

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS
MESTRADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA POR CONSÓRCIO
MICROBIANO A PARTIR DE DIFERENTES CHÁS E CONCENTRAÇÕES DE
AÇÚCAR**

LUDIMILA GONZAGA SALES

JOINVILLE - SC

2023

LUDIMILA GONZAGA SALES

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA POR CONSÓRCIO
MICROBIANO A PARTIR DE DIFERENTES CHÁS E CONCENTRAÇÕES DE
AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE – como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Engenharia de Processos;

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Paula Testa Pezzin

JOINVILLE - SC

2023

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

S163e Sales, Ludimila Gonzaga
Estudo da produção de celulose bacteriana por consórcio microbiano a partir de diferentes chás e concentrações de açúcar / Ludimila Gonzaga Sales; orientadora Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider; coorientadora: Dra. Ana Paula Testa Pezzin. – Joinville: UNIVILLE, 2023.

57 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos – Universidade da Região de Joinville)

1. Celulose - Química. 2. Bactéria - Metabolismo. 3. Chá de kombucha. 4. Chá verde. 5. Chá. I. Schneider, Andréa Lima dos Santos (orient.). II. Pezzin, Ana Paula Testa. III. Título.

CDD 661.8

Termo de Aprovação

“Estudo da Produção de Celulose Bacteriana por Consórcio Microbiano, a partir de Diferentes Chás e Concentrações de Açúcar”

por

Ludimila Gonzaga Sales

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Orientadora (UNIVILLE)

Profa. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Coorientadora (UNIVILLE)

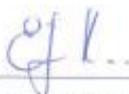
Profa. Dra. Janaina Lisi Leite Howarth
(NANOBIOCELL)

Profa. Dra. Michele Cristina Formolo Garcia
(UNIVILLE)

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestra em Engenharia de Processos, área de concentração Desenvolvimento e Gestão de Processos e Produtos e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos.



Profa. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Orientadora (UNIVILLE)



Profa. Dra. Elisabeth Wisbeck
Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos

Joinville, 06 de abril de 2023.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcuta

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois d'Ele procede toda fonte de conhecimento, Ele me dá forças para prosseguir, a coragem de não desistir e acima de tudo: por Ele acreditar em mim. Por sempre fazer o melhor, com as melhores pessoas, em minha jornada. Não tenho dúvidas que o Senhor está no controle de tudo. Toda honra e glória é tua!

Agradeço imensamente a minha mãe, Patrícia da Trindade Gonzaga Sales, que é meu maior exemplo de mulher forte e corajosa. Obrigada por todo apoio e por ser quem você é. Ao meu pai, Rubens Monteiro Sales, pela sua preocupação, incentivo e apoio em sempre querer o meu melhor. Em presenciar todas minhas conquistas, que também são suas. Obrigada por querer sempre ver meu desenvolvimento. À minha irmã, Camila Trindade Gonzaga Sales, por todos os conselhos, por ser minha amiga e parceira em tudo. Por estar sempre na torcida e vibrando por mim. À minha vó Perpetua que é minha segunda mãe, me alegro em saber que tenho você e que posso contar sempre. Vocês são tudo para mim!

À minha orientadora, Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider, pela orientação, conhecimento, paciência, por não ter desistido de mim e por ter me acolhido em meio a correria. À minha coorientadora, Dra Ana Paula Testa Pezzin, pela colaboração, conhecimentos repassados e pela paciência.

Aos parceiros dos laboratórios da Univille, em especial a Paula Roberta Perondi Furtado, Victória Fonseca Silveira e Aline Coan que diretamente e indiretamente me auxiliaram no processo e desenvolvimento da pesquisa. Em especial a Victória por toda atenção, paciência e disponibilidade. Você foi fundamental no desenvolvimento.

Agradeço a todos meus familiares e amigos que diretamente e indiretamente estiveram envolvidos nesse processo e me incentivaram.

A UNIVILLE e ao PIBPG pela oportunidade de crescimento e desenvolvimento.

RESUMO

Estudo da produção de celulose bacteriana por consórcio microbiano a partir de diferentes chás e concentrações de açúcar.

