria, substituto de gordura, espessante, estabilizante, modificador de textura e em embalagens alimentícias. Além de seu consumo como “nata de coco”, vem sendo testado o SCOBY da kombucha como “nata de kombucha” (JARAMILLO *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2018; SANTOS, 2016; VIEIRA, 2013).

Azeredo *et al.* (2019) em seus estudos, indicou diversas aplicações para biomembranas de celulose em alimentos: substituta de gordura em bolos, emulsificante de produtos cárneos e queijos e na produção de almôndegas e surimi. Em almôndegas, quando utilizada como substituta total da gordura (20%), apresentou perdas durante o cozimento e amolecimento, dificultando a aceitação por partes dos consumidores, porém, quando utilizada na quantidade de 10% (metade do teor de gorduras permitido em almôndegas), apresentou boas propriedades sensoriais e vida de prateleira longa. Além disso, uma possibilidade, seria também, a utilização de BC como substituta dos óleos parcialmente hidrogenados (PHO's). Outras aplicações também são citadas como espessante, estabilizante, emulsificante, no processo de gelificação e aglutinação de água, em sorvetes (como estabilizadora da emulsão ou substituto da gordura), imobilizadora de probióticos e enzimas digestivas, filmes comestíveis aplicados como embalagens e em embalagens não comestíveis também, de forma total ou visando o reforço de embalagens já existentes.

Nas áreas ligadas ao meio ambiente, a utilização tem sido para tratamento de lixos (reciclagem de minerais e óleos), água, purificação de esgotos e efluentes, provenientes tanto da indústria como do setor agrícola. Além disso, a celulose produzida a partir do SCOBY da kombucha, vem sendo utilizada na remoção de metais pesados em soluções aquosas, com

potencial para tratamentos de águas contaminadas por Pb (II), Ni (II), Zn (II), Hg<sup>2+</sup>, As<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup> e Cr<sup>6+</sup> (LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANAIN, 2021; SANTOS, 2016; LIMA *et al.*, 2017; OLIVEIRA; CARMINATTI, 2016; SANTOS, 2016; SOARES; LIMA; SCHMIDT, 2021; VIEIRA, 2013).

Mousavi e colaboradores (2018) utilizaram celulose bacteriana obtida através do SCOBY de kombucha como adsorvente para remover íons Pb(II) de soluções aquosas e observaram que esta possui grande eficiência na remoção dos mesmos. Nos primeiros 15 minutos, 50% deles já haviam sido eliminados e, ao final do processo, a eficiência de eliminação foi de 99,73%, demonstrando que a BC possui excelente potencial na remoção de contaminantes em águas residuais.

Na área de combustíveis, mineração e refinaria tem sido testada para resolução de problemas corrosivos na indústria petroleira e naval, biorrefinação, recuperação de petróleo, células de combustível, esponjas para coletas de vazamentos de óleo e materiais para absorção de toxinas (LIMA *et al.*, 2017; OLIVEIRA; CARMINATTI, 2016; SANTOS, 2016; SOARES; LIMA; SCHMIDT, 2021; VIEIRA, 2013).

Na indústria de papel, vem sendo utilizada na produção do mesmo visando aumentar sua resistência, por conta das propriedades mecânicas e alta estabilidade térmica, além de substituto da madeira e da celulose vegetal (GRANDE *et al.*, 2009a; LIMA *et al.*, 2017; OLIVEIRA; CARMINATTI, 2016).

Na área de cosméticos como estabilizante para emulsões em cremes, tônicos, condicionares e polidores de unha, além do uso em dermofarmacêuticos para tratamento de doenças de pele, mucosas e sinais de envelhecimento, pois possui bom efeito rejuvenescedor devido a sua adstringência, baixo pH e o fato de inibir bactérias que causem espinhas e manchas (LIMA *et al.*, 2017; OLIVEIRA; CARMINATTI, 2016; SOARES; LIMA; SCHMIDT, 2021).

Na indústria têxtil tem sido amplamente utilizada como couro vegano, na fabricação de roupas (principalmente esportivas), calçados, joias, e bolsas, além de tendas e equipamentos para *camping*. Suzanne Lee, *designer* nova-iorquina criou peças de vestuário a partir do SCOBY da kombucha desidratada, em grandes dimensões, lavadas, secas, cortadas e cozidas como tecidos, como mostra a Figura 7. O grande problema dessas roupas, é o fato de a celulose absorver água em alta quantidade, desta forma, em dias chuvosos, as roupas inchariam e desfariam a costura, além disso, após seco, em dias frios, o tecido ficaria

extremamente quebradiço (NASCIMENTO *et al.*, 2021; OLIVEIRA; CARMINATTI, 2016; SANTOS, 2016; SOARES; LIMA; SCHMIDT, 2021).

Figura 7 – Peças de vestuário produzidas a partir do *SCOB*Y da kombucha.



Fonte: SANTOS, 2016.

Sepúlveda e colaboradores (2016) testaram membranas de celulose microbianas e membranas adicionadas de polipropileno para tratamento regenerativo de úlcera de córnea em coelhos, porém, não obtiveram bons resultados, após cerca de 45 dias de realização do implante houve inflamação crônica ocular e alteração nas fibras de colágeno do olho. Por fim, na medicina veterinária, a celulose bacteriana vem sendo utilizada a partir do *SCOB*Y presente na bebida kombucha como suplemento proteico na ração e água de pintainhos, fazendo com que o consumo de ambos aumente, além do aumento de peso e fator de conversão/produção das aves, não apresentando nenhum sinal de anormalidade ou mortalidade. Estudos investigaram também a utilização da celulose bacteriana na saúde de ovelhas, no entanto, não foram obtidos resultados significativos quando ao ganho de peso, nem em exame de sangue ou fezes, visando o controle parasitário. O único efeito benéfico observado foi com relação a problemas respiratórios que os animais apresentavam (COELHO *et al.*, 2020; SANTOS, 2016; SOARES; LIMA; SCHMIDT, 2021).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia encontra-se dividida em duas fases. A primeira fase foi realizada nas dependências da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, *campus* Laranjeiras do Sul – PR. Na segunda fase, duas análises instrumentais avançadas (microscopia eletrônica de varredura – MEV e difração por raios X – DRX) foram realizadas no Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-LABMU) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

### 4.1 MATERIAIS

Para a produção dos chás e processos fermentativos realizados, em ambas as fases, utilizou-se ao total 300 g chá verde (*Camellia sinensis*) (lote: 001/G3575), 3 kg de açúcar cristal (Alto Alegre®) e 40 L de água destilada. Além disso, foram utilizados 4 bequer de 2 L, 4 peneiras, 2 cubas de vidro retangulares, 10 bandejas plásticas, estufa incubadora (Nova Instruments® NII718), balança semi-analítica de precisão (Marte® BL420H) e estufa de cultura e bacteriologia (410/\*NDRE Ethik Technology®).

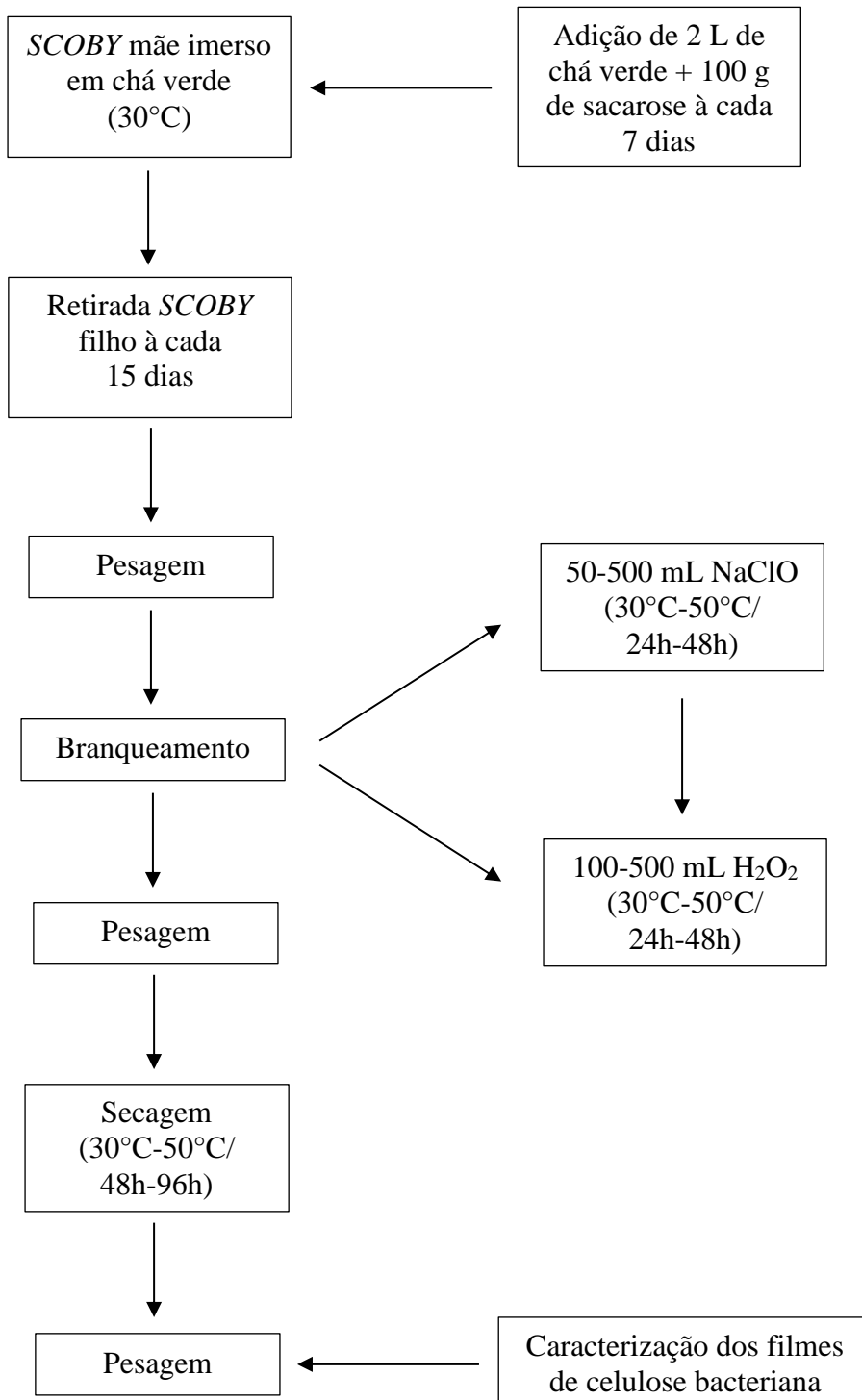
Para o processo de branqueamento, secagem e obtenção final dos filmes, em ambas as fases, utilizou-se ao total 5,2 L de hipoclorito de sódio (NaClO) (10% Êxodo Científica®), 3,6 L de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (35% Êxodo Científica®) e aproximadamente 10 L de água destilada (H<sub>2</sub>O). Além disso, foram utilizados 18 sacos plásticos, paquímetro digital (Insize® series 1112), estufa com circulação de ar (American Lab® AL-102/480) e seladora à vácuo (Jetvac® JET40). As estufas utilizados na produção dos chás e nos processos fermentativos e a balança semi-analítica de precisão (Marte® BL420H), também foram utilizados durante essa parte do experimento.

Para a caracterização dos filmes, em ambas as fases, utilizaram-se os seguintes equipamentos: FT-IR IRTracer-100 (Shimadzu®), DSC 214 Polyma (NETZSCH®), colorímetro portátil 160 (Konica Minolta® CHROMA METER CR400/410), DRX Ultima IV (Rigaku®) e MEV Mira 3 (TESCAN®). Além disso, utilizou-se também sal de cozinha (Moc®) e cloreto de cálcio anidro (CaCl<sub>2</sub>) (P.M. 111.00).

### 4.2 METODOLOGIA - PRIMEIRA FASE

A primeira fase está apresentada no fluxograma contido na Figura 8.

Figura 8 – Fluxograma das etapas realizadas na primeira fase.



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

#### 4.2.1 Produção dos chás e processo fermentativo da kombucha

As produções dos chás e processo fermentativo foram realizados em duplicata.

Para a produção dos chás, seguiu-se o exposto por Greenwalt, Steinkraus e Ledford (2000), com adaptações, onde utilizou-se 20g de folhas de chá verde (*Camellia sinensis*), 100 g açúcar cristal e 2 L de água destilada (proporção: 10 g chá + 50 g sacarose para 1 L de água). Inicialmente, fervia-se a água e adicionava-se o chá, deixando-o em fervura por 10 minutos. Após, em um bequer de vidro de 2 litros, o chá era despejado, passando por coagem com peneira e adicionado do açúcar. Deixava-se esfriar até atingir aproximadamente 30°C.

O processo fermentativo também seguiu o exposto por Greenwalt, Steinkraus e Ledford (2000). Inicialmente, pegou-se duas cubas de vidro, limpas e esterilizadas e nelas adicionou-se um *SCOBY* proveniente de kombucha já existente na universidade. Após, despejou-se o chá feito anteriormente e transferiu-se uma alíquota de 100 mL de kombucha pré existente (a mesma de onde foram pegos os *SCOBY*'s). As cubas foram levadas e incubadas em estufa incubadora à 30°C. A cada 7 dias eram adicionados 2 L de chá em cada uma das cubas, de acordo com o exposto acima e a cada 14 dias, o filme superior formado, também chamado de *SCOBY* filho, era retirado, pesado em balança semi-analítica de precisão e seguia para as próximas etapas, visando a obtenção de membranas de celulose bacteriana ao final do processo.

#### **4.2.2 Obtenção dos filmes de celulose bacteriana**

O filme (*SCOBY* filho) era retirado de cada uma das cubas, sendo submetido à sucessivas lavagens com água destilada para remoção dos resíduos maiores provenientes do processo fermentativo da kombucha e deixado escorrer o líquido residual em uma peneira. Em seguida, eram pesados em balança semi-analítica de precisão e iniciava-se o processo de branqueamento.

Para o processo de branqueamento seguiu-se metodologias propostas por Amarasekara, Wang e Grady (2020), Pessoa Junior, Takeno e Manzato (2017) e Lima (2014) com as devidas adaptações. Nele, os filmes foram colocados em bandejas plásticas onde adicionou-se água destilada (H<sub>2</sub>O), hipoclorito de sódio (NaClO) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Na Tabela 1, apresentam-se as diferentes quantidades de reagentes utilizadas e o tempo e temperatura em que o processo foi realizado. Depois, eram levados para estufa incubadora com tempo e temperatura controlados conforme apresentado na tabela. O processo de branqueamento era realizado com o intuito de remover resíduos de células mortas provenientes das bactérias presentes no processo fermentativo e no próprio *SCOBY* e remover

resíduos do chá e açúcar. Além disso, buscou-se testar diferentes quantidades de reagentes, tempo e temperatura de processo, visando a obtenção dos melhores parâmetros quanto à homogeneidade, coloração, maleabilidade e outros aspectos visuais dos filmes.

Tabela 1 – Dados do processo de branqueamento – primeira fase.

|                         | <b>Reagentes</b>   | <b>Tempo/<br/>Temperatura</b> |
|-------------------------|--|-------------------------------|
| <b>Branqueamento 1</b>  | 500 mL H <sub>2</sub> O + 100 mL NaClO (48h)<br>+ 100 mL H <sub>2</sub> O + 200 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (24h) | 72h/30°C                      |
| <b>Branqueamento 2</b>  | 500 mL H <sub>2</sub> O + 50 mL NaClO (48h) +<br>100 mL H <sub>2</sub> O + 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (24h)  | 72h/30°C                      |
| <b>Branqueamento 3</b>  | 500 mL H <sub>2</sub> O + 250 mL NaClO (24h)<br>+ 100 mL H <sub>2</sub> O + 250 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (72h) | 96h/45°C                      |
| <b>Branqueamento 4</b>  | 500 mL H <sub>2</sub> O + 500 mL NaClO (24h)<br>+ 100 mL H <sub>2</sub> O + 500 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (48h) | 72h/45°C                      |
| <b>Branqueamento 5</b>  | 250 mL H <sub>2</sub> O + 500 mL NaClO (48h)<br>+ 100 mL H <sub>2</sub> O + 300 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (48h) | 96h/40°C                      |
| <b>Branqueamento 6</b>  | 250 mL H <sub>2</sub> O + 250 mL NaClO (48h)<br>+ 100 mL H <sub>2</sub> O + 200 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (48h) | 96h/40°C                      |
| <b>Branqueamento 7</b>  | 500 mL H <sub>2</sub> O + 300 mL NaClO (48h)<br>+ 100 mL H <sub>2</sub> O + 400 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (48h) | 96h/40°C                      |
| <b>Branqueamento 8</b>  | 300 mL H <sub>2</sub> O + 250 mL NaClO (48h)<br>+ 100 mL H <sub>2</sub> O + 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (48h) | 96h/40°C                      |
| <b>Branqueamento 9</b>  | 500 mL H <sub>2</sub> O + 300 mL NaClO (48h)<br>+ 100 mL H <sub>2</sub> O + 150 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (48h) | 96h/50°C                      |
| <b>Branqueamento 10</b> | 500 mL H <sub>2</sub> O + 300 mL NaClO (48h)<br>+ 100 mL H <sub>2</sub> O + 200 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (48h) | 96h/50°C                      |

Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Após retirados da estufa onde eram mantidos durante o processo de branqueamento, os filmes eram submetidos novamente à sucessivas lavagens com água destilada, para remoção residual dos reagentes, retirado o excesso de água com papel toalha e levados para nova pesagem em balança semi-analítica de precisão.

Depois de pesados, os filmes seguiam para o processo de secagem em estufa com circulação de ar, com tempo e temperatura descritos na Tabela 2 e ao serem retirados da estufa, eram novamente pesados. Na sequência, os filmes eram colocados em embalagens plásticas e embalados à vácuo em seladora. Estes, eram armazenados em local fechado e escuro, em temperatura ambiente, até a caracterização.



Tabela 2 – Tempo e temperatura de secagem testados na primeira fase.

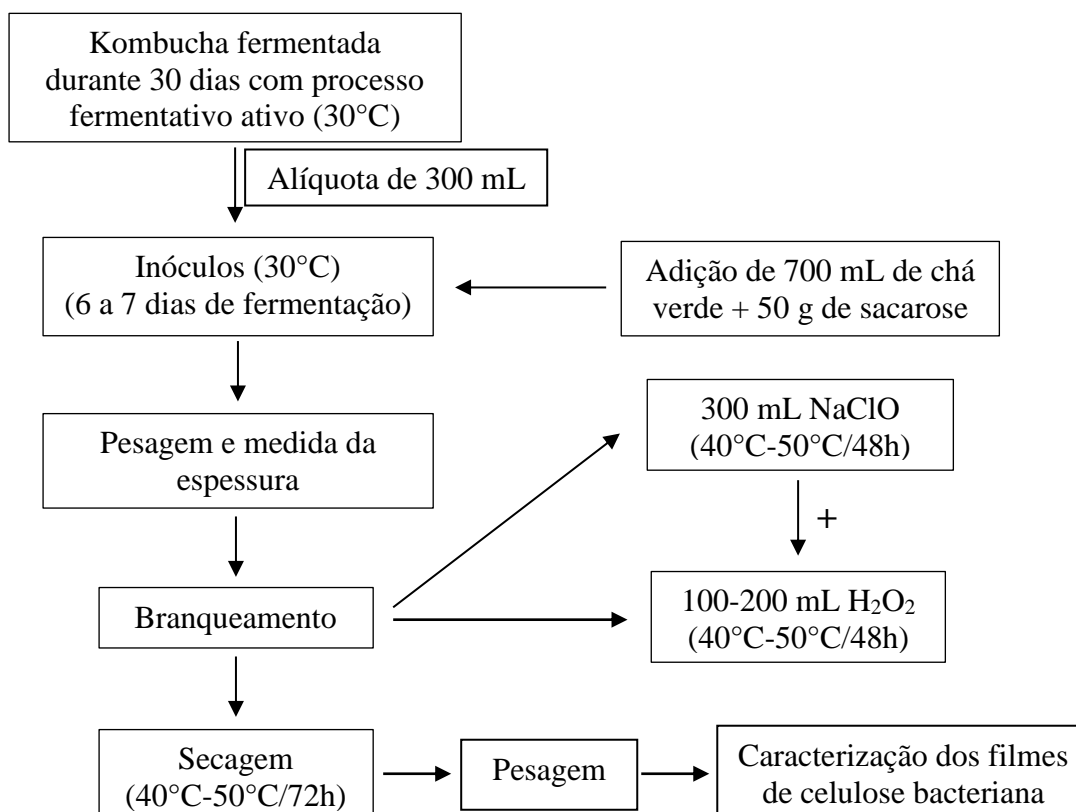
|                         | <b>Tempo/Temperatura</b> |
|-------------------------|--------------------------|
| <b>Branqueamento 1</b>  | 96h/30°C                 |
| <b>Branqueamento 2</b>  | 96h/30°C                 |
| <b>Branqueamento 3</b>  | 72h/45°C                 |
| <b>Branqueamento 4</b>  | 72h/45°C                 |
| <b>Branqueamento 5</b>  | 96h/40°C                 |
| <b>Branqueamento 6</b>  | 72h/40°C                 |
| <b>Branqueamento 7</b>  | 72h/40°C                 |
| <b>Branqueamento 8</b>  | 96h/40°C                 |
| <b>Branqueamento 9</b>  | 48h/50°C                 |
| <b>Branqueamento 10</b> | 48h/50°C                 |

Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

#### 4.3 METODOLOGIA - SEGUNDA FASE

A segunda fase está apresentada no fluxograma contido na Figura 9.

Figura 9 – Fluxograma das etapas realizadas na segunda fase.



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Na segunda fase, de acordo com observações e resultados obtidos na primeira fase, optou-se por padronizar um inóculo para todas as amostras e medir a espessura dos filmes para utilizar esse parâmetro como referência final para a retirada do *SCOBY*. Na etapa de branqueamento trabalhou-se com duas variáveis: quantidade de peróxido de hidrogênio e temperatura de branqueamento/secagem, conforme apresentado na Tabela 3, realizando-se um experimento 2<sup>2</sup>. Toda a fase de produção dos inóculos foi realizada em duplicata.

Tabela 3 – Delineamento experimental 2<sup>2</sup> realizado na segunda fase.

|                  | VARIÁVEIS                                   |                                      |
|------------------|---|--------------------------------------|
|                  | Quantidade<br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Temperatura<br>Branqueamento/Secagem |
| <b>Amostra 1</b> | 200 mL                                      | 50°C                                 |
| <b>Amostra 2</b> | 100 mL                                      | 50°C                                 |
| <b>Amostra 3</b> | 200 mL                                      | 40°C                                 |
| <b>Amostra 4</b> | 100 mL                                      | 40°C                                 |

Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

#### 4.3.1 Produção dos inóculos e processo fermentativo

Nesta fase, realizou-se um processo fermentativo durante 30 dias, utilizando-se os padrões de produção de chá iguais ao do item 4.1.1.

Para a produção do inóculo, foram utilizadas bandejas plásticas (em duplicata), de 3,5 L, limpas e higienizadas com álcool 70°. Em cada uma delas adicionou-se uma alíquota de 300 mL de kombucha retiradas do processo fermentativo de 30 dias. Além disso, adicionou-se 700 mL de chá verde, adoçado com 50 g açúcar cristal, em cada uma. Estas, foram levadas para incubação em estufa de cultura e bacteriologia à 30°C.

O indicativo de que o filme/*SCOBY* estava pronto para ser retirado do processo fermentativo passou a ser sua espessura e não mais o tempo de fermentação. A espessura era medida todos os dias, com paquímetro digital previamente higienizado, até atingir entre 5-6 mm (espessura estabelecida com base na primeira fase). Após atingir o padrão, o *SCOBY* era retirado da bandeja, passando por sucessivas lavagens com água destilada, visando remoção dos resíduos maiores, provenientes do processo fermentativo, seco com papel toalha e pesado em balança semi-analítica de precisão. Após esta etapa, os filmes seguiam para o branqueamento.

### 4.3.2 Obtenção dos filmes de celulose bacteriana

Para obtenção da celulose bacteriana pura, os filmes necessitavam passar por branqueamento, visando remover todos os resíduos de células mortas provenientes das bactérias do próprio SCOBY, além de remover resíduos do chá utilizado e do açúcar. Devido à isso, se realizou o branqueamento conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Dados do processo de branqueamento.

|                  | <b>Reagentes</b>   | <b>Tempo/<br/>Temperatura</b> |
|------------------|--|-------------------------------|
| <b>Amostra 1</b> | 500 mL H <sub>2</sub> O + 300 mL NaClO (48h)<br>+ 100 mL H <sub>2</sub> O + 200 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (48h) | 96h/50°C                      |
| <b>Amostra 2</b> | 500 mL H <sub>2</sub> O + 300 mL NaClO (48h)<br>+ 100 mL H <sub>2</sub> O + 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (48h) | 96h/50°C                      |
| <b>Amostra 3</b> | 500 mL H <sub>2</sub> O + 300 mL NaClO (48h)<br>+ 100 mL H <sub>2</sub> O + 200 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (48h) | 96h/40°C                      |
| <b>Amostra 4</b> | 500 mL H <sub>2</sub> O + 300 mL NaClO (48h)<br>+ 100 mL H <sub>2</sub> O + 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (48h) | 96h/40°C                      |

Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Nesta fase, padronizou-se a quantidade de NaClO utilizada em 300 mL e o tempo de permanência no processo: 48 horas em NaClO e mais 48 horas após adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os reagentes utilizados foram os mesmos da primeira fase.

Finalizado o tempo do processo de branqueamento, os filmes eram retirados, lavados diversas vezes com água destilada para remoção residual dos reagentes, pesados em balança semi-analítica de precisão e seguiam para secagem, em estufa de secagem e esterilização com circulação de ar. O processo de secagem era realizado durante 72 h, com as mesmas temperaturas utilizadas no processo de branqueamento, descritas na Tabela 4.

Depois de secas, as membranas eram pesadas novamente em balança semi-analítica de precisão, colocadas em embalagens plásticas e embaladas em seladora à vácuo. Estas, armazenadas em local fechado, escuro e de baixa umidade, sendo retiradas apenas para seguirem para a caracterização.

### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE CELULOSE

Na primeira fase avaliou-se o rendimento de celulose bacteriana, os aspectos visuais dos filmes, a estrutura química com o auxílio do FT-IR (espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier) e, as propriedades térmicas com o auxílio do DSC (calorimetria diferencial de varredura).

Na segunda fase avaliou-se o rendimento de celulose bacteriana, os aspectos visuais dos filmes obtidos sob diferentes condições do processo branqueamento, análise de cor instrumental, grau de intumescimento, permeabilidade ao vapor de água, FT-IR (espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier), DSC (calorimetria diferencial de varredura), DRX (difração por raios-X) e MEV (microscopia eletrônica de varredura) de superfície e de fratura.

#### **4.4.1 Rendimento de celulose bacteriana correlacionado aos aspectos visuais dos filmes**

O rendimento de celulose bacteriana foi calculado de acordo com a Equação 1, além de observados os aspectos visuais dos filmes durante o processo de branqueamento e pós secagem.

$$R\% = (M_F/M_I) * 100 \quad \text{Equação 1}$$

Sendo:

R% = rendimento de celulose bacteriana em percentagem

M<sub>F</sub> = massa final

M<sub>I</sub> = massa inicial.

#### **4.4.2 Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier – FT-IR**

Para análise de FT-IR, os filmes que estavam secos e embalados a vácuo, foram macerados até virar pó, com a ajuda de um almofariz e pistilo. Após, adicionava-se cerca de 1 g de amostra ou o suficiente para cobrir o cristal de ATR. Com reflectância total atenuada. A análise foi realizada em espectrofotômetro IRTracer-100 da Shimadzu®, com comprimento de onda na região de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>, em resolução de 4 cm<sup>-1</sup>.

#### **4.4.3 Calorimetria diferencial de varredura - DSC**

A análise de DSC foi realizada em equipamento DSC 214 Polyma da NETZSCH®. Para a determinação das curvas de DSC, foram pesados cerca de 3-9 mg de amostra e colocados em recipientes de alumínio (cadinhos). A curva de temperatura utilizada para todas as amostras foi de 0°C à 400°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de nitrogênio com vazão de 50mL/min. Realizou-se também, a curva de DSC de uma amostra controle, a qual, não passou por nenhum processo de branqueamento, apenas por lavagem com água destilada e secagem à 50°C.

#### 4.4.4 Análise de cor instrumental

A análise de cor instrumental foi obtida mediante leitura direta dos filmes em três pontos diferentes utilizando-se colorímetro portátil 160 (Konica Minolta® CHROMA METER CR400/410), previamente calibrado com placa de porcelana branca. As coordenadas de cromaticidade foram realizadas em escala CIEL\*a\*b\*, onde, L\* corresponde a luminosidade de 0 a 100 em preto e branco, a\* indica -a= verde e +a= vermelho e b\* indica -b= azul e +b= amarelo.

#### 4.4.5 Grau de intumescimento (*Q*)

Para determinação do grau de intumescimento (*Q*), 0,8 g de filme de celulose bacteriana foram imersas em 400 mL de água destilada por 72h a 25°C, seguindo o exposto por Vasques (2007). Além disso, realizou-se também, o monitoramento da perda de água das amostras, em função do tempo. Para isso, as amostras foram deixadas à 20°C e, durante o período até fechar 24h, foram pesadas para calcular a perda de massa de água.

O grau de intumescimento foi calculado de acordo com a Equação 2:

$$Q = m_1 - m_2/m_2 \quad \text{Equação 2}$$

Sendo:

*Q* = grau de intumescimento

*m*<sub>1</sub> = massa da amostra imediatamente após retirada da imersão

*m*<sub>2</sub> = massa da amostra seca ao final do processo

#### 4.4.6 Permeabilidade ao vapor de água

Para análise de permeabilidade ao vapor de água utilizou-se o método ASTM E-96 (ASTM, 2015) junto ao descrito por Biduski *et al.* (2017). Os filmes de celulose bacteriana foram colocados em células de permeação de alumínio (“cadinhos”) contendo cloreto de cálcio anidro (CaCl<sub>2</sub>) P.M. 111.00 e selados. Após, foram levadas para dessecadoras contendo solução salina supersaturada (NaCl) à 25°C para manutenção da UR à 75%. O ganho de massa foi medido após 48h. O diâmetro interno das células de permeação era de 6,5 cm. Para o cálculo da PVA, seguiu-se o exposto na Equação 3:

$$PVA = \frac{\Delta W}{t} \times \frac{X}{A \cdot \Delta P} \quad \text{Equação 3}$$

Sendo:

PVA = permeabilidade ao vapor de água

$\Delta W$  = Ganho de peso (g)

X = espessura do filme (mm)

t = período de tempo (horas/dias)

A = Área superficial exposta (m<sup>2</sup>)

$\Delta P$  = Diferença de pressão parcial (KPa)

#### 4.4.7 Difração por raios X - DRX

Para análise de DRX utilizou-se difratômetro Ultima IV – Rigaku® theta-2-theta, com fonte de radiação de cobre (Cu), produzida a 40kV e 30 mA. As amostras foram escaneadas com varredura entre 5° a 90°, com ângulo 2 $\theta$ , a um passo de 2° por minuto, em faixa angular de 0° a 100°. A determinação do índice de cristalinidade (IC) foi realizada com base no método Segal *et al.* (1959), pela relação entre o pico cristalino a 22,5° ( $I_{200}$ ) e a zona amorfa de 18,5° ( $I_{am}$ ), e está descrita na equação 4:

$$IC (\%) = \frac{(I_{200} - I_{am})}{I_{200}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

#### 4.4.8 Microscopia eletrônica de varredura – MEV

Para análise de MEV as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro durante 3 min à 10 mA (miliampère). As micrografias foram feitas da superfície e por secção transversal (fratura) realizada com nitrogênio líquido. O equipamento utilizado foi um Mira 3 – TESCAN®, operando com uma resolução de 10 kV e aumentos entre 50 x a 30.000 x.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas as análises estatísticas de média, desvio padrão, análise de variância (ANOVA) para determinar diferenças significativas com 95% de significância ( $p < 0,05$ ). A comparação de médias foi realizada pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). O programa utilizado para as análises foi o Past® 4.03.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PRIMEIRA FASE

#### 5.1.1 Rendimento de celulose bacteriana correlacionado aos aspectos visuais dos filmes

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados obtidos de rendimento de celulose bacteriana em massa e em percentual. Ambos os rendimentos são expostos em peso seco.

Tabela 5 – Rendimento final de celulose em massa (g) e percentual (%).

|                         | Peso Inicial (g) | Peso final (g) | Rendimento Percentual |
|-------------------------|------------------|----------------|-----------------------|
| <b>Branqueamento 1</b>  | 270,40 g         | 14,04 g        | 5,19%                 |
| <b>Branqueamento 2</b>  | 201,38 g         | 8,14 g         | 4,04%                 |
| <b>Branqueamento 3</b>  | 383,50 g         | 30,94 g        | 8,07%                 |
| <b>Branqueamento 4</b>  | 410,38 g         | 39,41 g        | 9,60%                 |
| <b>Branqueamento 5</b>  | 327,90 g         | 68,76 g        | 20,97%                |
| <b>Branqueamento 6</b>  | 212,29 g         | 37,45 g        | 17,64%                |
| <b>Branqueamento 7</b>  | 262,46 g         | 32,32 g        | 12,31%                |
| <b>Branqueamento 8</b>  | 285,61 g         | 44,83 g        | 15,70%                |
| <b>Branqueamento 9</b>  | 294,41 g         | 40,41 g        | 13,73%                |
| <b>Branqueamento 10</b> | 344,37 g         | 48,81 g        | 14,17%                |

Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

O rendimento de celulose após branqueamento variou entre 5% a 21%, como mostra a tabela acima. O maior rendimento em massa e percentual obtido, foi no branqueamento 5, com 68,76 g de celulose extraídos e um rendimento percentual de quase 21%. Os rendimentos em massa a partir do branqueamento 3, também merecem destaque, pois, a partir desta amostra, os índices de rendimento encontra-se superiores à 30 g, atingindo 48,81 g de rendimento no branqueamento 10. Quanto ao rendimento percentual, os maiores destaques estão a partir do branqueamento 5, com extração de celulose em torno de 10% a 20%.

Sá (2020) realizou branqueamento de fibras de celulose de cajueiro utilizando hidróxido de sódio (NaOH) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), à uma temperatura de secagem pós branqueamento de 50°C e obteve rendimento de celulose de 47,28%. Tanto o processo de



branqueamento, quanto a temperatura de secagem, foram semelhantes ao utilizados neste trabalho, demonstrando que a realização da extração da celulose desta maneira é eficiente.

Lima *et al.* (2017) realizaram processo de branqueamento de celulose bacteriana utilizando tratamento alcalino, com imersão do filme celulósico em NaOH 1M + 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mL de solução/película) à 80°C, por 1 h. Ao final, após branqueados e secos os filmes, obtiveram rendimento percentual de 25,45%. Quando comparado ao meio comercial HS, este, apresenta rendimento de 11,82%. No presente trabalho, o branqueamento realizado foi semelhante ao realizado pelos autores. Além disso, os rendimentos percentuais de celulose seca, também ultrapassaram os rendimentos obtidos em meios comerciais, demonstrando eficiência no processo de branqueamento e purificação da celulose.

Correlacionando os rendimentos de celulose em massa e percentual aos aspectos visuais observados nos filmes, como coloração, textura, conformação, consistência, maleabilidade e integridade da película, frente aos diferentes tratamentos de branqueamento adotados e temperaturas de secagem, pode-se destacar que as melhores condições obtidas foram nos filmes onde o branqueamento não atingiu a quantidade de 500 mL de hipoclorito de sódio (NaClO) para 500 mL de água (H<sub>2</sub>O) e a quantidade peróxido de hidrogênio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não atingiu 300 mL adicionados.

Nos branqueamentos onde adicionou-se 500 mL de NaClO para 500 mL de água (atingindo ou ultrapassando a proporção 1:1) ou mais do que 300 mL de peróxido de hidrogênio, diversas alterações visuais puderam ser observadas. Em filmes em que a adição de NaClO e H<sub>2</sub>O atingiu ou ultrapassou 500 mL, como nas amostras branqueamento 4, branqueamento 5 e branqueamento 6, perdeu-se conformação, passando a apresentar textura e consistência mais gelatinosa e mole, sendo difícil o manuseio. Na Figura 10, referente ao “branqueamento 4”, verificam-se as alterações citadas. Ainda sobre a quantidade de NaClO, observou-se que, para que o filme mantivesse sua consistência e atingisse uma boa coloração quanto ao branqueamento, era necessário utilizar 500 mL de H<sub>2</sub>O para 300 mL de NaClO, parâmetro este, que foi fixado para todos os tratamentos da segunda fase do experimento.

Figura 10 – Imagem da amostra “branqueamento 4”, quantidade de NaClO adicionada atingiu 500 mL.



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Com relação ao  $H_2O_2$ , nos filmes em que a quantidade adicionada foi igual ou superior a 300 mL, houve perda da conformação, além de apresentar aspecto gelatinoso, flacidez, dificuldade no manuseio. Além disso, ocorreu a formação de espuma e bolhas de ar durante a adição do reagente, o que comprometeu a integridade da membrana e, ao final do tempo de imersão, isso causava a ruptura e extravasamento do conteúdo interno. Todas as alterações citadas podem ser observadas nas Figuras 11 e 12 referentes ao “branqueamento 5”. Na Figura 12, pode-se observar o extravasamento do material interno do filme em forma de grânulos, por conta da ruptura e perda da integridade da película. Através destas observações, pode-se constatar que a quantidade de peróxido de hidrogênio adicionada, deveria ser entre 100 mL (mínimo) e 250 mL (máximo), sendo, esta, outra variável utilizada na segunda fase do experimento.

Figura 11 – Imagem da amostra “branqueamento 5” logo após adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Figura 12 – Imagem da amostra “branqueamento 5” ao final do processo de branqueamento.



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Além de todos os pontos citados, a influência do tempo e da temperatura de secagem sob os aspectos visuais dos filmes e rendimento de celulose, também foram observados. Os

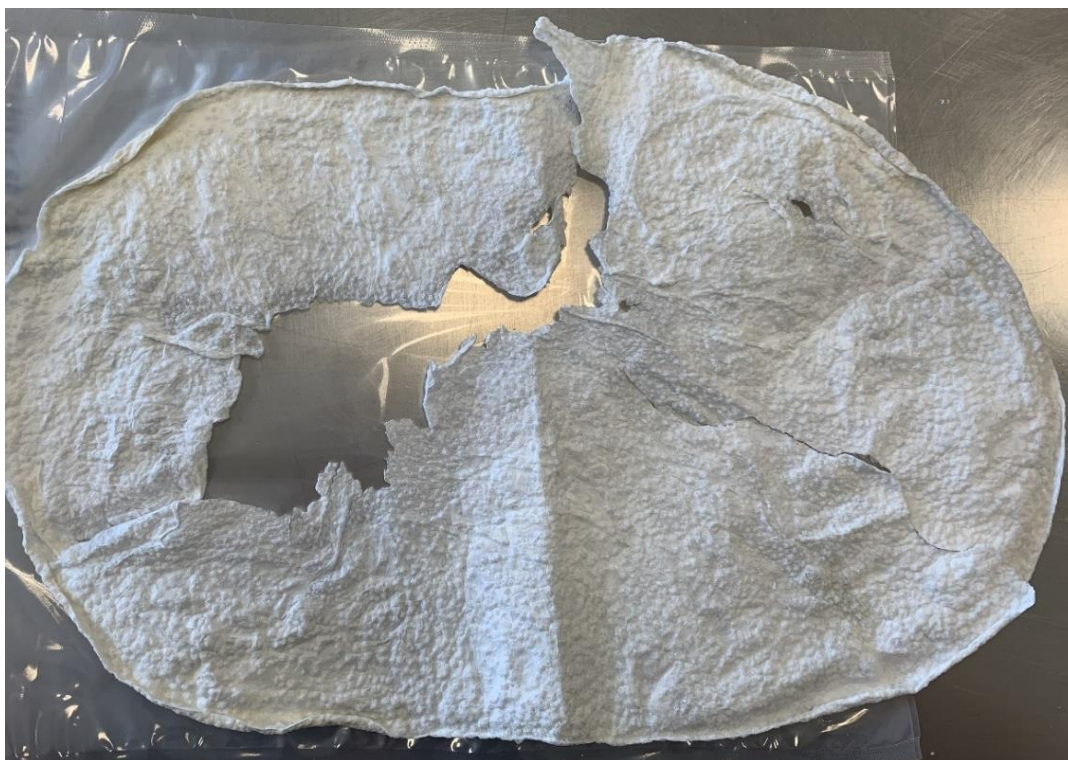
resultados de maior destaque foram obtidos na faixa de 40°C a 50°C, porém, isso dependia da espessura do filme. Portanto, este parâmetro (espessura) foi padronizado para segunda fase do experimento. Em filmes com espessura maior, o tempo de secagem era mais longo. Se utilizadas altas temperaturas (50°), estes, apresentavam aspecto de coloração mais escuro, como se estivessem queimados, conforme apresentado na Figura 13. Em filmes de espessura mais fina, utilizando-se a mesma temperatura, esse fator não era observado, conforme mostra a Figura 14. Além disso, nos filmes em que a temperatura utilizada era menor (40°C), estes, apresentavam coloração mais clara, de acordo com o apresentado na Figura 15. A fim de determinar se a temperatura apresentaria diferença significativa quanto a coloração dos filmes, o tempo final de secagem e o rendimento de celulose, esta variável também foi estudada na segunda fase. O tempo final de secagem era obtido a partir do momento em que os filmes atingiam peso/massa constante.

Figura 13 – Imagem da amostra “branqueamento 9”, secagem à 50°C em filme com espessura maior.



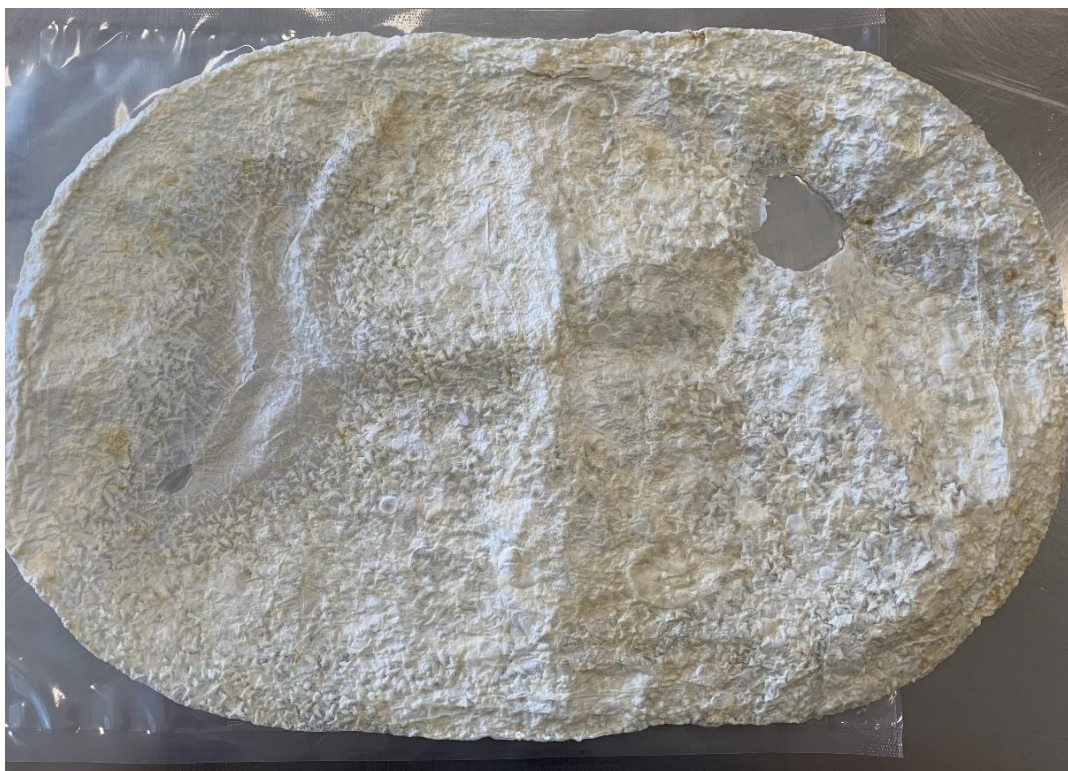
Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Figura 14 – Imagem da amostra “branqueamento 10”, secagem à 50°C em filme de espessura menor.