A kombucha geralmente é produzida a partir do chá verde/preto adoçado, ao qual é adicionada um consórcio simbiótico de bactérias acéticas e leveduras (SCOBY). Essa bebida tem sido cada vez mais consumida por aqueles que buscam uma dieta equilibrada. O mercado de kombucha apresentou crescimento nos últimos tempos, devido ao baixo investimento para iniciar o ramo e pela disseminação dos benefícios dessa bebida para a comunidade. O SCOBY é responsável por transformar o açúcar e componentes do chá em etanol, dióxido de carbono, ácidos orgânicos e celulose bacteriana (CB). A CB é um biopolímero promissor para fins industriais, pois a forma de obtenção dessa a torna livre de impurezas como lignina e pectina, além de diminuir o custo final do produto e redução dos impactos ambientais causados por sua produção. Porém, o custo para produção convencional de CB é oneroso e com baixo rendimento. Tendo em vista o benefício econômico na produção de CB a partir da kombucha, além do benefício ambiental o objetivo desse trabalho foi caracterizar a celulose bacteriana, formada a partir do chá preto e chá verde e com diferentes concentrações de açúcar. Comparando a utilização de chá preto e chá verde (com concentrações de 6,0 g/L de chá e 50,0 g/L de açúcar) concluiu-se que a CB a partir do chá preto apresentou maior massa final e maior estabilidade térmica, pelos resultados da análise termogravimétrica. Por meio dos cálculos do percentual de água, capacidade de retenção de água e percentual de redução foi possível concluir que a CB é altamente hidrofílica. Com o ensaio de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, foi comparado os grupos funcionais presentes na CB da kombucha com os grupos funcionais da CB de cepa pura. Após a escolha do chá foi feita a variação da concentração de açúcar (25,0; 37,5 e 50,0 g/L) e observou-se que as CBs finais tiveram pouca diferença entre os valores de massa, além de apresentarem curvas de crescimento semelhantes. Através da análise de DNS obteve-se as curvas de consumo de sacarose e pelo cálculo do percentual de consumo de açúcar foi possível concluir que nos 6 primeiros dias o meio com concentração de 37,5 g/L apresentou maior consumo. Através da análise bacteriológica realizada certificou-se a presença das espécies *Komagataeibacter intermedius*, *Komagataeibacter rhaeticus* e *Gluconobacter kanchanaburiensis* na CB formada a partir do chá preto.

Palavras-chave: Celulose bacteriana, kombucha, concentração de açúcar, chá preto, chá verde.

ABSTRACT

Study of bacterial cellulose production by microbial consortium from different teas and sugar concentrations.

Kombucha is usually produced from sweetened green/black tea, to which is added a symbiotic consortium of acetic acid bacteria and yeast (SCOBY). This beverage has been increasingly consumed by those seeking a balanced diet. The kombucha market has shown growth in recent times, due to the low investment to start the business and the dissemination of the benefits of this beverage to the community. SCOBY is responsible for transforming the sugar and tea components into ethanol, carbon dioxide, organic acids, and bacterial cellulose (CB). CB is a promising biopolymer for industrial purposes, because the way to obtain it makes it free of impurities such as lignin and pectin, besides reducing the final cost of the product and reducing the environmental impacts caused by its production. However, the cost of conventional CB production is expensive and has a low yield. In view of the economic benefit in the production of CB from kombucha, besides the environmental benefit, the objective of this work was to characterize the bacterial cellulose, formed from black tea and green tea and with different concentrations of sugar. Comparing the use of black tea and green tea (with concentrations of 6.0 g/L of tea and 50.0 g/L of sugar) it was concluded that the CB from black tea showed greater final mass and greater thermal stability, by the results of thermogravimetric analysis. By calculating the percentage of water, water holding capacity and percentage of reduction it was possible to conclude that the CB is highly hydrophilic. With the Fourier transform infrared spectroscopy test, the functional groups present in the kombucha CB were compared with the functional groups of the pure strain CB. After choosing the tea, the sugar concentration was varied (25.0; 37.5 and 50.0 g/L) and it was observed that the final CBs had little difference between the mass values, besides presenting similar growth curves. Through the DNS analysis the sucrose consumption curves were obtained and by calculating the percentage of sugar consumption it was possible to conclude that in the first 6 days the medium with the 37.5 g/L concentration presented the highest consumption. Through the bacteriological analysis performed, the presence of the species *Komagataeibacter intermedius*, *Komagataeibacter rhaeticus* and *Gluconobacter kanchanaburiensis* was certified in the CB formed from black tea.