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Figura 15 – Imagem da amostra “branqueamento 7”, secagem à 40°C.



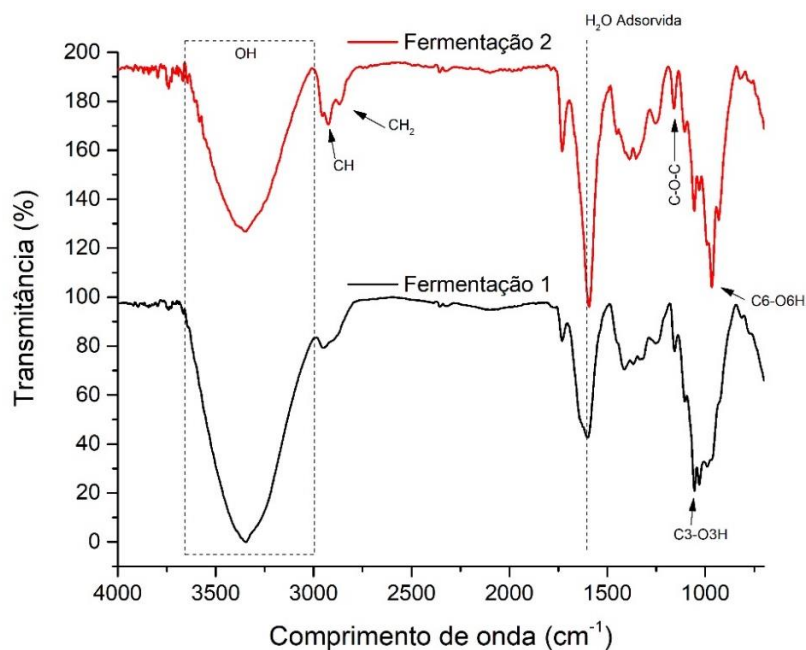
Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Sederavičiūtė, Bekampienė e Domskienė (2019) avaliaram diferentes processos de branqueamento (natureza da solução e tempo de permanência na mesma) e os aspectos visuais de filmes celulose bacteriana. Os autores afirmam que tratamentos menos agressivos são melhores para extração de celulose e conformação do filme, pois não causam tantas mudanças estruturais e na porosidade da membrana. Para o branqueamento utilizaram em uma parte das amostras H<sub>2</sub>O pura e outra parte 0,5% de NaOH (razão de solução 1:10) como reagentes, durante 24 h, à 30°C. Eles observaram que nos filmes em que a água foi utilizada como reagente, a redução de massa do filme celulósico após secagem foi de 96,8%, enquanto para os filmes em que se utilizou hidróxido de sódio, a redução foi 97,24%, demonstrando que a utilização de H<sub>2</sub>O como reagente não agrediu tanto o filme, causando perdas menores. Tal resultado corrobora com o verificado no presente trabalho, pois, em filmes em que o branqueamento foi mais agressivo (branqueamento 5), ocorreram grandes alterações quanto a sua conformação e aos aspectos visuais.

### 5.1.2 Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier – FT-IR

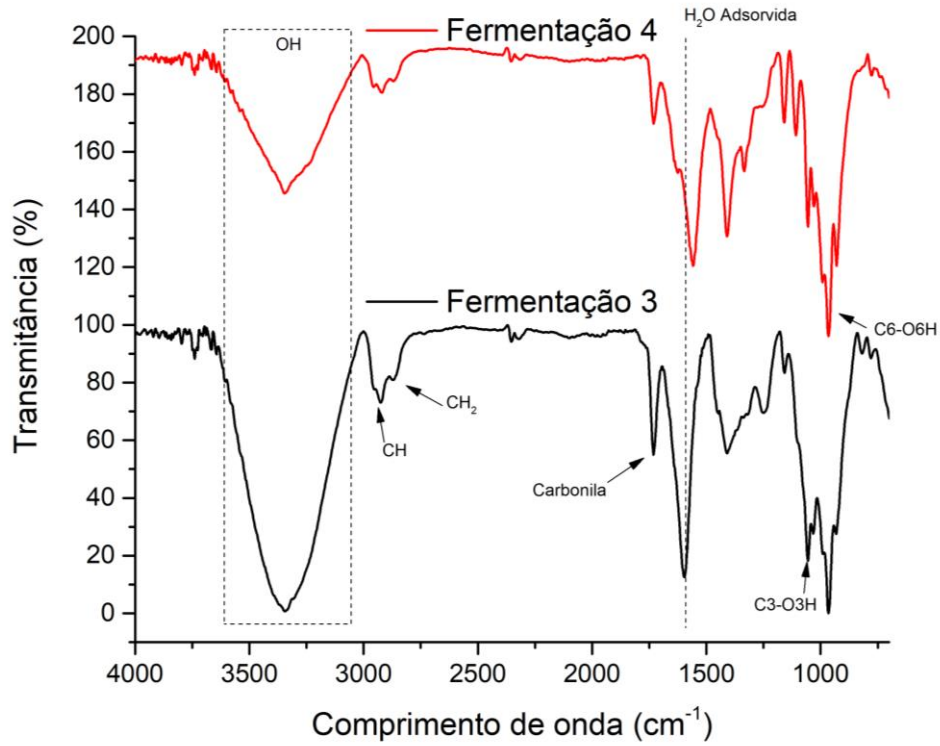
As Figuras 16, 17, 18 e 19 apresentam os espectros de infravermelho obtidos na análise de FT-IR divididos de acordo com a temperatura de secagem.

Figura 16 – Espectro de infravermelho, amostras secas à 30°C.



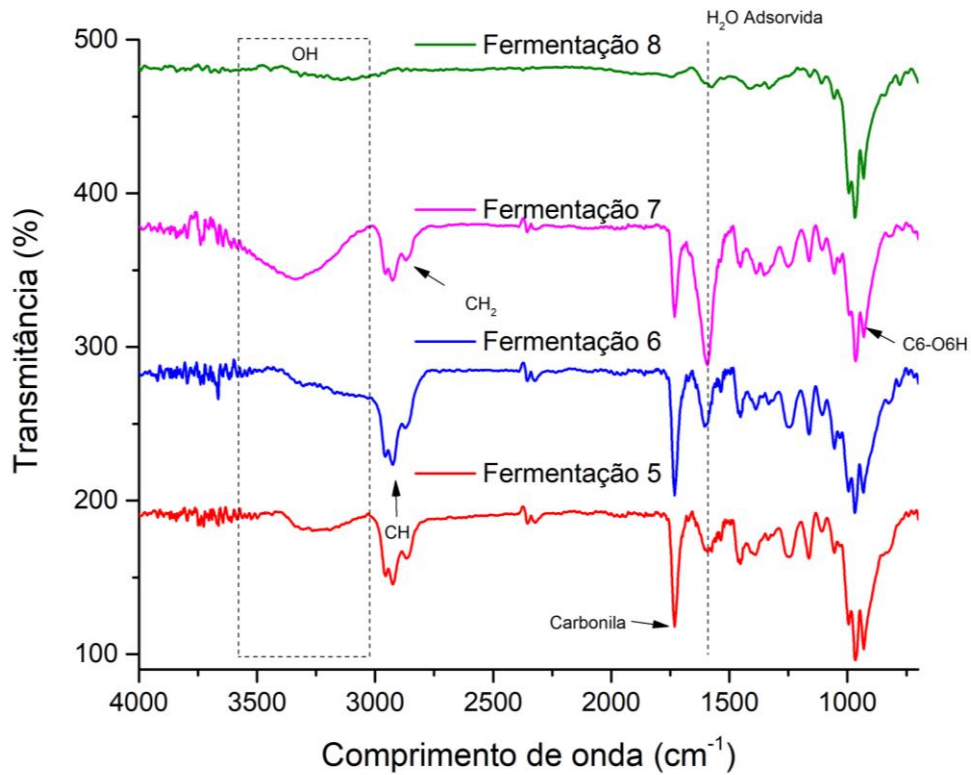
Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Figura 17 – Espectro de infravermelho, amostras secas à 45°C.



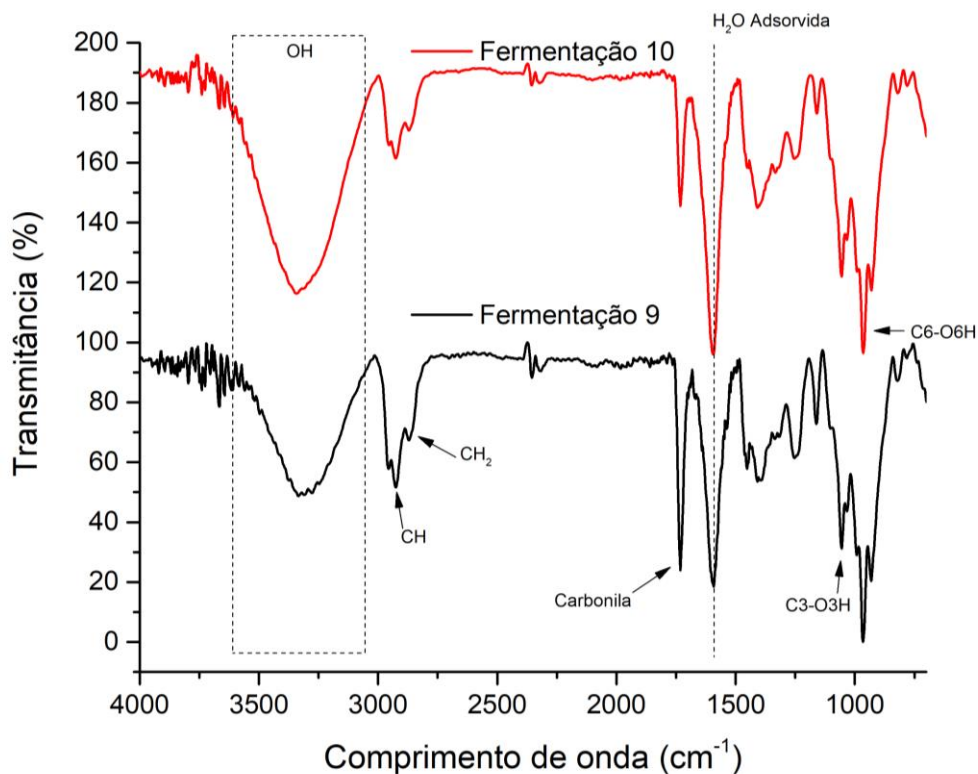
Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Figura 18 – Espectro de infravermelho, amostras secas à 40°C.



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Figura 19 – Espectro de infravermelho, amostras secas à 50°C.



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Os resultados obtidos demonstram compatibilidade com espectros vibracionais de celulose, seguindo o que consta em literatura. Podemos observar como características: vibrações de banda na região de 3500-3000  $\text{cm}^{-1}$ , referente a estiramento em OH, 2900  $\text{cm}^{-1}$  referente a CH de alcanos, 2700  $\text{cm}^{-1}$  referente a estiramento simétrico de  $\text{CH}_2$ , 1700  $\text{cm}^{-1}$  referente ao grupo carbonila, 1600  $\text{cm}^{-1}$  referente a deformação de OH, onde também há a presença de  $\text{H}_2\text{O}$  adsorvida, 1400  $\text{cm}^{-1}$  referente a deformação de  $\text{CH}_2$ , 1370  $\text{cm}^{-1}$  deformação de  $\text{CH}_3$ , 1340  $\text{cm}^{-1}$  deformação de OH e 1320-1030  $\text{cm}^{-1}$  deformação de CO.

Além disso, pode-se destacar como semelhante para todas as amostras a presença de ligação C – O – C na região de 1200  $\text{cm}^{-1}$ , presença de  $\text{C}_3 - \text{O}_3\text{H}$  na região de 1100  $\text{cm}^{-1}$  e presença de  $\text{C}_6 - \text{O}_6\text{H}$  na região de 1000  $\text{cm}^{-1}$ .

Barud (2006) encontrou todos os espectros vibracionais descritos acima em amostras de celulose bacteriana liofilizada. Além disso, identificou presença de ligação OH na região de 400-700  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{CH}_2$  entre 700-900  $\text{cm}^{-1}$ , C-O na região de 900  $\text{cm}^{-1}$ , dentre outras ligações. Estas, também podem ser observadas nos espectros vibracionais das Figuras 16, 17, 18 e 19.

Trovatti *et al.* (2011) e Zaets *et al.* (2014) encontraram bandas na região 730-960  $\text{cm}^{-1}$  referente a carbonos anoméricos, vibração na região de 1058  $\text{cm}^{-1}$  referente a C-O-C, região



2880  $\text{cm}^{-1}$  referente a grupos C-H e região de 3354  $\text{cm}^{-1}$  referente a grupos O-H. Todos os espectros vibracionais encontrados são característicos da celulose bacteriana e podem ser observados nos espectros de todas as amostras da primeira fase.

Estiramentos de O-H em região de 3500  $\text{cm}^{-1}$  são característicos da celulose tipo I (MACHADO *et al.*, 2016). Além disso, a presença de água adsorvida pode ser identificada em todas as amostras devido as características da celulose, como alta capacidade de retenção de água. Em todas as amostras bandas fortes na região de 1500-1250  $\text{cm}^{-1}$  atribuídos a  $\text{CH}_2$  simétrica, são características da celulose tipo I. Machado *et al.* (2016) observou em seu trabalho as características vibracionais referentes a celulose I, tendo como diferencial as bandas fortes de  $\text{CH}_2$  simétricas e C – O estiradas, apresentadas na região de 1425 $\text{cm}^{-1}$  e 1160  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente.

A partir dos espectros vibracionais da amostra “branqueamento 5” pequenas alterações podem ser observadas na região de 1500  $\text{cm}^{-1}$  a 1000  $\text{cm}^{-1}$  devido à forma como o processo de branqueamento foi realizado (quantidade/proporção dos reagentes). Nas amostras “branqueamento 1” a “branqueamento 4”, as quantidades dos reagentes não causaram alterações nos espectros, sendo estes, semelhantes aos de celulose sem passar por processo de branqueamento. Já a partir da amostra 5, verificou-se a presença de resíduos provenientes dos reagentes utilizados no processo de branqueamento.

Pillai e seus colaboradores (2021) realizaram análise espectrofotométrica em infravermelho de filmes de celulose puros e filmes de celulose que haviam passado por tratamento alcalino com NaOH 0,2 M, em baixa quantidade e curto tempo de duração do processo. Eles observaram que, por conta de o branqueamento ser pouco agressivo, os filmes de celulose antes e após tratamento alcalino não apresentaram alterações nos espectros vibracionais de FT-IR.

Além disso, a partir do branqueamento 5, também são observadas alterações nas características das vibrações na região de 3500-3000  $\text{cm}^{-1}$ , quanto à intensidade e comprimento dos picos. Essas alterações corroboram com a afirmação de que a quantidade/proporção dos reagentes utilizados no processo de branqueamento, causou alterações nas amostras, deixando resíduos presentes nelas. Leonarski *et al.* (2020) e Lima *et al.* (2017) também citam alterações por conta do processo de branqueamento realizado, em seus respectivos trabalhos.

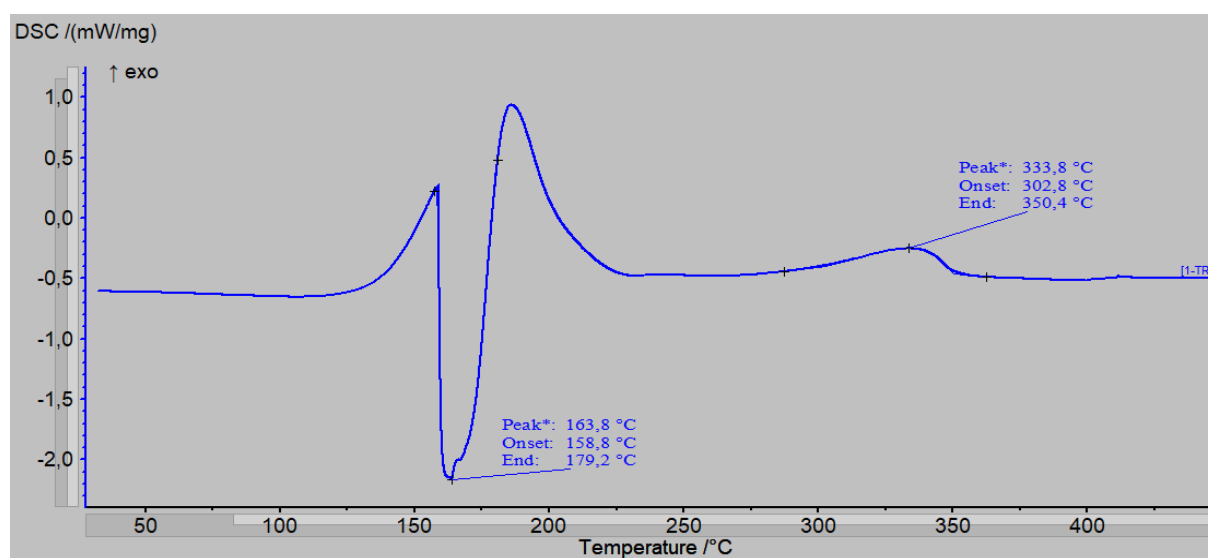
Sederavičiūtė, Bekampienė e Domskienė (2019) realizaram análise de FT-IT em filmes celulósicos branqueados sob dois diferentes métodos de branqueamento: utilizando

H<sub>2</sub>O pura e utilizando NaOH, comparando-os com filmes celulósicos que não haviam passado por branqueamento. Observaram que o processo de tratamento alcalino e branqueamento com água, causaram alterações estruturais nas amostras, pois ocorreram mudanças com relação a localização das bandas e comprimentos de onda quando comparados aos picos da celulose bacteriana sem passagem por branqueamento. A principal alteração observada após os pré-tratamentos, foi o aumento na cristalinidade e intensidade dos picos, devido a remoção das zonas amorfas e do açúcar utilizado como substrato no processo fermentativo.

### 5.1.3 Calorimetria diferencial de varredura - DSC

Na Figura 20, verifica-se curva obtida na análise de DSC. É possível observar a presença de dois picos: um endotérmico em 150°C-180°C e outro exotérmico em 300°C-350°C. O pico endotérmico refere-se a dessorção de água, enquanto o pico exotérmico, é referente a degradação da celulose.

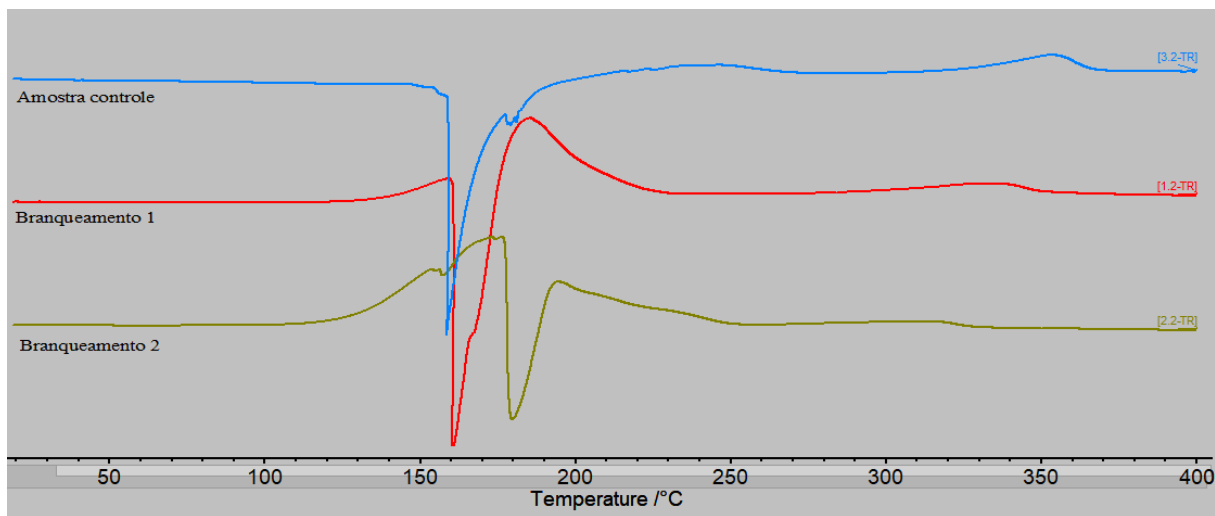
Figura 20 – Curva de DSC referente a faixa de temperatura 0°C a 450°C.



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Vieira e seus colaboradores identificaram em amostras de celulose bacteriana através da análise de DSC, pico endotérmico, referente a perda de água, próximo à 180°C. Já Oliveira (2015) e Barud (2006) identificaram a presença de picos exotérmicos em 345°C e 330°C, respectivamente, referente a degradação de celulose. Todos os trabalhos citados corroboram com as temperaturas identificadas na presente dissertação.

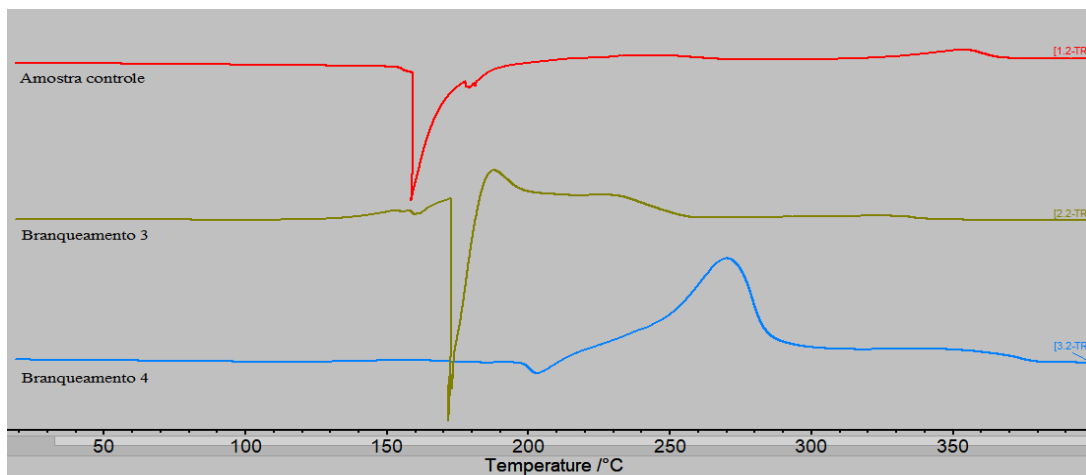
Figura 21 – Curva de DSC referente as amostras secas à 30°C.



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Na Figura 21, estão apresentadas as curvas de DSC da amostra controle e das amostras secas à 30°C. Pode-se observar que as curvas das amostras 1 e 2 são semelhantes à curva controle, tendo um pico endotérmico entre 150°C-180°C e um pico exotérmico iniciando em 300°C. Nessas amostras, o processo de branqueamento (quantidade/proporção de reagentes utilizados) foi brando, causando poucas alterações quando comparado com a celulose sem nenhum processo de branqueamento. Freitas, Senna e Botaro (2017) citam que o primeiro pico de maior significância (pico endotérmico) encontrado em amostras de celulose bacteriana, é sempre referente a dessorção de água. Este, ocorre devido à presença de umidade residual, visto que, a celulose absorve água facilmente, ou devido ao baixo ponto de ebulição nos solventes utilizados no branqueamento.

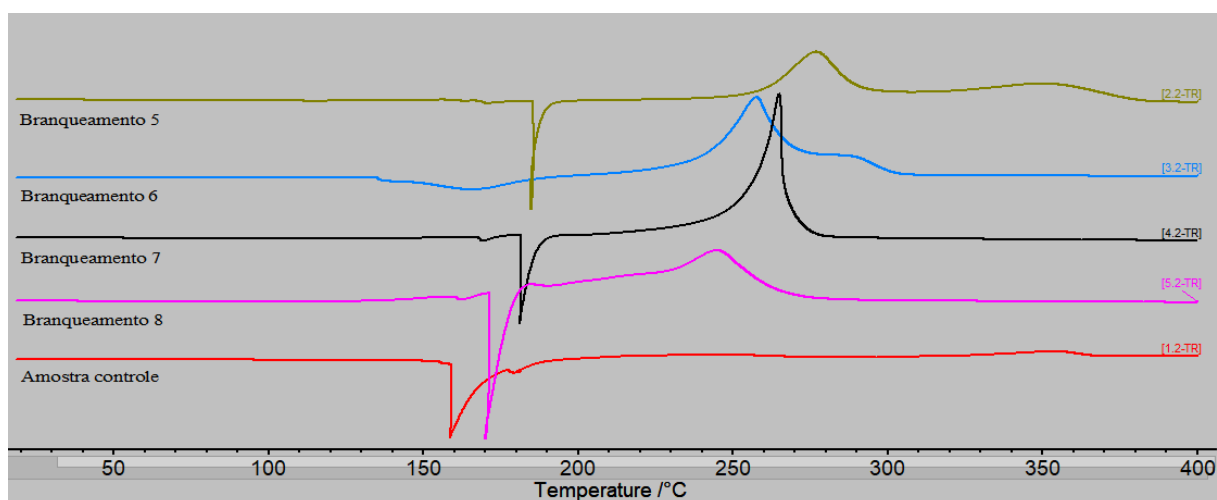
Figura 22 – Curva de DSC referente as amostras secas à 45°C.



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Nas curvas de DSC apresentadas na Figura 22, observam-se diferenças quanto ao comportamento das mesmas. Enquanto a amostra 3 possui curva semelhante ao controle, a amostra 4, possui pico endotérmico de pequena amplitude próximo a 200°C e pico exotérmico de grande amplitude em 250°C. Isso se deve ao tipo de branqueamento realizado, quantidade/proporções dos reagentes utilizados. Pode-se destacar que a amostra 4 possuía temperatura de degradação inferior as observadas nas demais amostras. Já foi descrito em literatura alterações de pico endotérmico para exotérmico devido a utilização de altas concentrações de solventes alcalinos, pois com a utilização dos mesmos, pode ocorrer alteração na estabilidade térmica da celulose (OLIVEIRA, 2015).

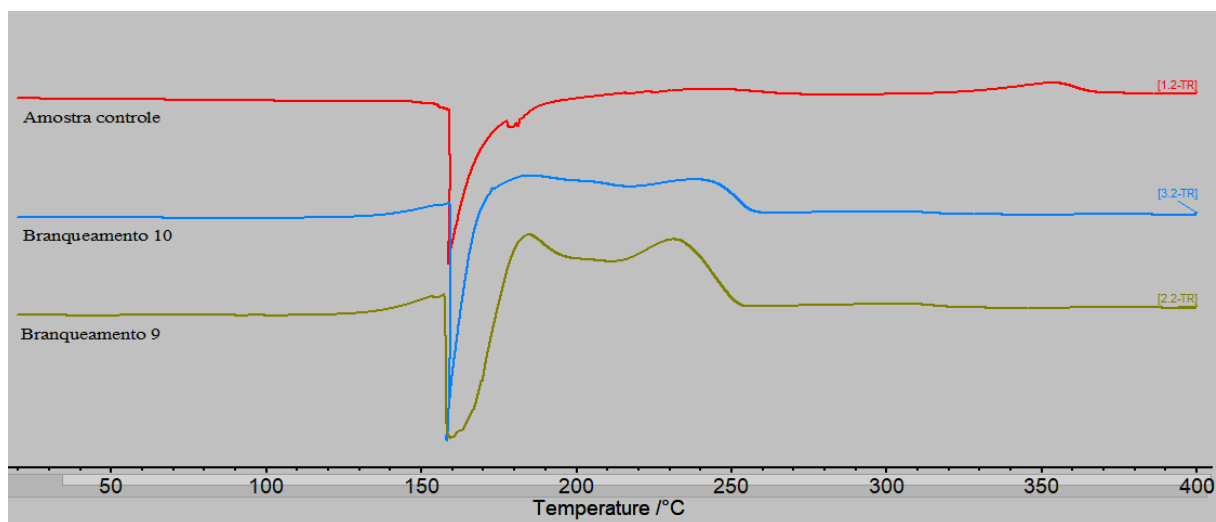
Figura 23 – Curvas de DSC referente as amostras secas à 40°C.



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Na Figura 23 observam-se diversos padrões de curvas. As amostras 7 e 8 apresentam curvas com dois picos, sendo um endotérmico entre 160°C-180°C e outro exotérmico entre 240°C-280°C. Já as amostras 5 e 6 apresentam três picos, sendo um endotérmico em 140°C-180°C e dois exotérmicos em 250°C-280°C e 280°C-350°C, respectivamente. As alterações observadas nas amostras 5 e 6 devem-se ao processo de branqueamento realizado, este, alterou a celulose de tipo I para celulose II ou III, por conta dos reagentes utilizados. Lima *et al.* (2017) citam que a celulose, após passar por tratamento alcalino, altera de celulose tipo I, para celulose tipo II ou tipo III e passa a apresentar pico de degradação em 250°C. Além disso, citam que a celulose tipo I e a celulose bacteriana, possuem pico de degradação em torno de 350°C, pico este, observado na amostra controle do presente trabalho.

Figura 24 – Curvas de DSC referente as amostras secas à 50°C.



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Na Figura 24, é possível verificar mudanças quanto ao comportamento das amostras em relação à amostra controle. O pico endotérmico em 150°C-180°C está presente nas três amostras, porém, ocorreram alterações quanto ao pico exotérmico, o qual, passou a ocorrer entre 210°C-250°C. Tal alteração, é justificada pela da mudança no tipo de celulose devido ao processo de branqueamento agressivo. Sederavičiūtė, Bekampienė e Domskienė (2019), observaram eventos parecidos após tratamento de celulose bacteriana utilizando NaOH. As amostras apresentaram forte pico exotérmico na casa dos 211°C, demonstrando tratar-se de celulose tipo II ou tipo III.

## 5.2 SEGUNDA FASE

### 5.2.1 Rendimento de celulose bacteriana e aspectos visuais dos filmes

Abaixo, na Tabela 6, demonstram-se os resultados obtidos para rendimento final de celulose em massa (g) e em percentual (%), além da espessura inicial do SCOBY, no momento de retirada do processo fermentativo.

Tabela 6 – Espessura dos filmes, rendimento final de celulose em massa (g) e percentual (%)

|                  | <b>Espessura<br/>(mm)</b> | <b>Peso Inicial<br/>(g)</b> | <b>Peso Final<br/>(g)</b> | <b>Rendimento<br/>Percentual (%)</b> |
|------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| <b>Amostra 1</b> | 5,62 mm                   | 272,23 g                    | 33,83 g                   | 12,43%                               |
| <b>Amostra 2</b> | 5,32 mm                   | 282,96 g                    | 44,46 g                   | 15,71%                               |
| <b>Amostra 3</b> | 5,16 mm                   | 245,70 g                    | 25,73 g                   | 10,47%                               |
| <b>Amostra 4</b> | 5,09 mm                   | 255,22 g                    | 29,17 g                   | 11,43%                               |

Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

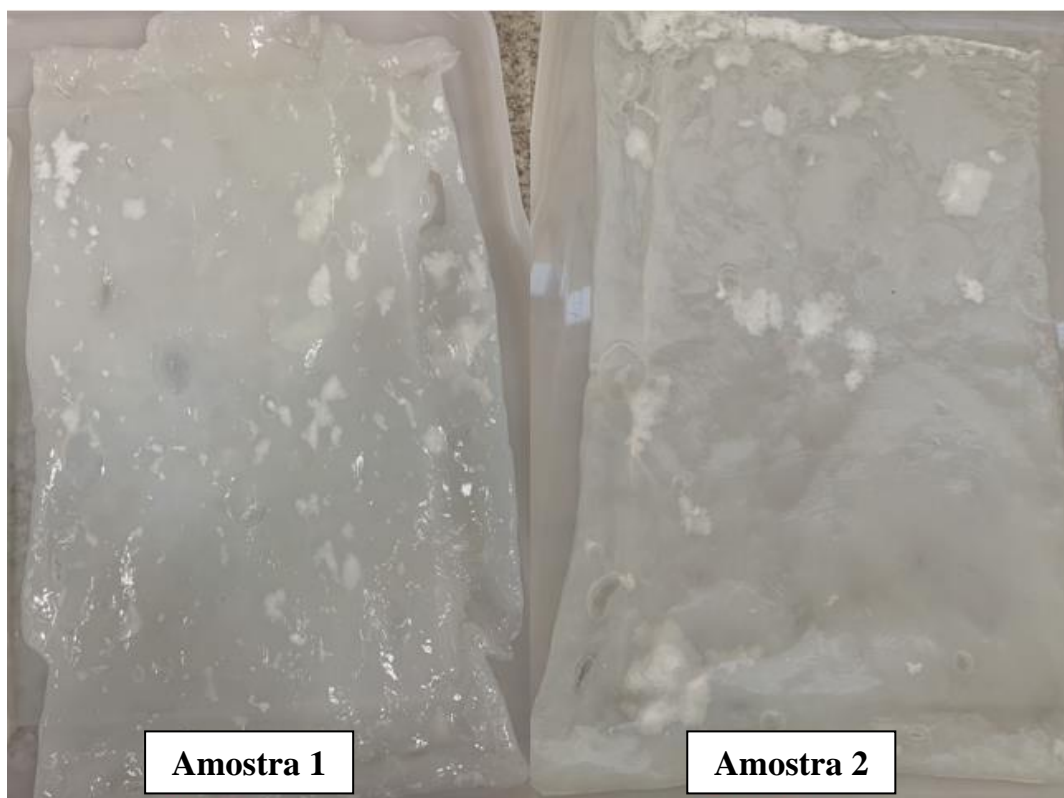
Após as análises realizadas, resultados obtidos e observações feitas na primeira fase do experimento, alguns parâmetros foram ajustados como início do processo fermentativo a partir de um inóculo pré-estabelecido, com as mesmas características para todas as amostras e padronização da espessura de retirada dos *SCOBY* do processo fermentativo. Através da Tabela 10, pode-se verificar que tais itens ajustados, fizeram diferença quanto ao rendimento final em massa (g) e ao rendimento final percentual (%), quando comparados com a primeira fase, não havendo grandes oscilações nesses resultados.

O maior rendimento em massa e percentual obtido foi na amostra 2, com 44,46 g e 15,71% de rendimento de celulose, respectivamente, seguido da amostra 1, amostra 4 e amostra 3. Através desses resultados, pode-se concluir que a melhor condição de branqueamento para extração de celulose, foi em temperatura mais elevada (50°C), com adição de menor quantidade de reagente (100 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Esta afirmação torna-se verdadeira, quando observadas as outras amostras, pois o segundo maior rendimento foi obtido também em temperatura de 50°C; e quanto à quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quando comparados em mesma temperatura, as amostras com menor quantidade do reagente (amostra 2 e amostra 4) obtiveram melhores resultados no percentual de celulose extraída.

Friend (2019) verificou o efeito do processo de branqueamento em filmes de celulose, utilizando o mesmo reagente em diferentes concentrações e temperaturas, sob o rendimento final. Realizou adição de NaOH em concentrações de 0,5 mol/L e 1 mol/L, à temperaturas de 60°C e 80°C (variáveis do processo), seguido da adição de 15% m/m de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para o branqueamento. Obteve que o melhor rendimento percentual de celulose (1,72%), foi em condições de menor concentração de NaOH (0,5 mol/L) e maior temperatura (80°), corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho.

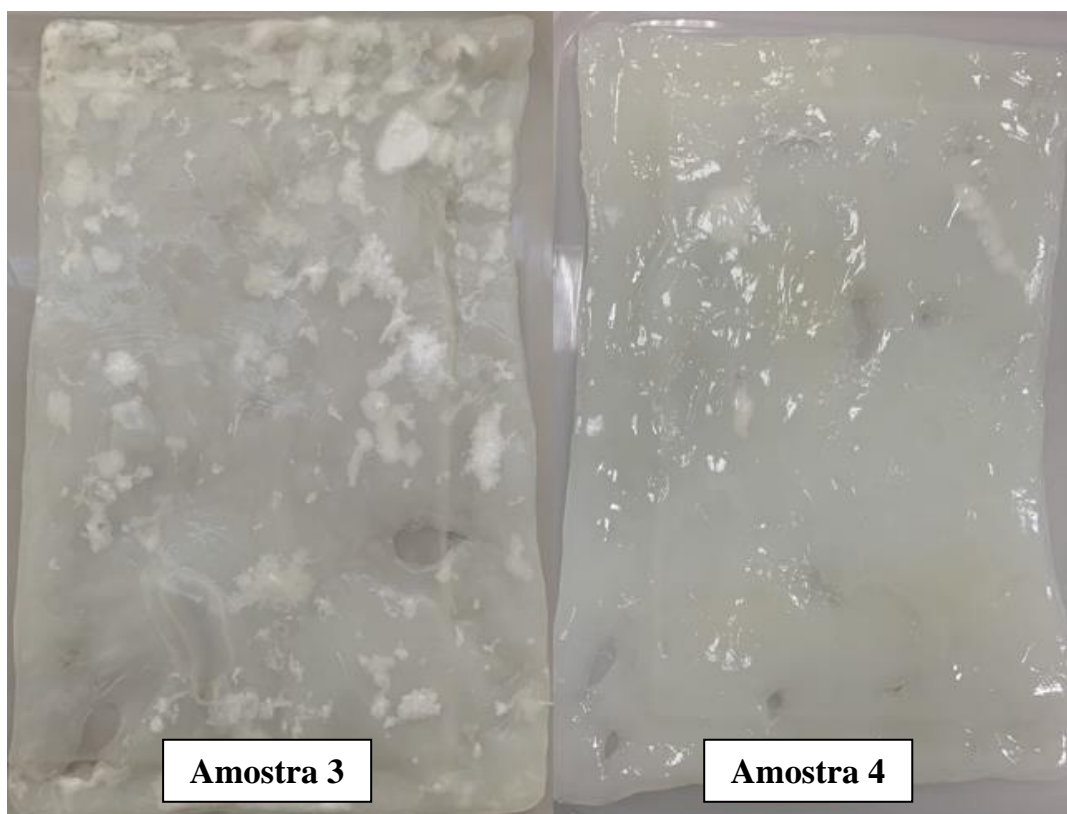
Nas Figuras 25 e 26, apresentam-se imagens dos filmes obtidos na segunda fase, após toda a etapa de branqueamento.

Figura 25 – Imagem dos filmes referentes a amostra 1 e a amostra 2



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Figura 26 – Imagem dos filmes referentes a amostra 3 e a amostra 4.



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

É possível verificar, através das imagens acima, uniformidade estrutural nos filmes, devido a padronização de um inóculo. Além disso, a coloração passou a possuir um padrão após o branqueamento e houve facilidade no manuseio durante a realização do processo, devido a não ocorrência de alteração na consistência dos mesmos. A pequena variação nas quantidades de NaClO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auxiliou para que não houvesse ruptura ou alterações/perdas na integridade física das películas, demonstrando que as quantidades de reagentes utilizadas durante o processo de branqueamento não causaram agressões ao filme celulósico. Identificou-se também, a presença de grânulos de sais presentes na superfície dos filmes, em decorrência da utilização do NaClO para o processo de branqueamento.

Laavanya, Shirkole e Balasubramanain (2021) citam que o branqueamento da celulose bacteriana possui função de remoção das células mortas provenientes das bactérias presentes no processo fermentativo, remoção do chá e açúcar residuais e, remoção das partículas aderidas ao SCOBY, presentes na parte líquida da fermentação. Além de ajudar no aspecto visual, fazendo com que os filmes apresentem-se com coloração clara ao final do processo, variando a sua eficiência de acordo com a espessura dos mesmos.

Amarasekara, Wang e Grady (2020) compararam quatro diferentes métodos (A, B, C e D) de purificação/branqueamento de celulose bacteriana obtida através de SCOBY de kombucha. No método A utilizaram 50 mL de NaOH 1,0 mol à 23°C por 1h + 50 mL de NaOH 1,0 M à 23°C por 1h + 50 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,5% (p/p) à 23°C por 2h. No método B 50 mL de NaOH 1,0 M à 23°C por 1h + 50 mL de NaOH 1,0 M à 23°C por 1h + 50 mL de NaClO 1,5% (p/p) à 23°C por 2h. No método C utilizaram 50 mL de NaOH 1,0 M à 90°C por 1 h + 50 mL de NaOH 1,0 M à 90°C por 1h + 50 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,5 % (p/p) à 23°C por 2h. E por fim, no método D utilizaram 50 mL de NaOH 1,0 M à 90°C por 1h + 50 mL de NaOH 1,0 M à 90°C por 1h + 50 mL de NaClO 1,5% (p/p) à 23°C por 2h. Em todos os métodos, os filmes passaram por secagem após o processo, obtendo ao final como rendimento de celulose bacteriana: método A 2,74%, método B 3,64%, método C 2,67% e método D 3,47%. O melhor rendimento obtido foi no processo em que se utilizou temperaturas mais baixas com NaOH e NaClO como reagentes (método B). Porém, o método onde obteve-se a celulose mais pura, foi no método C, onde utilizou-se NaOH em temperatura mais elevada adicionada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os resultados obtidos quanto à eficiência do processo de branqueamento, corroboram com os encontrados no presente trabalho.

Sederavičiūtė, Bekampienė e Domskienė (2019) citam que solução alcalina de NaOH acima de 6% pode causar alterações na estrutura cristalina da celulose, portanto, deve-se



evitar a utilização. Além disso, a utilização de soluções alcalinas fortes, em alta temperatura, por muito tempo, não é indicada, pois o processo pode ter influência negativa quanto a estrutura, propriedades mecânicas e físicas do material. Os tratamentos mais indicados são os menos agressivos, visto que, a celulose bacteriana é um produto totalmente natural, obtido de processos fermentativos simples.

Quanto a temperatura de secagem dos filmes, poucas alterações podem ser descritas. Com relação ao tempo de permanência no processo, este, não sofreu alteração em temperaturas maiores (50°C) ou menores (40°C), o tempo de secagem foi semelhante para todas as amostras.

### 5.2.2 Análise de cor instrumental

Na Tabela 7, são observados os valores obtidos na análise de cor instrumental utilizando a escala CIELAB, na qual, L\* refere-se a luminosidade de preto à branco, de 0 a 100 e a\* e b\* referem-se as coordenadas de cor sendo -a para verde/+a para vermelho e -b para azul/+b para amarelo (Ashrafi; Jokar; Nafchi, 2018; Rodrigues *et al.*, 2018).

Tabela 7 – Resultados da análise de cor instrumental em escala CIELAB.

|                  | <b>L*</b>               | <b>a*</b>               | <b>b*</b>               |
|------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Amostra 1</b> | 92,59±0,67 <sup>b</sup> | -0,61±0,03 <sup>b</sup> | 0,66±0,35 <sup>b</sup>  |
| <b>Amostra 2</b> | 94,86±0,80 <sup>a</sup> | -0,61±0,02 <sup>b</sup> | 0,66±0,04 <sup>b</sup>  |
| <b>Amostra 3</b> | 94,94±0,32 <sup>a</sup> | -0,79±0,03 <sup>b</sup> | 1,24±0,26 <sup>b</sup>  |
| <b>Amostra 4</b> | 84,36±0,76 <sup>c</sup> | -1,42±0,42 <sup>a</sup> | 17,87±0,93 <sup>a</sup> |

Legenda: L\* = luminosidade (0 = preto/100 = branco), +a\* = vermelho/-a = verde, +b = amarelo/-b = azul. Média ± desvio padrão de três amostras. Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença estatística a 95% de confiança pelo teste de Tukey. Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Pode-se verificar que existem diferenças entre as amostras (p<0,05). A luminosidade L\* foi elevada em todos os tratamentos, indicando tendência a coloração branca (100), no qual, as amostras apresentaram o seguinte comportamento 2 = 3 > 1 > 4. A luminosidade foi inversamente proporcional as variáveis utilizadas: maior quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 mL) e menor temperatura (40°C) para a amostra 2, e menor quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mL) e maior temperatura (50°C) para a amostra 3, seguidas da amostra 1, com concentração de reagente e temperatura mais elevadas e, por último, a amostra 4, tendo as menores variáveis: 100 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 40°C. O resultado observado na amostra 4 se deve a não remoção total do chá e açúcar

utilizados durante o processo fermentativo, corroborando com o verificado nas análises de DSC e FT-IR, itens 5.2.6 e 5.2.5, respectivamente, onde houve a verificação de presença de resíduos de ambos.