Keywords: Bacterial cellulose, kombucha, sugar concentration, black tea, green tea.

RESUMEN

Estudio de la producción de celulosa bacteriana por consorcio microbiano a partir de diferentes té y concentraciones de azúcar.

La kombucha se produce generalmente a partir de té verde/negro azucarado, al que se añade un consorcio simbiótico de bacterias acéticas y levaduras (SCOBY). Esta bebida es cada vez más consumida por quienes buscan una dieta equilibrada. El mercado de la kombucha ha mostrado un crecimiento en los últimos tiempos, debido a la baja inversión para iniciar el negocio y a la difusión de los beneficios de esta bebida entre la comunidad. La SCOBY se encarga de transformar el azúcar y los componentes del té en etanol, dióxido de carbono, ácidos orgánicos y celulosa bacteriana (CB). La CB es un biopolímero prometedor para fines industriales, ya que la forma de obtenerla la hace libre de impurezas como la lignina y la pectina, además de reducir el coste final del producto y disminuir los impactos ambientales causados por su producción. Sin embargo, el coste de la producción convencional de CB es caro y con bajo rendimiento. En vista del beneficio económico en la producción de CB a partir de kombucha, además del beneficio ambiental el objetivo de este trabajo fue caracterizar la celulosa bacteriana, formada a partir de té negro y té verde y con diferentes concentraciones de azúcar. Comparando el uso de té negro y té verde (con concentraciones de 6,0 g/L de té y 50,0 g/L de azúcar) se concluyó que el CB a partir de té negro presentó mayor masa final y mayor estabilidad térmica, por los resultados del análisis termogravimétrico. Calculando el porcentaje de agua, la capacidad de retención de agua y el porcentaje de reducción se pudo concluir que el CB es altamente hidrofílico. Con la prueba de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, se compararon los grupos funcionales presentes en el CB de kombucha con los grupos funcionales del CB de cepa pura. Después de la elección del té se hizo la variación de la concentración de azúcar (25,0; 37,5 y 50,0 g/L) y se observó que los CBs finales tenían poca diferencia entre los valores de masa, además de presentar curvas de crecimiento similares. A través del análisis DNS se obtuvieron las curvas de consumo de sacarosa y calculando el porcentaje de consumo de azúcar se pudo concluir que en los primeros 6 días el medio con concentración de 37,5 g/L presentó mayor consumo. A través del análisis bacteriológico realizado, se certificó la presencia de las especies *Komagataeibacter intermedius*, *Komagataeibacter rhaeticus* y *Gluconobacter kanchanaburiensis* en el CB formado a partir de té negro.

Palabras clave: Celulosa bacteriana, kombucha, concentración de azúcar, té negro, té verde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formação do SCOBY filho a partir de um SCOBY mãe durante a fermentação da kombucha	18
Figura 2 - Estrutura química da celulose bacteriana.....	24
Figura 3 - Aplicações da celulose bacteriana produzida a partir da kombucha	27
Figura 4 - Fluxograma de produção da kombucha	28
Figura 5 - Fluxograma dos processos de análise das celuloses sintetizadas.....	29
Figura 6 - Celuloses bacterianas do chá verde e chá preto após a secagem.....	35
Figura 7 - Gráfico de intervalos da massa das membranas a partir do chá verde e chá preto.....	36
Figura 8 - Espectros de FTIR obtidos para as membranas de CB	37
Figura 9 - Curvas de análise termogravimétrica (TG), obtidas por TGA, para as diferentes amostras de CB	40
Figura 10 - Crescimento da CB em função do tempo	42
Figura 11 - Intervalos da massa das membranas de diferentes concentrações	43
Figura 12 - Diferença das médias para massa de membrana formada de cada concentração de açúcar.....	44
Figura 13 - Curva padrão para análise de absorvância.....	45
Figura 14 - Consumo do açúcar do meio em relação ao tempo	46
Figura 15 - Espectros de FTIR obtidos para as membranas de acordo com cada concentração	49
Figura 16 - Curvas de análise termogravimétrica (TG), obtidas por TGA, para as diferentes amostras de CB	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa úmida, capacidade de retenção de água (CRA) e percentual de água (PA) das membranas obtidas a partir do chá verde e chá preto.....	34
Tabela 2 - Massa seca e PR das membranas obtidas a partir do chá verde e chá preto	35
Tabela 3 - Atribuições dos grupos funcionais presentes nas amostras	38
Tabela 4 - Eventos térmicos das amostras obtidos a partir das curvas TG/DTG	40
Tabela 5 - Velocidade média de formação da CB	42
Tabela 6 - Concentração de açúcar ao longo do tempo	45
Tabela 7 - Percentual de consumo de sacarose parcial	46
Tabela 8 - Percentual de consumo de sacarose em 9 dias	47
Tabela 9 - Atribuições dos grupos funcionais presentes nas amostras de CB	49
Tabela 10 - Eventos térmicos das amostras obtidos a partir das curvas TG/DTG	51