Betlej e seus colaboradores (2021) avaliaram como os nutrientes presentes no ambiente de crescimento do SCOBY influenciavam na síntese de celulose e suas propriedades químicas, como brilho e coloração. A análise de cor instrumental foi realizada nos filmes secos, utilizando a escala CIELAB, visando verificar diferenças na coloração entre amostras cultivadas em sacarose e amostras cultivadas em substrato rico em nitrogênio. Obtiveram como resultado que em substratos onde houve adição de substâncias ricas em nitrogênio, como chá verde e peptona, a luminosidade  $L^*$  aumentou e, nos filmes onde houve adição de sacarose em teores maiores do que as substâncias ricas em nitrogênio, a luminosidade  $L^*$  diminuiu. Além disso, os autores justificaram que a diminuição da luminosidade  $L^*$ , pode ser em decorrência do tempo de secagem utilizado. Amostras de maior peso e espessura, demoram mais tempo para serem secas, pois retém maior quantidade de água, ocasionando escurecimento do filme final obtido.

Yim, Song, Kim (2017) realizaram a produção e caracterização de biofilmes de celulose bacteriana utilizando diferentes tipos de chás como fonte de nitrogênio e diferentes tipos de açúcares como fonte de carbono. Na análise de cor instrumental, utilizando escala CIELAB, observaram que nas diferentes fontes de nitrogênio, ocorreu aspecto amarelado em todas as amostras, observando o parâmetro  $b^*$ . Quanto ao índice de branco (luminosidade  $L^*$ ), verificaram que nas amostras onde houve utilização de chá preto, o índice foi menor, devido a coloração escura do chá, o qual, contém polifenóis, que quando convertidos, geram composto em coloração alaranjada e escarlate, colorações mais escuras, algo já esperado. Com relação à influência das diferentes fontes de carbono, verificaram que todos os filmes apresentaram coloração amarelada (parâmetro  $b^*$ ) e quanto à luminosidade ( $L^*$ ), o índice de branco obtido variou de 77,49 a 56,52, onde o menor índice foi verificado em amostras que utilizaram o mel como fonte de carbono. O mel possui alta quantidade de polifenóis, quando comparado com outras fontes de carbono, o que confere uma coloração mais escura ao filme, tendo índice de luminosidade mais baixo.

Ashrafi, Jokar e Nafchi (2018) produziram filmes de quitosana contendo ou não bebida kombucha e avaliaram as propriedades física de cor utilizando a escala CIELAB. Nos filmes em que houve a adição de kombucha, o valor de luminosidade  $L^*$  diminuiu de forma considerável, indicando que a bebida causa escurecimento nos filmes. Além disso, quanto a

cromaticidade houve aumento significativo dos parâmetros  $a^*$  e  $b^*$ , indicando que os filmes apresentaram coloração mais avermelhada e amarelada. Isso refere-se à coloração do chá e ao açúcar utilizado como substrato, que causa efeito amarelado aos filmes. Tal condição, pôde ser verificada na amostra 4 também.

Quanto aos parâmetros de cromaticidade  $a^*$  e  $b^*$ , pode-se verificar que todas as amostras possuíram  $a^*$  negativo, indicando tons puxados para o verde e  $b^*$  positivo, indicando tons puxados para o amarelo. Tal resultado já era esperado, tendo em vista que o chá utilizado para a fermentação foi o chá verde e que o açúcar utilizado como substrato foi a sacarose, a qual, gera compostos amarelados. Na amostra 4, pode-se verificar diferença significativa com relação as demais amostras, possuindo ambos os índices ( $a^*$  e  $b^*$ ) mais elevados. Tal observação, corrobora com o citado na parte referente aos aspectos visuais dos filmes, pois o filme 4, apresentou coloração mais amarelada.

Tapias *et al.* (2022) extraíram filmes de celulose bacteriana através de SCOBY cultivado em diferentes infusões de ervas: chá preto, chá verde, erva mate, lavanda, orégano e erva doce e avaliaram a aparência visual quanto a cor utilizando a escala CIELAB. Observaram que os filmes possuíam alto índice de luminosidade  $L^*$  (acima de 70), coloração avermelhada ( $a^*$  positivo) e amarelada ( $b^*$  positivo). A justificativa para tal, deve-se as reações de Maillard ocorridas entre os açúcares e aminoácidos durante o processo fermentativo e armazenamento dos filmes, além da não remoção total dos chás utilizados.

### 5.2.3 Grau de intumescimento ( $Q$ )

Na Tabela 8, observa-se o grau de intumescimento das amostras 1, 2, 3 e 4. A análise foi realizada em triplicata e fez-se média, desvio padrão, análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey.

Tabela 8 – Resultados da análise de grau de intumescimento ( $Q$ ).

| <b>GRAU DE INTUMESCIMENTO (<math>Q</math>)</b> |                                |
|--|--------------------------------|
|  | <b>Valor de <math>Q</math></b> |
| <b>Amostra 1</b>                               | 67,72±1,71 <sup>a</sup>        |
| <b>Amostra 2</b>                               | 44,65±1,86 <sup>b</sup>        |
| <b>Amostra 3</b>                               | 39,58±2,75 <sup>b</sup>        |
| <b>Amostra 4</b>                               | 53,11±2,77 <sup>c</sup>        |

Legenda: Média  $\pm$  desvio padrão de três amostras. Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença estatística a 95% de confiança pelo teste de Tukey. Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

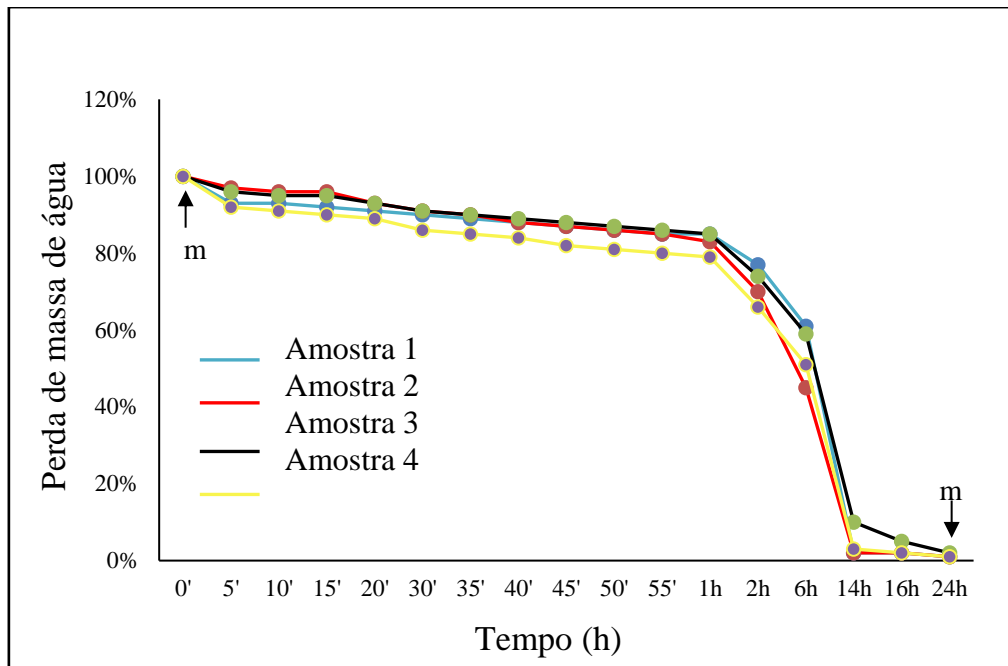
Houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre o grau de intumescimento das amostras apresentadas na Tabela 12. O maior índice de  $Q$  foi obtido na amostra 1, seguido da amostra 4, amostra 2 e 3, que não apresentaram diferença entre si ( $p < 0,05$ ). O grau de intumescimento refere-se a capacidade de reter líquido/intumescer de um material específico, no caso, a celulose. Aditiawati *et al.* (2021) citam que diversos fatores podem afetar o grau de intumescimento da celulose, tais como a natureza do solvente utilizado durante o processo produtivo. Os solventes não polares, apresentam grau de intumescimento menor quando comparados com solventes polares (ADITIAWATI *et al.*, 2021).

Almeida *et al.* (2013) produziram filmes com celulose bacteriana, fécula de batata e glicerol em diferentes concentrações, e mensuraram o índice de intumescimento dos mesmos, sob pH ácido e pH alcalino. Em filmes onde houve adição de fécula de batata em maiores concentrações, o grau de intumescimento cresceu após cerca de 10 minutos. Em filme onde a concentração de celulose bacteriana era maior, o intumescimento foi observado a partir do primeiro minuto, tanto em meio ácido, como em meio alcalino. Esse comportamento já era esperado, tendo em vista que o amido possui maior densidade, grau de compactação e menor número de espaços livres, quando comparado a celulose bacteriana. A celulose, possui alta capacidade de absorção e retenção de água.

Pillai *et al.* (2021) encontraram em seus estudos razão de intumescimento para celulose bacteriana, obtida a partir de kombucha, de  $210 \pm 5\%$ , indicando que tal material possui alta capacidade de absorção de água. Friend (2019) cita que o grau de intumescimento da celulose bacteriana, quando imersa em água deionizada a  $25^\circ\text{C}$  ultrapassa os 202%. A hidrofiliabilidade de tal material, associada a sua grande quantidade de poros, favorece a absorção de água.

Além da análise de  $Q$ , realizou-se também, o monitoramento da perda de água das amostras, em função do tempo. Na figura 27, verificam-se as curvas de perda de água das amostras 1, 2, 3 e 4.

Figura 27 – Curva de perda de água, em massa, após a análise de grau de intumescimento.



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Podemos destacar que o comportamento de perda de água foi similar para todas as amostras, em função do tempo. A amostra 4, apresentou perda de massa de água mais acentuada do que as demais amostras durante a primeira hora, porém, a partir da segunda hora, o comportamento passa a ser similar para todas as amostras. Vasques (2007) realizou curva de perda de massa de água para as suas amostras e obteve resultado semelhante ao encontrado neste trabalho, com perda de massa de água menos acentuada no início e, a partir da segunda hora, a perda passou a ser mais acelerada. Após 24 h, ocorreu estabilização do peso.

#### 5.2.4 Permeabilidade ao vapor de água

Na Tabela 9 pode-se verificar os resultados de permeabilidade ao vapor de água (PVA), os quais, não apresentaram diferenças entre as amostras ( $p > 0,05$ ). Todas as amostras apresentaram baixo índice de PVA. Baixo PVA é desejado para filmes ou amostras que serão utilizados para aplicações comerciais como embalagens de alimentos ou aplicações onde deseja-se pouca passagem de água. Os baixos PVA's estão relacionados a espessura dos filmes e ao processo de branqueamento realizado na celulose, pois este, causa modificações no tamanho dos poros e conformações das fibras.

Tabela 9 – Resultados da análise de permeabilidade ao vapor de água (PVA) ( $\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$ ).

|                  | <b>PERMEABILIDADE AO VAPOR DE<br/>ÁGUA (<math>\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}</math>)</b> |
|------------------|--|
| <b>Amostra 1</b> | 0,82±0,16 <sup>a</sup>   |
| <b>Amostra 2</b> | 0,65±0,03 <sup>a</sup>   |
| <b>Amostra 3</b> | 0,22±0,10 <sup>a</sup>   |
| <b>Amostra 4</b> | 0,58±0,09 <sup>a</sup>   |

Legenda: Média ± desvio padrão de três amostras. Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença estatística a 95% de confiança pelo teste de Tukey. Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

El Halal *et al.* (2016) citam que a permeabilidade ao vapor de água é a medida da facilidade com que o vapor de água permeia em determinado material e, esta, deve ser a mais baixa possível, quando trata-se de filmes utilizados para embalagem de alimentos, pois é necessário evitar ou reduzir, a taxa de transferência de umidade entre o alimento e o ambiente, visando a não ocorrência de ressecamento ou perda de crocância do mesmo.

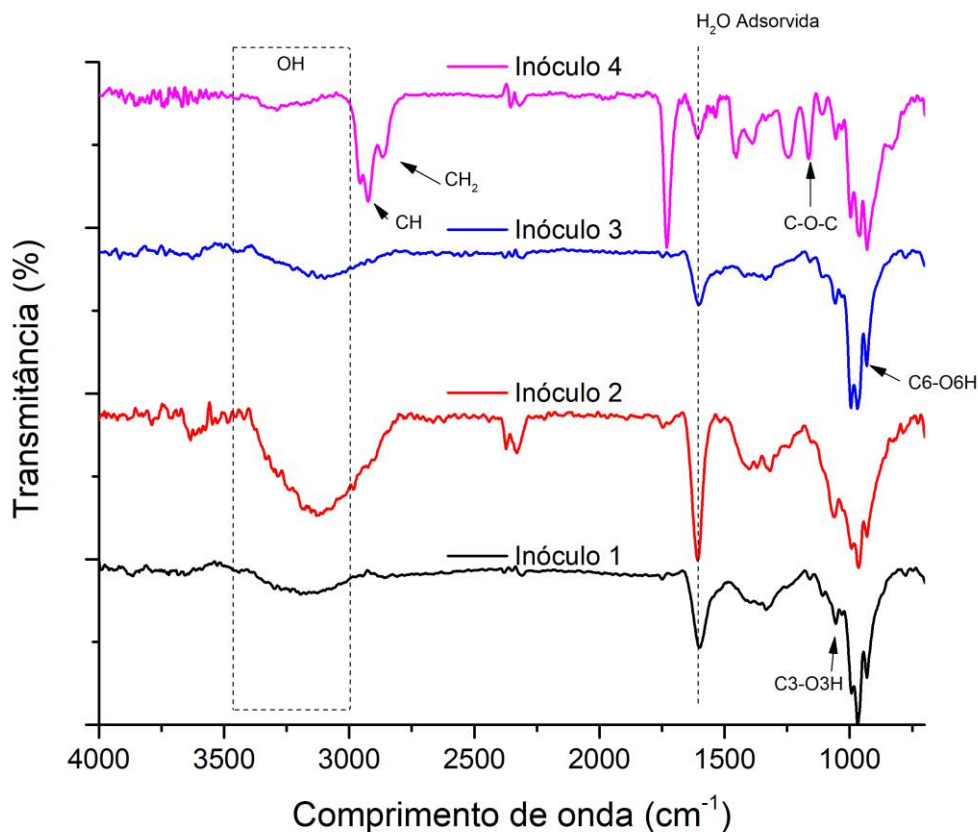
Coimbra (2016) produziu filmes de celulose bacteriana utilizando diferentes fontes de açúcar como substrato (manitol e glicerol). Ao analisar a permeabilidade ao vapor de água (PVA) obteve índices inferiores à  $0,24 \text{ g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$  para todos os filmes, corroborando com os valores verificados na Tabela 9. Isso se deve provavelmente ao fato da influência do processo de branqueamento sobre a estrutura dos mesmos, pois os reagentes utilizados reduzem o número e tamanho dos poros da membrana, dificultando a passagem do vapor.

Almeida e seus colaboradores (2013) realizaram a produção de filmes através de celulose bacteriana e fécula de batata, em diferentes concentrações. Verificaram que houve elevação na permeabilidade ao vapor de água em filmes em que a quantidade de celulose bacteriana era maior. Nos filmes onde a proporção de fécula de batata era superior a quantidade de celulose bacteriana, ocorreu o inverso, redução na PVA. Os filmes com baixas taxas são indicados para produção de embalagens de alimentos de alta umidade, evitando assim, perda de crocância, desidratação da superfície, perda de peso e alterações físico-químicas e sensoriais ao produto. Os filmes hidrofílicos, como é o caso dos filmes de celulose bacteriana, possuem PVA diretamente proporcionais à sua espessura (ALMEIDA *et al.*, 2013).

### 5.2.5 Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier – FT-IR

Na Figura 28 apresentam-se os espectros vibracionais obtidos através da análise de infravermelho das amostras 1 a 4.

Figura 28 – Espectros de infravermelho referentes as amostras 1 à 4.



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

De acordo com os espectros apresentados, é possível verificar que as amostras analisadas tratam-se de celulose bacteriana, sendo compatíveis com o descrito em literatura. São destacadas as vibrações de onda em banda de 3450  $\text{cm}^{-1}$  a 3000  $\text{cm}^{-1}$ , referente a estiramento em O-H, presença de banda em 2900  $\text{cm}^{-1}$  referente a C-H, banda em região de 2700  $\text{cm}^{-1}$  referente a  $\text{CH}_2$ , vibrações em região de 1600  $\text{cm}^{-1}$  referentes a água adsorvida, bandas característicos de celulose na região de 1300  $\text{cm}^{-1}$  a 900  $\text{cm}^{-1}$ , como C-O-C em 1200  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{C}_3\text{-O}_3\text{H}$  em 1100  $\text{cm}^{-1}$  e  $\text{C}_6\text{-O}_6\text{H}$  em 1000  $\text{cm}^{-1}$ -900  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas características citados na região de 1300  $\text{cm}^{-1}$  a 900  $\text{cm}^{-1}$  correspondem ao alongamento das ligações C-O, atribuídos, em sua maioria, a álcoois primários (GRANDE *et al.*, 2009a).

Aditiawati e seus colaboradores (2021) realizaram a caracterização de espectros de infravermelho específicos para *SCOBY* de kombucha e descreveram a presença de 5 grupos funcionais como marcas específicas: grupo O-H em  $3345\text{ cm}^{-1}$  correspondente a ligações de hidrogênio para ligar as microfibrilas de celulose entre si; grupo  $\text{CH}_2$  em  $2898\text{ cm}^{-1}$  e  $1314\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao grupo carboxila, utilizado para estimar a taxa de cristalização da celulose; grupos H-O-H em  $1644\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$  utilizados para determinar a taxa de absorção de água; grupo C-O em  $1107\text{ cm}^{-1}$  referente ao grupo polihidroxila, utilizado para confirmar que o *SCOBY* foi formado a partir de glicose e/ou seus derivados e; grupo C-O-C em  $1050\text{-}1055\text{ cm}^{-1}$  referente a ligação glicosídica, que desempenha papel na formação da celulose. Todas as ligações por eles citadas, são verificadas nas amostras, visto que, a celulose bacteriana foi obtida a partir de *SCOBY* de kombucha, utilizando sacarose como substrato.

Analisando os espectros de maneira individual, pode-se destacar que o espectro vibracional 4 é o mais semelhante ao apresentado em literatura para celulose. Nesta amostra, o processo de branqueamento foi realizado com menor quantidade de reagentes (100 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e menor temperatura durante o processo e a secagem ( $40^\circ\text{C}$ ). Todos os pontos citados encontram-se destacados, tendo pequenas alterações quanto à deslocamentos de comprimento de onda e intensidade do tamanho. Quando observado o estiramento em O-H na região de  $3500\text{ cm}^{-1}$  a  $3000\text{ cm}^{-1}$ , este apresenta-se com pequena intensidade, além disso, uma pequena alteração é verificada quanto a localização do pico de  $\text{H}_2\text{O}$  adsorvida, mudando para região de  $1700\text{ cm}^{-1}$ . As demais amostras apresentaram espectros similares. Pode-se verificar deslocamento na banda relacionada ao estiramento de O-H para regiões de  $3400\text{ cm}^{-1}$  a  $2900\text{ cm}^{-1}$ . Além disso, a presença das ligações C-H e  $\text{CH}_2$  não é verificada, demonstrando que o processo de branqueamento foi mais agressivo nessas amostras.

Vieira *et al.* (2013) citam que o espectro de absorção da celulose é a banda  $1.640\text{ cm}^{-1}$ , referente a ligação C-H, designada como parte do grupo carboxila e banda em  $1.100\text{ cm}^{-1}$  referente a ligações entre os grupos C-O, tal espectro e banda estão presentes em todas as amostras analisadas. Lima *et al.* (2018) realizaram a análise de FT-IR de nanofilmes de celulose bacteriana. Encontraram várias bandas característica referentes à celulose bacteriana, de acordo com o descrito em literatura e não encontraram bandas referentes à possíveis contaminantes em região de  $3220\text{ cm}^{-1}\text{-}3150\text{ cm}^{-1}$ , nitrogênio em região de  $1735\text{ cm}^{-1}\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$  e estruturas proteicas em  $1535\text{ cm}^{-1}$ . Apenas na amostra 4 é possível identificar a presença de estruturas proteicas na região de  $1530\text{ cm}^{-1}$ . Nesta amostra, o processo de branqueamento foi o mais brando, portanto, tais estruturas referem-se a proteínas provenientes



das bactérias do processo fermentativo, as quais, não foram 100% eliminadas. Além disso, Grande e seus colaboradores (2009a) citam em seus estudos, que a presença de duas bandas observados em  $760\text{ cm}^{-1}$  e  $700\text{ cm}^{-1}$ , são característicos de celulose bacteriana 100% pura, sendo referentes a cristalinidade  $I\alpha$  e  $I\beta$ , formas típicas da celulose microbiana. Tais bandas são verificadas apenas na amostra 4.