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
2. Objetivos.....	16
2.1. Objetivos Gerais	16
2.2. Objetivos Específicos	16
3. Revisão da Literatura	17
3.1. Kombucha.....	17
3.1.1. Benefícios da Kombucha	19
3.1.2. Ingredientes empregados na produção da kombucha e as contribuições no processo fermentativo.....	19
3.1.3. Microrganismos presentes.....	20
3.1.4. Composição química	21
3.2. Celulose.....	22
3.2.1. Celulose bacteriana	23
3.2.1.1 Degradação do polímero	25
3.2.2 Processos metabólicos envolvidos na produção da celulose bacteriana	25
3.2.3. Aplicações da celulose bacteriana.....	26
4. Metodologia	28
4.1. Síntese da membrana de CB a partir do chá verde e chá preto	28
4.1.1. Purificação das membranas	29
4.1.2. Pesagem da massa úmida	30
4.1.3. Secagem das membranas	30
4.2. Caracterização físico-química das membranas	30
4.2.1. Capacidade de retenção de água (CRA).....	30
4.2.2. Percentual de água (PA)	30
4.2.3. Percentual de redução (PR)	30
4.2.4. Velocidade média de formação (V_m).....	31
4.2.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	31
4.2.6. Análise termogravimétrica (TGA).....	31
4.3. Síntese da membrana a partir do chá escolhido.....	31
4.3.2. Composição bacteriológica.....	32
4.3.3. Consumo de concentração de açúcar do meio	32
4.3.3.1. Percentual de consumo de sacarose (PCS):.....	33

5. Resultados e Discussão	34
5.1. Etapa 1 – Avaliação da síntese de CB a partir do chá verde e chá preto	34
5.1.1. Pesagem úmida, CRA PA e PR.....	34
5.1.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	37
5.1.3. Análise termogravimétrica (TGA).....	39
5.2. Etapa 2 – Avaliação da concentração de açúcar na obtenção de celulose bacteriana a partir do chá preto	41
5.2.1. Pesagem das CBs durante a produção	41
5.2.2. Consumo do açúcar do meio	44
5.2.3. Análise bacteriológica	47
5.2.4. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	48
5.2.5. Análise termogravimétrica (TGA).....	50
6. Conclusão	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXO A – TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE TESES E DISSERTAÇÕES.....	59

1. Introdução

Refeições a base de alimentos probióticos, prebióticos e simbióticos tem incentivado diversas pesquisas, seja para combater doenças, aumentar imunidade, regular a saúde intestinal e aumentar a expectativa de vida dos seres humanos (FERREIRA, 2022). Esses alimentos favorecem a microbiota intestinal, tornando-os de extrema importância para a saúde humana (BIELECKA *et al.*, 2002). Com o equilíbrio da microbiota a imunidade é favorecida e conseqüentemente há o aumento da qualidade de vida do indivíduo que consome alimentos à base de probióticos, prebióticos e simbióticos. Diante disso a pesquisa da bebida fermentada a base de chá adoçado, a kombucha, vem apresentando crescimento nos últimos tempos. Esse líquido possui a presença de ácidos orgânicos e propriedades probióticas que auxiliam na regulação intestinal, tornando-o um alimento de interesse humano e de estudos (FERREIRA, 2022).

Geralmente produzida a partir do chá verde ou preto adoçado, ao qual é adicionada a chamada “mãe do kombucha” (uma película de celulose bacteriana contendo um consórcio simbiótico de bactérias acéticas e leveduras), a kombucha é uma bebida obtida a partir do processo de fermentação e que possui características refrescante, agri-doce e levemente carbonatada (LEONARSKI, 2021). Essa tradicional bebida fermentada tem sido cada vez mais consumida por aqueles que buscam uma dieta equilibrada e os benefícios proporcionados pelo seu consumo, como: curar vários tipos de doenças comuns (artrite, câncer, dores de cabeça e problemas digestivos) (KALIFAWI *et al.*, 2014), além reduzir o nível de colesterol, prevenir problemas circulatórios e digestivos, retardar o envelhecimento, melhorar o metabolismo e a visão, diminuir a incidência de inflamações, entre outros (JAYABALAN *et al.*, 2014).