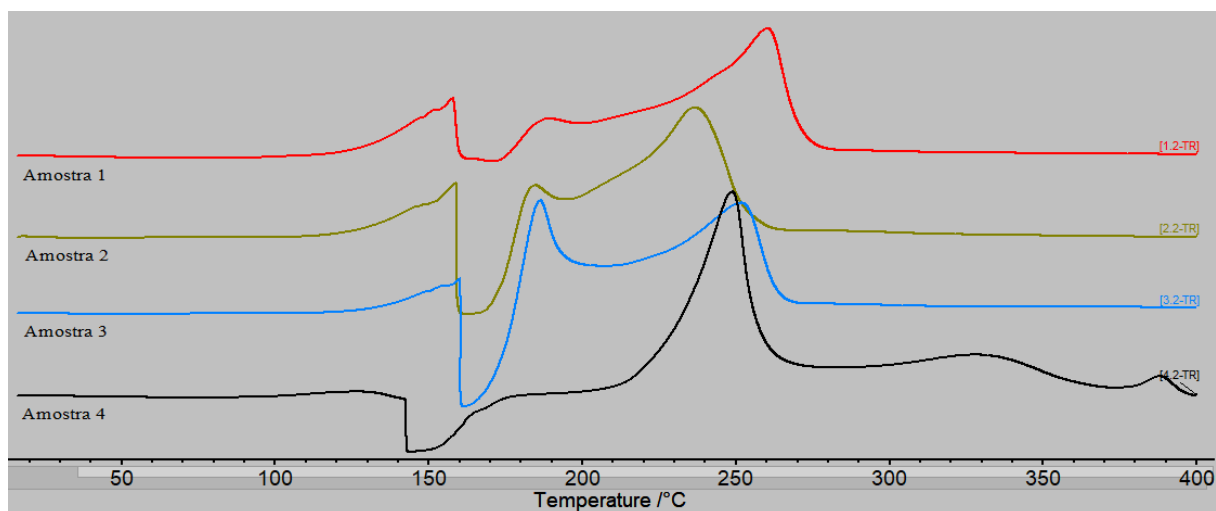
Grube e seus colaboradores (2016) realizaram estudo com o objetivo de comparar duas técnicas de FT-IR (HTS e microespectroscopia) visando avaliar a qualidade de celulose bacteriana produzida através do *SCOBY* da kombucha e celulose bacteriana produzida por culturas isoladas de AAB (*acetic acid bacteria*). Em ambas as técnicas, foram identificadas diferenças nas regiões espectrais, de acordo com a origem da celulose, o método de purificação e o substrato utilizado no processo fermentativo. Os autores citam que bandas intensas em região de  $1300\text{cm}^{-1}$ – $1200\text{ cm}^{-1}$  são indicativos de celulose bacteriana relativamente pura, tais bandas encontra-se presentes em alta intensidade em todas as amostras avaliadas no presente trabalho. Na técnica de microespectroscopia é possível controlar a pureza e avaliar a cristalinidade de membranas de celulose microbiana. Os espectros gerados das amostras de *SCOBY*, demonstraram uma celulose mais pura, quando branqueadas com  $\text{H}_2\text{O}$ , porém, nem com a utilização deste tratamento ou com tratamento alcalino existe remoção total das proteínas provenientes das bactérias. Outros autores utilizaram tratamentos semelhantes e/ou com outros reagentes, como KOH e identificaram que não houve remoção total das células proteicas, mesmo que presentes em baixas quantidades.

Fuller, Andaya e McClay (2018) produziram diversos filmes de celulose bacteriana e os contaminaram com proteína, albumina de soro bovino, lipídeos, ácidos nucleicos e DNA de salmão, além de um filme padrão, onde não houve contaminação. A análise de FT-IR mostrou exatamente em quais bandas encontravam-se os contaminantes e suas diferenças quanto ao filme padrão de celulose bacteriana pura, além de demonstrar quantitativamente o nível de contaminação. Todos os grupos funcionais referentes as contaminações realizadas puderam ser identificadas pela técnica demonstrando sua efetividade para esse tipo de análise.

#### **5.2.6 Calorimetria diferencial de varredura - DSC**

Na Figura 29, estão apresentadas as curvas de temperatura da análise de DSC de todas as amostras.

Figura 29 – Curva de DSC das amostras 1 à 4.



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Através da figura acima, é possível verificar que as amostras 1, 2 e 3 apresentaram comportamento semelhante, com pico endotérmico em temperatura de 160°C-180°C referente a dessorção de água e pico exotérmico em temperatura de 200°C-280°C referente a degradação da celulose. Na amostra 4, pode-se verificar a existência de três picos, um endotérmico (140°C-160°C) referente a perda de água e dois exotérmicos, 230°C-260°C e 300°C-350°C, respectivamente, ambos referentes a processo de degradação. O primeiro pico foi devido a degradação de compostos gerados durante o processo de branqueamento, de acordo com o observado na análise de FT-IR, e, o segundo, referente a degradação da celulose.

Nas amostras 1 a 3, verifica-se que o processo de branqueamento afetou o filme celulósico, causando alterações nos mesmos, reduzindo sua temperatura de resistência térmica. Enquanto na amostra 4, apesar da existência de 3 picos, a temperatura de degradação encontra-se em 300°C-350°C, corroborando com o já descrito em literatura, referente a temperatura de degradação da celulose bacteriana.

Vieira *et al.* (2011) realizaram a produção de biofilmes de celulose a partir de resíduos de frutas e folhas de chá verde, associando as bactérias *Gluconacetobacter xylinum* e *Saccharomyces cerevisiae*. Observaram através da análise de DSC, nos filmes produzidos a partir de chá verde, a existência de um pico endotérmico em 180°C referente a dessorção de água, corroborando com as temperaturas encontradas nas curvas da Figura 29.

Lima (2014) realizou a análise de DSC de filmes de celulose bacteriana produzidos a partir do líquido de sisal e de suco de caju. Verificou a presença de um pico endotérmico em

100°C, referente a dessorção de água e outro de caráter exotérmico em 350°C, referente a degradação da celulose. Além disso, o autor cita que o pico exotérmico em 350°C, é uma característica esperada na celulose bacteriana, corroborando com o verificado na amostra 4. Ainda, o autor menciona que a celulose bacteriana, quando em seu estado mais puro, pode ser aquecida até 350°C, para depois iniciar seu processo de degradação. Quando passada por processos de tratamento alcalinos fortes, ocorre alteração no material e, este, passa a apresentar temperatura de degradação menor, em torno de 250°C, mesma temperatura de degradação da celulose vegetal. Tal temperatura, foi verificada nas amostras 1 a 3, visto que o processo de branqueamento foi mais agressivo nestas amostras.

Freitas, Senna e Botaro (2017) realizaram a análise de DSC de celulose e de celulose adicionada de outros compostos, passada por processo de branqueamento. Verificaram na celulose pura, a presença de um pico endotérmico em 123°C e um pico exotérmico em 221°C. Nas amostras de celulose modificadas, passadas por processo de branqueamento forte, houve alteração na temperatura dos picos. O evento endotérmico passou a acontecer na casa dos 77°C a 91°C, enquanto o evento exotérmico mudou para 248°C-250°C. Nos filmes analisados após processo de branqueamento, a temperatura de degradação, apresentou-se semelhante as verificadas nas amostras 1, 2 e 3.

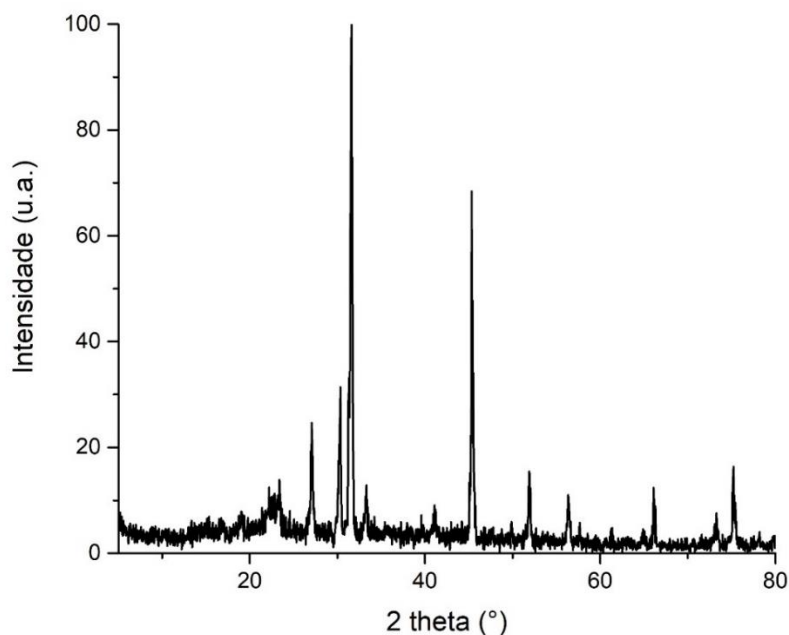
Sederavičiūtė, Bekampienė e Domskienė (2019) estudaram o efeito do processo de branqueamento nas propriedades da celulose bacteriana produzida a partir do SCOBY da kombucha. Os pré-tratamentos utilizados foram: NaOH e H<sub>2</sub>O, além da presença de uma amostra controle de celulose, a qual, não passou por processo de branqueamento. Verificaram na análise de DSC que nas amostras onde realizou-se branqueamento, houve um pico endotérmico em 221°C, enquanto nas amostras que passaram por branqueamento com NaOH e H<sub>2</sub>O, este pico passou a ocorrer em 129°C e 144°C, respectivamente. Esses eventos são decorrentes de produtos secundários do processo fermentativo, provavelmente, decorrentes da presença de açúcar residual.

### **5.2.7 Difração por raios X – DRX**

Nas Figuras 30, 31, 32 e 33 estão apresentados os difratogramas obtidos através da análise de DRX das amostras 1 a 4. É possível verificar que as amostras 1, 2 e 3 apresentaram comportamentos parecidos, enquanto a amostra 4 apresenta divergência com relação as demais. Da amostra 1 a 3, identifica-se um pico principal, de maior amplitude em relação aos

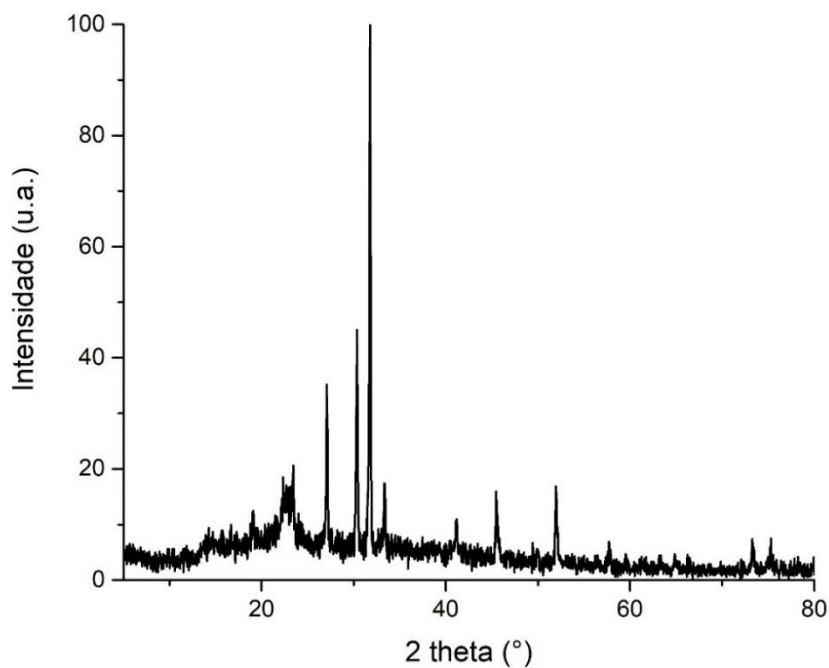
outros, no ângulo de difração  $2\theta$   $31^\circ$ . Enquanto para amostra 4, este pico está localizado em torno de  $45^\circ$ , apesar de apresentar pico em  $31^\circ$  também. Além disso, é possível observar um pequeno pico (baixa amplitude), de grande largura, em  $22^\circ$  para todas as amostras, característico de celulose.

Figura 30 – Difratoograma da amostra 1.



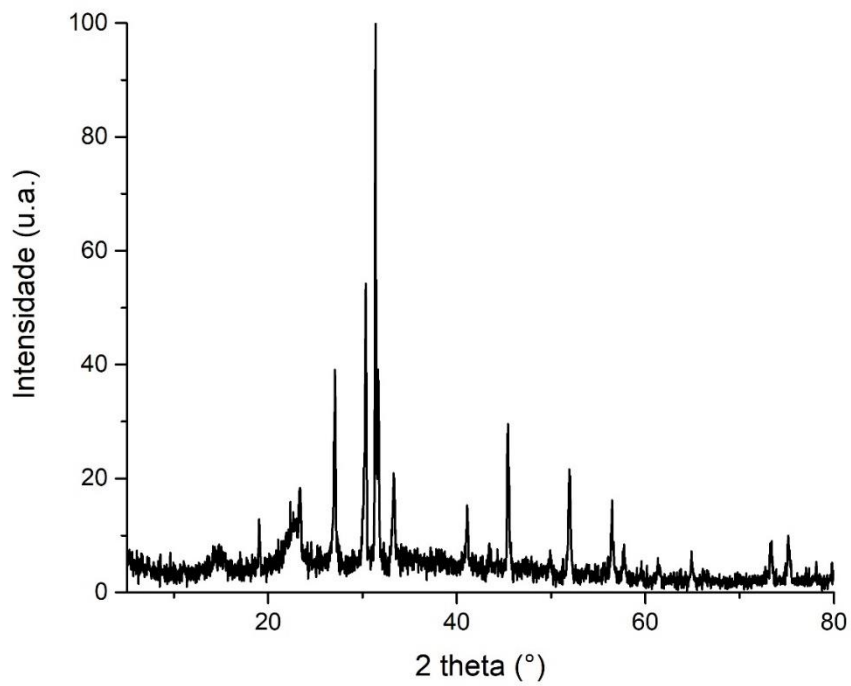
Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Figura 31 – Difratoograma da amostra 2.



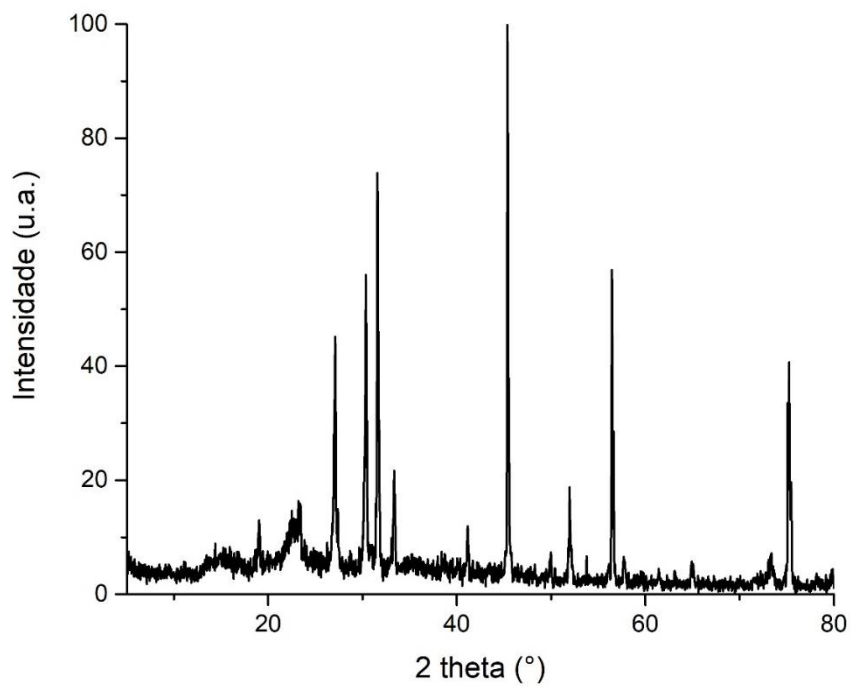
Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Figura 32 – Difratoograma da amostra 3.



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Figura 33 – Difratoograma da amostra 4.



Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Em todos os difratogramas é possível verificar a presença de diversos ruídos e picos em posições variadas, tudo isso é justificado pelo processo de branqueamento realizado. Os reagentes utilizados em tal processo, causaram alterações na estrutura da celulose, além de deixar sais residuais na superfície dos filmes, provenientes do NaClO utilizado no branqueamento, causando ainda mais presença de ruídos durante a análise. Coimbra (2016) cita que tratamentos com utilização NaOH superior a 6%, ou similares, pode causar alterações nas estruturas cristalinas da celulose e como estas irão se apresentar no DRX, além de causar alteração da celulose I para celulose II. No presente trabalho, utilizou-se NaClO à 10%, indicando que, este, pode ter causado modificações na celulose. O reagente teve sua utilização também em altas temperaturas, o que acelera ainda mais a conversão de celulose I em celulose II. É possível verificar comportamento para ambas as celuloses, tipo I e tipo II, em todos os difratogramas.

Pereira *et al.* (2012) verificaram na análise de difração por raios X de celulose vegetal, intensidade de vale mínimo (referente a zona amorfa) em 18°/19° para celulose I e 13°/15° para celulose II. Em relação a intensidade do pico máximo (referente a zona cristalina), obtiveram intensidade máxima de 20°/23° para celulose I e 18°/22° para celulose II. Todos os pontos citados, são verificados nos difratogramas das amostras 1 a 4.

Yang e seus colaboradores (2013) caracterizaram celulose bacteriana produzida por *Gluconacetobacter intermedius* através de DRX. Observaram picos em 14,4°, 16,5° e 22,4°, todos característico de BC. O padrão obtido pela análise foi compatível com o de celulose tipo I. Além disso, obtiveram índice de cristalinidade de 75%, estando dentro do esperado para celulose bacteriana (acima de 60%).

Tabela 10 – Índice de cristalinidade (%) das amostras 1 a 4.

| <b>ÍNDICE DE CRISTALINIDADE (%)</b> |        |
|-------------------------------------|--------|
| <b>Amostra 1</b>                    | 36,94% |
| <b>Amostra 2</b>                    | 63,85% |
| <b>Amostra 3</b>                    | 51,79% |
| <b>Amostra 4</b>                    | 52,43% |

Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Na Tabela 10 apresentam-se os resultados de índice de cristalinidade das amostras 1 a 4. É possível verificar que o maior índice obtido foi na amostra 2, seguido das amostras 4, 3 e

1. Segundo Pereira *et al.* (2012), a determinação do índice de cristalinidade é importante para entender o comportamento de materiais celulósicos, pois a celulose, possui regiões cristalinas e regiões amorfas, e o IC (índice de cristalinidade), obtido através da análise de DRX, demonstra as mudanças que ocorrem na estrutura de tais regiões. O índice de cristalinidade para BC pura encontra-se acima de 60% (entre 60%-90%). Apenas a amostra 2 apresentou IC dentro dos parâmetros estabelecidos para celulose bacteriana. Nas demais amostras, o índice manteve-se abaixo, demonstrando que o processo de branqueamento e as temperaturas utilizadas no mesmo e durante a secagem, afetaram a cristalinidade do material, causando aumento das regiões amorfas. Destaque especial para a amostra 1, onde o IC foi extremamente baixo, demonstrando que tratamentos mais agressivos durante o branqueamento e secagem, com altas quantidades de reagentes e altas temperaturas, não são indicados para celulose microbiana.

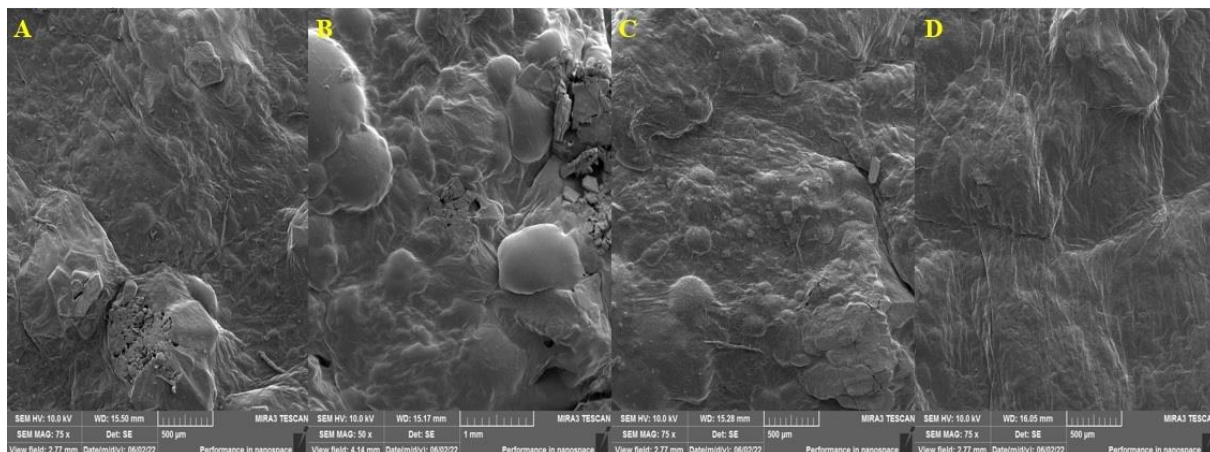
Pillai *et al.* (2021) realizaram análise de DRX de filmes de celulose bacteriana puros e de filmes que haviam passado por tratamento ácido. Para filme de celulose bacteriana sem passagem por tratamento, obtiveram índice de cristalinidade de 67,3%, enquanto para os filmes que passaram por tratamento ácido, houve redução de tal índice para 46,7%. O tratamento ácido, em altas concentrações, causa hidrólise nas regiões amorfas da celulose, fazendo com que, estas, aumentem de tamanho, causando redução no tamanho das regiões cristalinas.

Grande *et al.* (2009a, 2009b) identificaram através da análise de DRX, a presença de picos largos em  $14,5^\circ$  e  $22,5^\circ$  em amostras de celulose bacteriana pura, tais picos são característicos de BC. Além disso, picos de grande largura indicam que o material não é totalmente cristalino. Em relação ao índice de cristalinidade obtiveram valores de 74,8% para BC pura (maior índice de cristalinidade entre todas as amostras). Em ambos os filmes em que havia a presença de amido, além da celulose bacteriana, o índice de cristalinidade mais baixo é justificado pelo tamanho da zona amorfa do amido.

### **5.2.8 Microscopia eletrônica de varredura – MEV**

Nas Figuras 34, 35, 36, 37 e 38 apresentam-se as micrografias obtidas através da análise de MEV, realizadas em aumentos variando de 50x a 30kx.

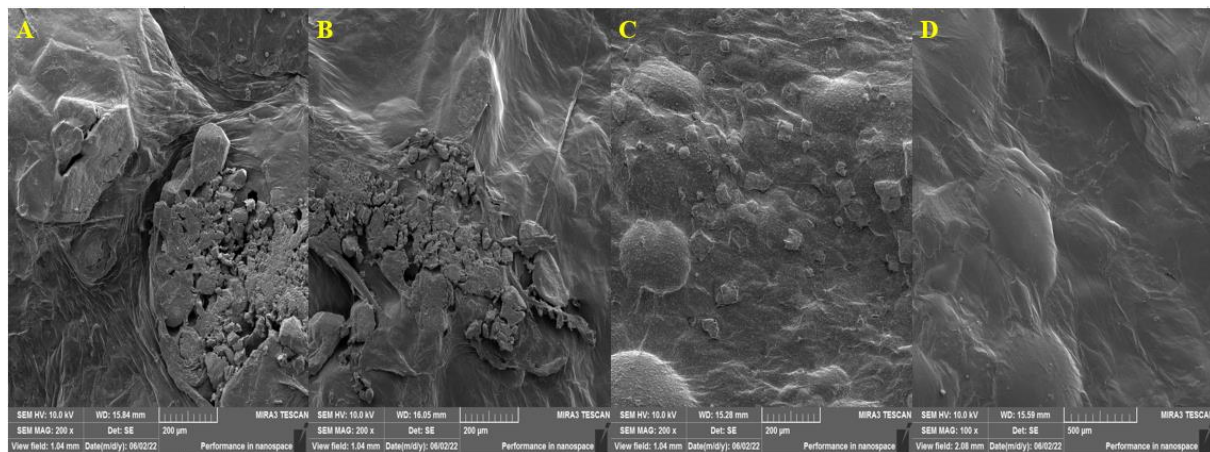
Figura 34 – Micrografias das amostras 1 a 4 com aumento de 50x a 99x.



Descrição: A) Inóculo 1; B) Inóculo 2; C) Inóculo 3; D) Inóculo 4. Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

A Figura 34 apresenta as micrografias das amostras 1 a 4, onde pode ser observado que a superfície de todos os filmes apresentou aspecto plano e rugoso. Na imagem A, referente a amostra 1, verifica-se a presença de um aglomerado de sais em sua superfície, assim como na imagem B, referente a amostra 2 (parte superior da imagem, lado direito). Na imagem C, referente a amostra 3 é possível observar a presença dos sais espalhados, além de possuir o aspecto mais rugoso entre todas as amostras. Na imagem D, referente a amostra 4, observa-se a superfície mais homogênea de todas, sem presença de sais e com menor rugosidade, podendo se observar também, um leve aspecto fibroso. Oliveira e Carminatti (2016) obtiveram resultados semelhantes aos observados na Figura 34, verificando através da microscopia eletrônica de varredura, que os filmes de celulose bacteriana por eles produzidos, apresentavam superfície plana, rugosa e com presença de fibras.

Figura 35 – Micrografias das amostras 1 a 4 com aumento de 100x a 499x.



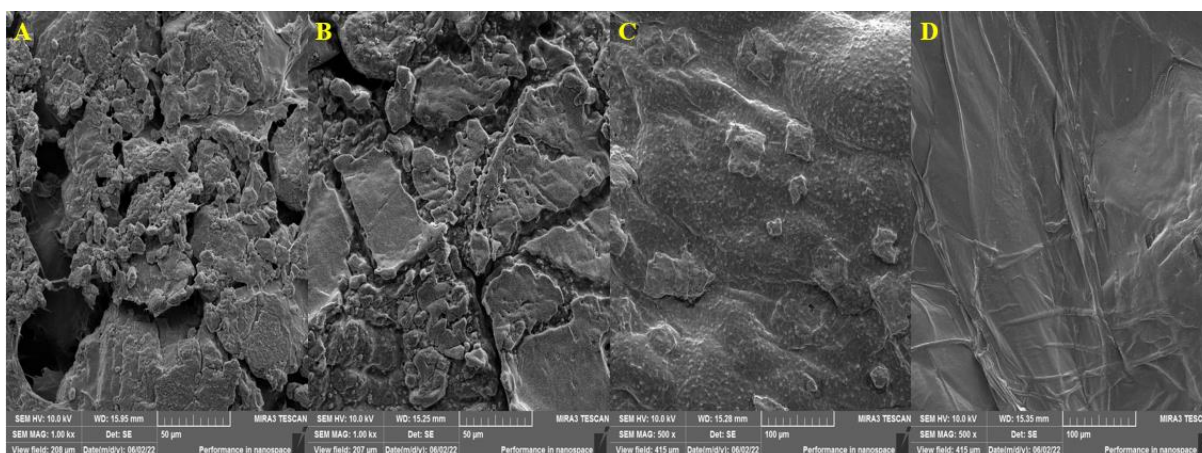
Descrição: A) Inóculo 1; B) Inóculo 2; C) Inóculo 3; D) Inóculo 4. Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.



Na Figura 35, subiu-se o aumento das micrografias para 100x a 499x. Nas imagens A e B estão evidenciados os aglomerados de sais. Tais aglomerados são provavelmente provenientes dos reagentes utilizados no processo de branqueamento, em especial o NaClO. Na imagem referente a amostra 3, é possível verificar, de forma mais clara, a presença de sais espalhados em sua superfície e sua grande rugosidade. Na imagem referente a amostra 4 percebe-se que esta, se mantém homogênea, com superfície mais lisa e fibrosa. As amostras referentes as imagens A e B foram obtidas em temperaturas mais elevadas (50°C), enquanto as amostras referentes as imagens C e D foram obtidas em temperaturas menores (40°C).

Vasques (2007) cita que aumentos na rugosidade de filmes de celulose bacteriana, observados através de microscopia eletrônica de varredura, podem estar ligados ao tipo de tratamento térmico realizado, diminuindo a resistência em relação à rupturas. Quando submersos em água, os canais presentes nos filmes, possuem capacidade de reter solvente, aumentando assim, a resistência à ruptura do material. Filmes úmidos são mais elásticos e resistentes, quando comparados com filmes secos.

Figura 36 – Micrografias das amostras 1 a 4 com aumento de 500x a 1kx.



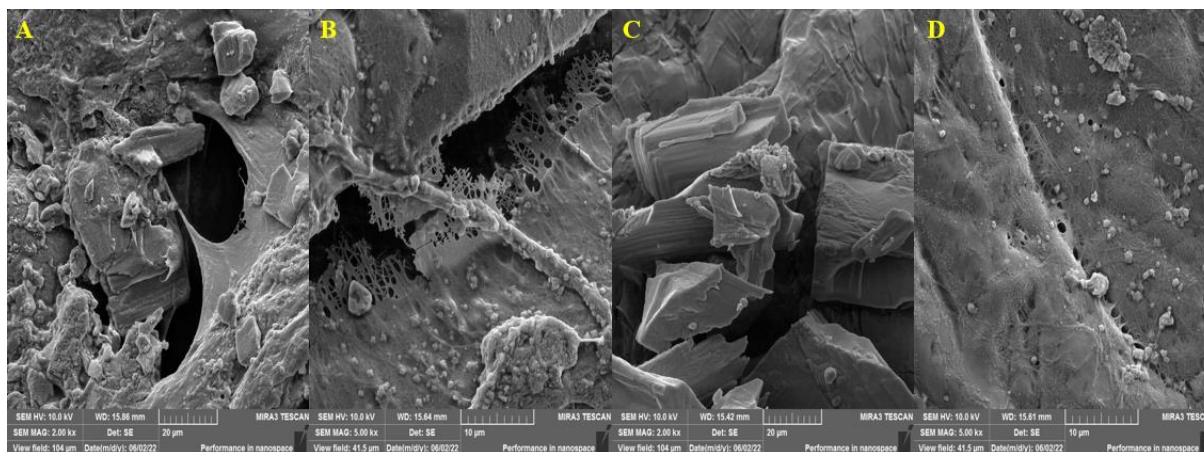
Descrição: A) Inóculo 1; B) Inóculo 2; C) Inóculo 3; D) Inóculo 4. Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Na Figura 36, com aumento de 500x à 1kx, é possível verificar que nas imagens A e B, há grande quantidade de sais na superfície e, estes, apresentam-se unidos e aderidos ao filme. Na imagem C, verifica-se de forma mais clara, a presença de sais espalhados na superfície e um aspecto altamente rugoso. Na imagem D, é possível visualizar que a superfície se mantém homogênea, plana e com fibras evidentes. Na imagem A, referente a amostra 1, o processo de branqueamento foi o mais agressivo, sendo possível verificar ruptura da película presente na superfície do filme. Além disso, nesta amostra e na amostra 2, as

temperaturas do processo foram mais elevadas (50°C), o que demonstra que, em altas temperaturas, os sais presentes nos reagentes se mantêm mais aderidos ao filme. Nas amostras 1 e 3, a quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada no processo de branqueamento, foi mais alta (200 mL), demonstrando que, em amostras onde a quantidade de reagentes é elevada, existe a presença de sais residuais, mesmo com a utilização de temperaturas menores. Na amostra 4, o processo de branqueamento foi o mais brando de todos (baixa temperatura e baixa quantidade H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), demonstrando que estes são os melhores parâmetros quanto pensa-se em poucas alterações na morfologia da celulose e na obtenção de uma celulose mais pura.

Amarasekara, Wang e Grady (2020) produziram filmes de celulose bacteriana a partir do SCOBY de kombucha e realizaram diferentes processos de branqueamento nos mesmos. Observaram através da microscopia eletrônica de varredura que, em filmes em que houve utilização de hidróxido de sódio no processo de branqueamento, havia presença de sais na superfície destes, corroborando com o verificado nas imagens 34 a 36, visto que, no processo de branqueamento dos filmes “inóculo 1” à “inóculo 4” houve a utilização de hipoclorito de sódio.

Figura 37 – Micrografias das amostras 1 a 4 com aumento de 2kx a 5kx.



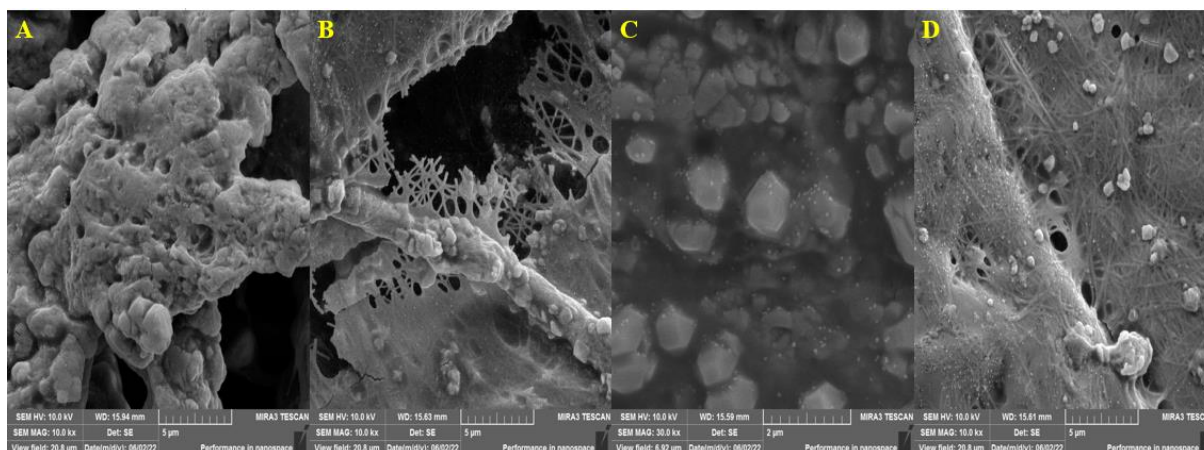
Descrição: A) Inóculo 1; B) Inóculo 2; C) Inóculo 3; D) Inóculo 4. Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Nas micrografias obtidas em aumento de 2kx a 5kx, como mostra a Figura 37, é possível observar na imagem A, a ruptura ocorrida na película protetora do filme. Além disso, há grande quantidade de sais, confirmando que o tratamento mais agressivo e a alta temperatura, causaram alterações morfológicas na celulose. Na imagem B, mantém-se a presença dos sais, porém, é possível verificar a presença de pequenos poros, característicos de celulose bacteriana. Isso demonstra que mesmo com a alta quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, temperaturas

mais brandas no processo de branqueamento e secagem, ajudam a manter a conformação da celulose. Na imagem C, observa-se aspecto mais quebradiço do filme, fato este ligado a sua alta rugosidade. Isso demonstra que mesmo com baixa adição de reagente, a alta temperatura afeta a resistência dos filmes. Por fim, na imagem D, referente a amostra 4, é possível verificar a presença de diversas fibras unidas, características da BC, apresentando uma rede bastante entrelaçada e resistente. Além disso, há a presença de pequenos poros, também característicos de BC, demonstrando que o tratamento menos agressivo, manteve a morfologia original de filmes de celulose, sendo este, um filme celulósico mais puro, o que corrobora com o verificado nas análises de DSC e FT-IR.

Yang e seus colaboradores (2013) realizaram a obtenção de filmes de celulose bacteriana a partir de meio comercial HS e de meio contendo solução de resíduos cítricos. Através da microscopia eletrônica de varredura, observaram que os filmes produzidos em meio cítrico, possuíam fibras de celulose mais espessas, resistentes e unidas, semelhantes as encontradas na Figura 37. Isso demonstra que meios alternativos de fermentação, como resíduos cítricos e kombucha, podem produzir uma celulose microbiana de maior qualidade, com fibras mais resistentes, espessas e entrelaçadas, tornando o tamanho dos poros menor.

Figura 38 – Micrografias das amostras 1 a 4 com aumento de 10kx a 30kx.



Descrição: A) Inóculo 1; B) Inóculo 2; C) Inóculo 3; D) Inóculo 4. Fonte: ELABORADO PELO AUTOR.

Por fim, na Figura 38, onde os aumentos foram de 10kx a 30kx, ficou evidente que na imagem A, referente a amostra 1, por conta da alta quantidade de  $H_2O_2$  associado ao  $NaClO$  e da alta temperatura, há predomínio de aglomerado de sais na superfície do filme. Na imagem B, os poros característicos de BC ficam mais evidenciados e a presença de sais é mantida, demonstrando que a alta quantidade de  $H_2O_2$  associado ao  $NaClO$  deixa resíduos, porém, por

conta da baixa temperatura de branqueamento e secagem, é possível preservar os poros característicos. Na imagem C, é possível observar a presença de vários pequenos pontos brancos, estes, são os sais provenientes do processo de branqueamento, porém, por conta da baixa temperatura utilizada, não se aderiram ao filme. Por fim, na imagem D, referente a amostra 4, observa-se uma micrografia semelhante as obtidas através de MEV de celulose bacteriana, com presença de vários pequenos poros e fibras unidas, demonstrando que processos de branqueamento mais brandos, causam baixa alteração morfológica na celulose.

Pereira *et al.* (2012) produziram filmes de celulose a partir de bagaço de cana e realizaram processo de branqueamento dos mesmos. Através da caracterização por microscopia eletrônica de varredura, verificaram que a superfície dos filmes era plana e fibrosa e conforme aumentava-se a resolução, era possível visualizar, de forma mais clara, a presença de rugosidades. Além disso, em filmes onde o branqueamento foi mais agressivo, as fibras passaram a ter aspecto mais quebradiço e foram verificados pontos esbranquiçados em sua superfície, provenientes dos reagentes utilizados no branqueamento. Todos os achados observados pelos autores, corroboram com os verificados no presente trabalho.

Aditiawati *et al.* (2021) produziram e caracterizaram nanofilmes de celulose bacteriana obtidos através de SCOBY de kombucha. Verificaram que as fibras de celulose possuem entre 270 nm – 740 nm de tamanho.

## 6 CONCLUSÃO

De acordo com as análises realizadas, resultados obtidos e observações feitas na primeira fase, alguns ajustes foram necessários, pensando no produto. Primeiro, verificou-se a necessidade de padronizar o processo fermentativo desde seu início, pois desta forma, é possível produzir filmes com conformação física uniforme. Além disso, verificou-se a necessidade de padronização da espessura de retirada dos filmes de tal processo (5-6mm mostrou-se como a espessura ideal, pensando em alto rendimento celulósico e facilidade na realização do processo de branqueamento).

Com relação ao processo de branqueamento realizado na primeira fase, verificou-se efetividade por parte dos reagentes utilizados. Porém, com relação ao hipoclorito de sódio (NaClO), foi possível observar que, este, não deveria atingir a adição de 500 mL de NaClO para 500 mL de água (H<sub>2</sub>O). Quando tal quantidade era atingida ou ultrapassada, os filmes perdiam sua conformação, tornando-se moles/flácidos e com difícil manuseio. Portanto, padronizou-se como ideal, a quantidade de 300 mL de NaClO para 500 mL de H<sub>2</sub>O. Já com relação ao peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi possível concluir, nesta primeira fase, que, este, não deveria ser adicionado em quantidades iguais ou superiores à 300 mL, pois deixava o filme ainda mais mole e flácido, além de afetar a integridade física dele, causando ruptura da película protetora existente na superfície e extravasamento do conteúdo interno.

Em relação ao produto obtido, verificou-se que o tempo e a temperatura utilizados no processo de branqueamento e secagem, afetavam sua qualidade. Para filmes em que temperaturas maiores eram utilizadas, se estes tivessem grande espessura, havia escurecimento dos mesmos, como se o ocorresse uma queima superficial. Em temperaturas mais baixas, a secagem era lenta, além de a extração de celulose ser mais baixa. As temperaturas de 40°C e 50°C, dependendo da espessura dos filmes, demonstraram-se como as melhores pensando no produto final.

Sobre o rendimento de celulose bacteriana, o melhor resultado obtido em termos de massa (g) e percentual (%) foi na amostra “branqueamento 5”, porém, pela alta quantidade de reagentes utilizados, superando as quantidades de NaClO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acima citadas, este, não apresentou boa conformação, maleabilidade e aspecto visual. Os melhores resultados obtidos, sem causar grandes alterações à conformação e integridade física do filme, foram a partir do branqueamento 6, tendo um alto rendimento em massa (entre 32 e 48 g) e um bom rendimento percentual (entre 12% e 17%).

Através das análises de FT-IR e DSC realizadas nesta primeira fase concluiu-se que os tratamentos mais brandos eram melhores, pensando em obtenção de uma celulose mais pura, além de demonstrar que altas quantidades de reagentes, deixavam resíduos nos filmes, causando alterações nos espectros de FT-IR quando comparados à uma BC pura, e alteração na temperatura de degradação da celulose para baixo, demonstrando perda na resistência térmica da mesma, além de gerar compostos secundários, os quais, não estão presente em uma BC altamente pura.

Na segunda fase do experimento, foi possível concluir que as padronizações realizadas a partir do observado na primeira fase apresentaram resultados positivos, pois ao padronizar o início do processo fermentativo através de um inóculo, obteve-se uniformidade estrutural dos filmes e ao padronizar a espessura de retirada do mesmo, obtiveram-se rendimentos de celulose em massa e percentual, com baixas variações (uniformidade nos resultados), além de facilitar todo o processo de branqueamento.

Partindo das variáveis estudadas nessa segunda fase (quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e temperatura de secagem) e sua influência sob os filmes celulósicos obtidos, foi possível observar que o maior rendimento em massa e percentual ocorreu na amostra 2, na qual, quantidade de peróxido de hidrogênio foi menor (100 mL) e a temperatura de secagem foi maior (50°), demonstrando que tratamentos não tão agressivos, com baixa quantidade de reagentes e temperaturas amenas, propiciam os melhores índices de rendimento.

Com relação as análises de bancada realizadas: cor instrumental, grau de intumescimento e permeabilidade ao vapor de água, o melhor resultado obtido foi na amostra 3. As análises de bancada realizadas, foram feitas pensando principalmente em futuras aplicações comerciais dos filmes. Na área de alimentos, pensando em aplicações no processo de filtração do leite ou como filme de revestimento de embutidos, substituindo a utilização de tripas, o ideal seriam filmes possuíssem coloração mais clara (puxando para o branco), baixo grau de intumescimento, pois quanto se trata da filtração de líquidos, o filme não deve reter grande quantidade de água (ou do líquido que será filtrado), e baixo grau de permeabilidade ao vapor de água, pois como esta analisa a capacidade de transpasse ou permeação da água através do filmes, o ideal é que ocorra pouca ou nenhuma passagem de água do ambiente e também, que o produto, perca baixa quantidade de água para o ambiente. Todas estas características foram verificadas na amostra 3.

Quanto as análises instrumentais realizadas: DSC, FT-IR, DRX e MEV, estas foram feitas buscando avaliar a eficiência do processo de branqueamento na extração de celulose e a

presença de resíduos provenientes do processo fermentativo ou do próprio processo de branqueamento. Nelas, foi possível verificar que a amostra 4, na qual, as quantidades de reagente eram baixas (100 mL) e a temperatura do processo também (40°C), apresentou melhor resultado. Nas análises de tal amostra, verificou-se o maior índice de pureza da celulose bacteriana, além de baixa presença de resíduos provenientes do processo de branqueamento, demonstrando que quando se busca maior pureza, o ideal são tratamentos mais brandos, com menor quantidade de reagentes durante o branqueamento e temperaturas de secagem mais brandas, pois estes, não afetam a estrutura, conformação e propriedades físico químicas da celulose.

Por fim, conclui-se que, dependendo da finalidade para qual a celulose bacteriana será obtida, pode-se variar os tratamentos utilizados. Quando se busca alto rendimento ou extração de celulose, o ideal são tratamentos com menor quantidade de reagente e uma temperatura mais elevada. Quando se busca uma celulose de maior pureza e sem presença de grandes resíduos dos reagentes utilizados no processo de branqueamento, o ideal é a utilização de tratamentos o mais brandos possíveis, com baixa quantidade de reagentes e menor temperatura. Já quando se busca a obtenção de celulose microbiana visando sua aplicação comercial, o ideal é a utilização de maior quantidade de reagente, em temperaturas menores. No entanto, mais estudos são necessários para a obtenção de uma celulose bacteriana com alta pureza, alto rendimento e que possa ser comercialmente aplicada.