De acordo com a *Kombucha Brewers International (KBI)* o mercado de kombucha apresentou um crescimento significativo que tende a se manter devido ao baixo investimento para iniciar o ramo e pela disseminação dos benefícios dessa bebida para a comunidade.

O chá adoçado sofre ação de um filme constituído por celulose, o SCOBY (simbiotic culture of bacteria and yeast), durante e ao final do processo fermentativo têm-se duas partes distintas: a película celulósica e um caldo em forma líquida (BLAUTH, 2019). O SCOBY é responsável por realizar várias reações bioquímicas durante o processo de fermentação, destacando entre elas a transformação do açúcar e componentes do chá em: etanol, dióxido de carbono, ácidos orgânicos (acético, láctico,

glucorónico e cítrico) e celulose bacteriana (CB) (EMILIJANOWICZ & MALINOWSKA-PANCZYK, 2020).

A CB é um produto da fabricação da kombucha pouco explorado, apesar da grande quantidade que pode ser produzida. Em geral, a CB da kombucha é composta por fibrilas de celulose pura e possui boa capacidade de retenção de água, alta cristalinidade e termoestabilidade, similar às características da CB produzida em meio sintético (DIMA *et al.*, 2017; EMILIJANOWICZ *et al.*, 2020). Esse biomaterial é comumente utilizado na engenharia de tecidos, alvo de diversas pesquisas quanto a aplicação e utilização nas áreas da saúde, tratamento de efluentes, eletrônica e cosmetologia (KESH, 2014), além de possuir estrutura nanométrica, alta absorção de água, biocompatibilidade, melhor resistência mecânica e alta pureza (PHISALAPHONG *et al.*, 2008). Todas essas propriedades tornam a CB um material com potencial para várias aplicações (PUTRA *et al.*, 2008). Porém, o custo para produção convencional de CB é alto, com baixos rendimentos, tornando oneroso o processo de obtenção desse biopolímero (COSTA *et al.*, 2017).

A celulose vegetal, que é comumente utilizada nas indústrias, possui impurezas e apresenta alta quantidade de lignina ou hemicelulose e em seu processo de purificação podem ser gerados grandes quantidades de resíduos, além da possibilidade de contaminação do solo (DOMENEGHETTI *et al.*, 2019). Portanto, surge então a possibilidade de substituição da celulose vegetal pela celulose bacteriana.

Tendo em vista o benefício econômico na produção de CB a partir da kombucha, além do benefício ambiental o objetivo desse trabalho foi comparar as CBs, formadas através do processo fermentativo do chá, a partir de fontes diferentes de nitrogênio e a partir de diferentes concentrações de açúcar.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Sintetizar e caracterizar a celulose bacteriana, formada a partir da fermentação da kombucha e analisar a interferência da fonte de nitrogênio e concentração de açúcar, no substrato, para formação da CB.

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Avaliar o chá preto e chá verde na produção da celulose bacteriana durante o período de 15 dias de cultivo;
- 2) Avaliar a concentração (25, 37,5 e 50 g/L) de açúcar na formação da celulose bacteriana, a partir do chá escolhido, nos períodos 3, 6 e 9 dias.
- 3) Caracterizar a membrana de celulose bacteriana nos dois processos - a partir dos diferentes chás e a partir de diferentes concentrações de açúcar - e comparar com a membrana de CB obtida pela cepa pura.