## REFERÊNCIAS

- ADITIAWATI, Pingkan *et al.* The nanocellulose fibers from symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY) kombucha: preparation and characterization. In: KUMAR, Brajesh. **Nanofibers – Synthesis, Properties and Applications**. IntechOpen, 2021, cap. 8, p. 289-416.
- ALMEIDA, Denise 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**. São Paulo – SP, v. 23, n. 4, p. 538-546, 2013.
- ALMEIDA, Karina Moita. **Tratamento do efluente alcalino do branqueamento da polpa de celulose pelo processo de separação por membranas**. 2002. 139 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2002.
- AMARAL, Miriam Cristina Santos *et al.* Avaliação do emprego de microfiltração para remoção de fibras do efluente de branqueamento de polpa celulósica. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. Belo Horizonte – MG, v. 18, n. 1, p. 65-74, jan. – mar. 2013.
- AMARASEKARA, A. S.; WANG, D.; GRADY, T. L. A comparison of kombucha SCOBY bacterial cellulose purification methods. **Springer Nature (SN) Applied Sciences**. Estados Unidos da América, v. 2, n. 240, p. 1-7, jan. 2020.
- ANTOLAK, H.; PIECHOTA, D.; KUCHARSKA, A. Kombucha tea - A double power of bioactive compounds from tea and symbiotic culture of bacteria and yeasts (SCOBY). **Antioxidans**. Suíça, v. 10, n. 10, p. 1541-1561, set. 2021.
- ASHRAFI, A.; JOKAR, M.; NAFCHI, A. M. Preparation and characterization of biocomposite film based on chitosan and kombucha tea as active food packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**. Irã, v. 108, p. 444-454, mar. 2018.
- ASTM E96/E96M-14. **Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials**. ASTM International, West Conshohocken – PA. 2015. Disponível em: <[https://www.astm.org/e0096\\_e0096m-14.html](https://www.astm.org/e0096_e0096m-14.html)>.
- AZEREDO Henriette M. C. *et al.* Bacterial cellulose as a raw material for food and food packaging applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**. Brasil v. 3, n. 7, p. 1-14, fev. 2019.
- AZEVEDO, Marco Antônio Bandeira. **Diferentes processos de branqueamento da celulose e seus efeitos nas propriedades físicas e cristalinidade**. 2011. 181 p. Tese (Doutorado em Ciências – Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte – MG, 2011.
- BARUD, Hernane da Silva. **Preparo e caracterização de novos compósitos de celulose bacteriana**. 2006. 114 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara – SP. 2006.



BASSETTI, Fátima de Jesus. **Preparação, caracterização e aplicação de membranas poliméricas microporosas assimétricas**. 2002. 192 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Campinas – SP, 2002.

BASSETTI, F.J; PERES, L.; PETRUS, J. C.C. Preparação, caracterização e utilização de membranas microporosas poliméricas de PVDF. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 7, 2003, Belo Horizonte – MG. **Anais...** 2003. Disponível em: <<https://www.ipen.br/biblioteca/cd/cbpol/2003/Document/148.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2021.

BEDOR, Priscilla Braga Antunes *et al.* Advances and perspectives in the use of polymers in the environmental area: a specific case of PBS in bioremediation. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. São Carlos – São Paulo, v. 30, n. 2, p. 1 – 10, 2020.

BETLEJ, Izabela *et al.* Influence of SCOBY microorganisms' cultivation conditions on the synthesis efficiency and selected qualities of bacterial cellulose. **BioResources**. Polônia, v. 16, n. 3, p. 6147-6158, 2021.

BIDUSKI, Bárbara *et al.* Impact of acid and oxidative modifications, single or dual, of sorghum starch on biodegradable films. **Food Chemistry**. Brasil, v. 214, p. 53-60, jan. 2017.

CACICEDO, Maximiliano L. *et al.* Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. **Bioresource Technology**. Argentina, v. 213, p. 172-180, ago. 2016.

CARREIRA, Pedro *et al.* Utilization of residues from agro-florest industries in the production of high value bacterial cellulose. **Bioresource Technology**. Portugal, v. 102, n. 15, p. 7354-7360, ago. 2011.

CAVALCANTI, Luciana Marins *et al.* Efficacy of bacterial cellulose membrane for the treatment of lower limbs chronic varicose ulcers: a randomized and controlled trial. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. Recife – PE, v. 44, n. 1, p. 72-80, jan. – fev. 2017.

CHAKRAVORTY, Somnath *et al.* Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. **International Journal of Food Microbiology**. India, v. 220, p. 63-72, mar. 2016.

COELHO, Fernanda *et al.* Toxicity of therapeutic contact lenses based on bacterial cellulose with coatings to provide transparency. **Contact Lens and Anterior Eye**. Araraquara – SP, v. 42, n. 5, p. 512-519, out. 2019.

COELHO, Raquel Macedo Dantas *et al.* Kombucha: Review. **International Journal of Gastronomy and Food Science**. Ceará – Brasil, v. 22, p. 1-12, dez. 2020.

DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. Tea, Kombucha, and health: a review. **Food Research International**. Canadá, v. 33, p. 409-421, jan. 2000.

EL HALAL, Shanise Lisie Mello *et al.* Morphological, mechanical, barrier and properties of films based on acetylated starch and cellulose from barley. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Pelotas – RS, v. 97, n. 2, p. 411-419, jan. 2017.

EPE – Empresa de Pesquisa Energética. **A indústria de papel e celulose no Brasil e no Mundo**. Governo Federal, 2022. Disponível em: <[https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-650/Pulp%20and%20paper\\_EPE+IEA\\_Portugu%C3%AAs\\_2022\\_01\\_25\\_IBA.pdf](https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-650/Pulp%20and%20paper_EPE+IEA_Portugu%C3%AAs_2022_01_25_IBA.pdf)>

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; SILVA, F. C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**. São Paulo, v. 32, n. 3, p. 623-638, abr. 2009.

FREITAS, R. R. M.; SENNA, A. M.; BOTARO V. R. Influence of degree of substitution on thermal dynamic mechanical and physicochemical properties of cellulose acetate. **Industrial Crops & Products**. São Paulo – SP, v. 109, p. 452-458, dez. 2017.

FRIEND, Debora Ferreira Laurito. **Desenvolvimento de membranas antimicrobianas a partir da extração e purificação da celulose da casca da batata**. 2019. 112 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Materiais) – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá – MG, 2019.

FU, Caili *et al.* Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage. **Food Science and Technology**. Campinas – São Paulo, v. 34, n. 1, p. 123-126, jan. – mar. 2014.

FU, Naifang *et al.* Anti-foot-and-mouth disease virus effects of Chinese herbal kombucha *in vivo*. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo – SP, v. 46, n. 4, p. 1245-1255, out.-dez. 2015.

FULLER, M. E.; ANDAYA, C.; MCCLAY K. Evaluation of ATR-FTIR for analysis of bacterial cellulose impurities. **Journal of Microbiological Methods**. Estados Unidos da América, v. 144, p. 145-151, jan. 2018.

GRANDE, Cristian J. *et al.* Development of self-assembled bacterial cellulose–starch nanocomposites. **Materials Science & Engineering C**. Lima – Peru, v. 29, n. 4, p. 1098-1104, mai. 2009.

GRANDE, Cristian J. *et al.* Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**. Peru, v. 5, n. 5, p. 1605-1615, jun. 2009.

GREENWALT, C. J.; STEINKRAUS, K. H.; LEDFORD, R. A. Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. **Journal of Food Protection**. Chicago – EUA, v. 63, n. 7, p. 976-981, fev. 2000.

GRUBE, M. *et al.* Fourier-transform infrared spectroscopic analyses of cellulose from different bacterial cultivations using microspectroscopy and a high-throughput screening device. **Vibrational Spectroscopy**. Letônia, v. 84, p. 53-57, mai. 2016.

HOHMANN, F.; KUNZ, M. D.; VANDRESEN, D. F. Análise da atividade antibacteriana da

Kombucha em chá preto e verde. **Revista de Iniciação Científica e Extensão (REICEN)**. Paraná – Brasil, v. 3, n. 2, p. 505-511, out. 2020.

JARAMILLO, Rubén D. *et al.* Efecto de la melaza de caña tratada con ácido sulfúrico en la producción de celulosa por *Gluconacetobacter xylinus* IFO 13693. **Revista Colombiana de Química**. Colombia, v. 43, n. 2, p. 25-31, jul. 2014.

JARRELL, J.; CAL, T.; BENNETT, J. W. The Kombucha consortia of yeasts and bacteria. **Journal Mycologist**. Nova Orleans – EUA, v. 14, n. 4, p. 166 – 170, nov. 2000.

JEREMIC, Sanja *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**. Sérvia, v. 129, p. 352-360, mai. 2019.

KUKHARENKO, Olha *et al.* Promising low cost antimicrobial composite material based on bacterial cellulose and polyhexamethylene guanidine hydrochloride. **European Polymer Journal**. Ucrania, v. 60, p. 247-254, nov. 2014.

LADEVANYA, D.; SHIRKOLE, S.; BALASUBRAMANIAN, P. Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. **Journal of Cleaner Production**. India, v. 295, p. 1-20, mai. 2021.

LEONARSKI, Eduardo *et al.* Production of kombucha-like beverage and bacterial cellulose by acerola by product as raw material. **LWT – Food Science and Technology**. Brasil, v. 135, p. 1-8, jan. 2021.

LIMA, Helder Levi Silva. **Avaliação do potencial do líquido de sisal e do suco de caju para a produção de celulose bacteriana**. 2014. 88 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza – CE, 2014.

LIMA, Helder Levi Silva *et al.* Bacterial cellulose nanofiber-based films incorporating gelatin hydrolysate from tilapia skin: production, characterization and cytotoxicity assessment. **Cellulose**. Brasil, v. 25, p. 6011-6029, ago. 2018.

LIMA, H. L. S. *et al.* Bacterial cellulose production by *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 using sisal juice - an agroindustry waste. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. Ceará – Brasil, v. 34, n. 3, p. 671-680, jul. – set. 2017.

LIMA, Lais R. *et al.* Nanocrystals of cellulose from bacterial cellulose. **Química Nova**. Uberlândia – MG, v. 38, n. 9, p. 1140-1147, ago. 2015.

LIU, K.; CATCHMARK J. M. Enhanced mechanical properties of bacterial cellulose nanocomposites produced by co-culturing *Gluconacetobacter hansenii* and *Escherichia coli* under static conditions. **Carbohydrate Polymers**. PA – EUA, v. 219, p. 12-20, set. 2019.

LORENZO-SANTIAGO, M. A.; RENDÓN-VILLALOBOS, R. Isolation and characterization of micro cellulose obtained from waste mango. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. São Paulo – SP, v. 30, n. 3, p. 1-8, nov. 2020.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. Noções Básicas de Polímeros. In: \_\_\_\_\_. **Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. Rio de Janeiro: e-papers, 2001. Cap. 1, p. 13-33.

MACHADO, Rachel T. A. *et al.* *Komagataeibacter rhaeticus* as an alternative bacteria for cellulose production. **Carbohydrate Polymers**. São Paulo – SP, v. 152, p. 841-849, nov. 2016.

MACHADO, Raquel T. A. *et al.* *Komagataeibacter rhaeticus* grown in sugarcane molasses-supplemented culture medium as a strategy for enhancing bacterial cellulose production. **Industrial Crops & Products**. Brasil, v. 122, p. 647-646, out. 2018.

MAIA, Allan Lemos *et al.* Bacterial cellulose biopolymer film and gel dressing for the treatment of ischemic wounds after lower limb revascularization. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. Recife – PE, v. 46, n. 5, p. 1-11, ago. 2019.

MAYHUIRE, Evilin Alata *et al.* Biopelículas producidas con cáscara de naranja y reforzadas con celulosa bacteriana. **Revista de la Sociedad Química del Peru**. Peru, v. 85, n. 2, p. 231-241, mai. 2019.

MELO, Rafaela Nery *et al.* Avaliação de culturas microbianas para a elaboração de kombucha. **Research, Society and Development**. São Paulo, v. 10, n. 16, p. 1-11, dez. 2021.

MOUSAVI, S. M. *et al.* Pb(II) removal from synthetic wastewater using *Kombucha Scoby* and graphene Oxide/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. **Physical Chemistry Research**. Irã, v. 6, n. 4, p. 759-771, dez. 2018.

NASCIMENTO, Eligenes Sampaio *et al.* TEMPO oxidation and high-speed blending as a combined approach to disassemble bacterial cellulose. **Cellulose**. Ceará – Brasil, v. 26, n. 2, p. 2291-2302, jan. 2019.

NASCIMENTO, Elisa Strobel *et al.* *Design* e materiais vivos: perspectivas e aplicações de celulose bacteriana no *design* industrial, arquitetura e moda. In: Encontro de Sustentabilidade em Projeto (ENSUS), 9, p. 175-186, 2021, Florianópolis – SC. **Anais...** 2021.

OLIVEIRA, Jamerson Carneiro. **Síntese e caracterização de nanocompósitos poliméricos reforçados com whiskers de celulose da fibra de licuri**. 2015. 116 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador – BA, 2015.

OLIVEIRA, M.; CARMINATTI, C. A. **Produção de Celulose Bacteriana em Cultura Estática Utilizando Diferentes Fontes de Carbono**. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/171571>> Acesso em: 15 jul. 2020.

ONER, J.; SENGOZ, B. Effect of polymers on rheological properties of waxy bitumens. **Revista de la Construcción**. Santiago – Chile, v. 17, n. 2, p. 279 – 295. 2018.

PALUDO, Natália. **Desenvolvimento e caracterização de kombucha obtida a partir de chá verde e extrato de erva-doce**: processo artesanal e escala laboratorial. 2017. 47 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

PEREIRA, Paulo H. F. *et al.* Preparação e caracterização de materiais híbridos celulose/NbOPO<sub>4</sub>.nH<sub>2</sub>O a partir de celulose branqueada de bagaço de cana-de-açúcar. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. São Paulo – SP, v. 22, n.1, p. 88-95, 2012.

PEROTTI, Gustavo F. *et al.* Bacterial cellulose as a template for preparation of hydrotalcite-like compounds. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. São Paulo – Brasil, v. 25, n. 9, p. 1647-1655, set. 2014.

PESSOA JÚNIOR, W. A. G.; TAKENO M. L.; MANZATO L. Kombucha: síntese e caracterização de celulose bacteriana. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 57, 2017, Gramado – RS. **Anais...** 2017. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2017/trabalhos/12/11270-17171.html>>. Acesso em: 28 de novembro de 2020.

PILLAI, Mamatha M. *et al.* Symbiotic culture of nanocellulose pellicle: A potential matrix for 3D bioprinting. **Materials Science & Engineering C**. India, v.119, p. 1-8, fev. 2021.

PINHO, Ana Mariana de Moraes Rebello *et al.* Traumatic perforations of the tympanic membrane: immediate clinical recovery with the use of bacterial cellulose film. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**. São Paulo – SP, v. 86, n. 6, p. 1-7, nov. – dez. 2020.

ROCHA, César Augusto *et al.* Polímero de entretenimento: uma macromolécula biodegradável. **Revista Científica do Unisalesiano**. Lins – São Paulo, v. 4, n. 9, p. 266-275, jul./dez. 2013.

RODRIGUES, R. da S. *et al.* Características físicas e químicas de kombucha à base de chá de hibisco (*Hibiscus sabdariffa*, L.). In: SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR, 6, 2018, Gramado – RS. **Anais...** 2018. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/85215182-Caracteristicas-fisicas-e-quimicas-de-kombucha-a-base-de-cha-de-hibisco-hibiscus-sabdariffa-l.html>>.

RÖMLING, U.; GALPERIN, M. Y. Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. **Trends in Microbiology**. Estocolmo – Suécia, v. 23, n. 9, p. 545-557, set. 2015.

RUIZ, Naiara Torres. **Derivatização de celulose sob condições homogêneas de reação**. 2004. 121 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SÁ, Nádia Maria dos Santos Matos. **Utilização da fibra poda do cajueiro como fonte de lignina e nanocristais de celulose para incorporação em filmes de celulose bacteriana**. 2020. 117 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza – CE, 2020.

SANTOS, Mafalda Jorge dos. **Kombucha: caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração**. 2016. 119 p. Dissertação (Mestrado

em Ciências Gastronômicas) – Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa – Portugal, 2016.

SCREERAMULU, G; ZHU, Y.; KNOL, W. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington – EUA, v. 48, n. 6, p. 2589-2594, mai. 2000.

SEDERAVIČIŪTĖ, F.; BEKAMPIENĖ P.; DOMSKIENĖ, J. Effect of pretreatment procedure on properties of Kombucha fermented bacterial cellulose membrane. **Polymer Testing**. Lituânia, v. 78, p. 1-7, set. 2019.

SEGAL, L. *et al.* An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. **Textile Research Journal**. Estados Unidos da América, v. 29, p. 786-794, out. 1959.

SENNA, André M. *et al.* Obtenção de Celulose e Produção de Papel Branqueado a partir do Capim Brachiaria (*Brachiaria decumbens*). **Química Nova na Escola**. São Paulo – SP, v. 30, n. 2, p. 116-120, mai. 2018.

SENNA, André M. *et al.* Synthesis, characterization and application of hydrogel derived from cellulose acetate as a substrate for slow-release NPK fertilizer and water retention in soil. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. Minas Gerais – Brasil, v. 3, n. 2, p. 996-1002, jun. 2015.

SEPÚLVEDA, Rodrigo V. *et al.* Bacterial cellulose and bacterial cellulose/polycaprolactone composite as tissue substitutes in rabbits' córnea. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Viçosa – MG, v. 36, n. 10, p. 986-992, out. 2016.

SHARMA, C.; BHARDWAJ, N. K. Bacterial nanocellulose: Present status, biomedical applications and future perspectives. **Materials Science & Engineering C**. India, v. 109, p. 1-18, nov. 2019.

SILVEIRA, Fábio Coelho Alves *et al.* Treatment of tympanic membrane perforation using bacterial cellulose: a randomized controlled trial. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**. Recife – PE, v. 82, n. 2, p. 203-208, mar. – abr. 2016.

SOARES, M. G.; LIMA, M.; SCHMIDT, V. C. R. Technological aspects of kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY), and extraction of compounds of interest: A literature review. **Trends in Food Science & Technology**. Minas Gerais – Brasil, v. 110, p. 539-550, abr. 2021.

SUEIRO, Ana Claudia *et al.* Filmes biodegradáveis de amido de mandioca, pululana e celulose bacteriana. **Química Nova**. Londrina – PR, v. 39, n. 9, p. 1054-1060, jul. 2016.

TAPIAS, Yuly A. Ramírez *et al.* Bacterial cellulose films production by Kombucha symbiotic community cultured on different herbal infusions. **Food Chemistry**. Argentina, v. 372, p. 1-11, mar. 2022.

TEOH, A. L.; HEARD, G.; COX, J. Yeast ecology of Kombucha fermentation. **International**

**Journal of Food Microbiology.** Austrália, v. 95, n. 2, p. 119-126, set. 2004.

TROVATTI, Eliane *et al.* *Gluconacetobacter sacchari*: An efficient bacterial cellulose cell-factory. **Carbohydrate Polymers.** Portugal, v. 86, n. 3, p. 1417-1420, ago. 2011.

VASQUES, Caroline Teixeira. **Preparação e caracterização de filmes poliméricos a base de amido de milho e polipirrol para aplicação como biomaterial.** 2007. 140 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis – SC, 2007.

VASQUES, Caroline T. *et al.* Polypyrrole-modified starch films: structural, thermal, morphological and electrical characterization. **e-Polymers,** Polônia, v. 10, n. 1, p. 1-17, Ago. 2010.

VÁZQUEZ-CABRAL, Blanca D. *et al.* Mexican oaks as a potential non-timber resource for Kombucha beverages. **Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente.** México, v. 22, n. 1, p. 73-86, dez. 2015.

VIEIRA, Denise Cristina Moretti *et al.* Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and *Saccharomyces cerevisiae* in green tea leaves and fruits juice médium. **Asian Journal of Pharmaceutical and Health Sciences.** São Paulo – Brasil, v. 3, n. 2, p. 690-690, abr. – jun. 2013.

VIEIRA, Denise Cristina Moretti *et al.* Biofilm (biocellulose membrane) production by *Glucoacetobacter xylinum* from waste residues of fruits and tea leaves. In: International Biodeterioration & Biodegradation Symposium, 15, 2011, Vienna – Áustria. **Anais...** 2011. Disponível em: <[https://www.academia.edu/20521643/IBBS\\_15\\_Abstract\\_book\\_15th\\_International\\_Biodeterioration\\_and\\_Biodegradation\\_Symposium](https://www.academia.edu/20521643/IBBS_15_Abstract_book_15th_International_Biodeterioration_and_Biodegradation_Symposium)>.

VIEIRA, Denise Cristina Moretti. **Produção de biofilme (membrana de biocelulose) por *Gluconacetobacter xylinus* em meio de resíduos de frutas e folhas de chá verde.** 2013. 177 p. Tese (Doutorado em Bioquímica e Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

VILLARREAL-SOTO, Silvia Alejandra *et al.* Understanding Kombucha tea fermentation: A review. **Journal of Food Science.** Chicago – EUA, v. 83, n. 3, p. 580-588, mar. 2018.

YANG, Ying *et al.* Isolation and characteristics analysis of a novel high bacterial cellulose producing strain *Gluconacetobacter intermedius* Cls26. **Carbohydrate Polymers.** China, v. 92, n. 2, p. 2012-2017, fev. 2013.

YIM, S. M.; SONG, J. E.; KIM, H. R. Production and characterization of bacterial cellulose fabrics by nitrogen sources of tea and carbon sources of sugar. **Process Biochemistry.** Coreia do sul, v. 59 (part. A), p. 26-36, ago. 2017.

YOUNESI, M.; AKKUS, A.; AKKUS, O. Microbially-derived nanofibrous cellulose polymer for connective tissue regeneration. **Materials Science & Engineering C.** Ohio – EUA, v. 99, p. 96-102, jun. 2019.

ZAETS, I. *et al.* Bacterial cellulose may provide the microbial-life biosignature in the rock records. **Advances in Space Research**. Ucrânia, v. 53, n. 5, p. 828-835, mar. 2014.