3. Revisão da Literatura

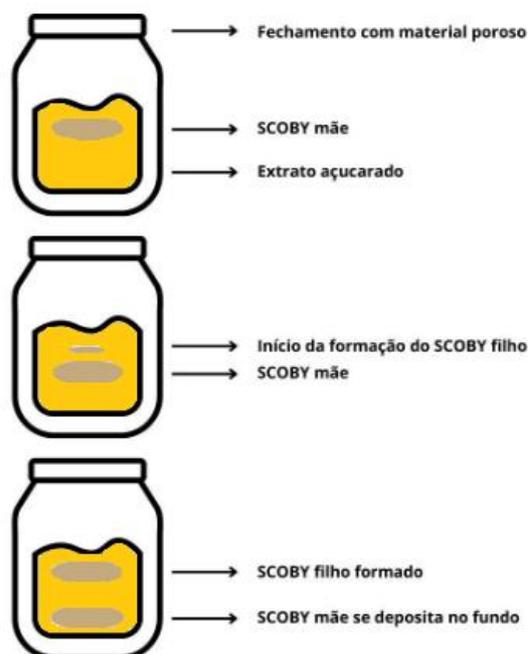
3.1. Kombucha

Uma bebida que está se tornando popular no mercado brasileiro e que está ganhando espaço no cardápio daqueles que buscam melhorar a alimentação, é o chá de kombucha (BRUSCHI *et al.*, 2018). Esse líquido consiste em uma associação simbiótica de bactérias e leveduras (SANTOS, 2016) e foi durante muito tempo conhecida como o chá da imortalidade (KAUFMANN, 2013).

Fermentada, refrescante, agridoce e levemente carbonatada, a kombucha é obtida partir do chá preto açucarado ao qual é adicionada uma película de celulose bacteriana contendo um consórcio simbiótico de bactérias acéticas e leveduras, também chamado de SCOBY. O chá verde também pode ser utilizado juntamente com o chá preto ou isoladamente. A Instrução Normativa n. 41 (IN 41) elaborada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) especifica os principais ingredientes para a produção de kombucha: água potável, extrato aquoso ou infusão de *Camellia sinensis*, açúcares, leveduras e cultura de bactérias próprias que promovem a fermentação alcóolica e acética (BLAUTH, 2019).

De forma resumida, prepara-se o substrato (chá e açúcar) com a concentração desejada e após o resfriamento do líquido adiciona-se o SCOBY a temperatura ambiente e dessa forma acontecerá a fermentação entre 7 e 10 dias (BRUSCHI *et al.*, 2018). Segundo Chen e Liu (2000), a contagem das leveduras e células bacterianas aumenta até 14 dias de fermentação tanto no SCOBY (mãe e filho) quanto no caldo. As características da kombucha variam muito e dependem de diversos fatores, entre eles o tempo de fermentação, o substrato utilizado e os microrganismos presentes no SCOBY (SANTOS, 2016).

Figura 1 – Formação do SCOBY filho a partir de um SCOBY mãe durante a fermentação da kombucha



A partir de diferentes concentrações de nitrogênio e sacarose pode-se obter a kombucha. A variação da concentração de sacarose e nitrogênio influencia no brilho do filme celulósico formado (BETLEJ *et al.*, 2021). Em diversas pesquisas são analisadas variadas concentrações, fontes de açúcar e fontes de nitrogênio na formação da CB (BLAUTH, 2019). Batista (2019), em seu estudo, variou não somente a fonte de nitrogênio (chá preto e chá verde) como também a fonte de carbono (açúcar e mel) para avaliar qual substrato favoreceu mais o rendimento da película celulósica formada durante a fermentação da kombucha. De acordo com seus resultados a utilização do chá preto com mel teve rendimento quase três vezes maior ao comparado com o chá preto com açúcar, chá verde com mel e chá verde com açúcar.

Goh *et al.* (2012), variou a concentração de açúcar (50 a 250 g/L) no substrato, utilizando chá preto, e concluiu que a concentração de 90 g/L de açúcar apresentou o maior rendimento de CB.

Kalifawi *et al.* (2014), avaliou o efeito de diferentes concentrações de chá e açúcar no rendimento da CB formada a partir de kombucha, e concluiu que o maior rendimento foi utilizando 10 g/L de chá e 100 g/L de açúcar.

De acordo com Kallel *et al.* (2012), uma boa produção dessa bebida pode ser obtida a partir de 100 g/L de sacarose e 12 g/L de chá, enquanto Pure *et al.* (2016) utilizou 20 g/L de açúcar e 10 g/L de chá.

De acordo com o Blauth (2019), a concentração de 50 g/L de sacarose produz as maiores quantidades de etanol e de ácido láctico.

3.1.1. Benefícios da Kombucha

Estudos comprovam que a kombucha possui propriedades antibacterianas, antioxidantes, antidiabéticas, capacidade de auxiliar o sistema imunológico, estimular a desintoxicação do fígado e reduzir a concentração de colesterol (VILLARREAL-SOTO, 2018; KAPP *et al.*, 2018), além de apresentar minerais originários do chá: como potássio, manganês, íons de flúor; vitaminas: C, E, K, B; aminoácidos e outros compostos que são formados (BHATTACHARYA *et al.*, 2016).

Há relatos que o consumo de kombucha cura algumas doenças como artrite, câncer, hepatotoxicidade, indigestão, entre outras (KALIFAWI *et al.*, 2013).

3.1.2. Ingredientes empregados na produção da kombucha e as contribuições no processo fermentativo

Para que ocorra o processo fermentativo e conseqüentemente a produção de kombucha, é necessário suprir as necessidades nutricionais dos microrganismos presentes no SCOBY. Apesar de serem diversificadas, eles utilizam nutrientes simples em suas vias metabólicas como água, oxigênio, carbono, nitrogênio e alguns elementos minerais. Os principais ingredientes utilizados na produção da kombucha são os chás e outras infusões e açúcares e outras fontes de carbono (BLAUTH, 2019).

O chá, ou outra infusão utilizada, proporciona muitos dos componentes requeridos pelos microrganismos para seu crescimento, como nitrogênio, carboidratos e vitaminas, além de contribuir para as características sensoriais do produto após a fermentação. De maneira geral, comumente o chá preto e o açúcar refinado são substratos utilizados para a preparação da kombucha (JAYABALAN *et al.*, 2016). E durante a produção as principais alterações químicas acontecem (BLAUTH, 2019). Atualmente, a preparação de kombucha não está mais limitada à utilização de chás, em especial o preto e o verde. Qualquer extrato de planta comestível misturado com a quantidade certa açúcar pode ser utilizado para o preparo da kombucha, levando em consideração que os constituintes não afetem ou inibam a produção do SCOBY (VITTAS *et al.*, 2013).

Os microrganismos envolvidos na produção de kombucha são os quimiorganotróficos (tem como fonte de energia o carbono orgânico). Portanto, a sacarose é a fonte de carbono mais utilizada para a fermentação da kombucha. A fonte de carbono é necessária para a biossíntese de diversos constituintes celulares dos microrganismos, como os carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos. De maneira geral, as macromoléculas das fontes de carbono são convertidas a unidades menores por enzimas despolimerizantes. Através de caminhos metabólicos dos microrganismos ocorre a transformação desses compostos em metabólitos capazes de ser catabolizados por vias centrais (BLAUTH, 2019).

As leveduras e bactérias presentes no SCOBY estão envolvidas nas atividades metabólicas que utilizam sacarose. As leveduras são responsáveis por hidrolisar a sacarose por meio da invertase em açúcares mais simples: frutose e glicose. Esses açúcares mais simples são transformados em etanol, via glicólise, e produzem gás carbônico. As bactérias acéticas utilizam a glicose para produzir ácido glucônico, glicose e frutose para produzir celulose e etanol para produzir ácido acético (JAYABALAN *et al.*, 2014; MAY *et al.*, 2019). As bactérias acéticas também utilizam o açúcar para produzir a película celulósica do SCOBY (JOSALA *et al.*, 2016).

3.1.3. Microrganismos presentes

A microbiota presente na kombucha pode ser fracionada em duas partes: a microbiota disponível no líquido e a acomodada no filme celulósico (SCOBY) (SANTOS, 2016). De acordo com o processo fermentativo a microbiota poderá ser diferente de acordo com a localização em que se encontra, porém é possível destacar as principais famílias, espécies e gêneros de leveduras e de bactérias que estão presentes em toda a kombucha (EL-SALAM, 2012).

Os procariotos mais abundantes no SCOBY são as bactérias do gênero *Acetobacter* e *Gluconobacter*. A bactéria *Acetobacter xylinium* (*A. xylinium*) é a principal responsável por criar a rede celulósica flutuante na superfície do líquido. Essa rede é um metabólito secundário da fermentação da kombucha e serve como estrutura-base física para o desenvolvimento simbiótico (BLAUTH, 2019). As principais bactérias identificadas tradicionalmente no SCOBY são *Acetobacter xylinoides*, *Komagataeibacter xylinus*,

Gluconacetobacter xylinus, *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurianus* (DUTTA *et al.*, 2019).

Além de bactérias acéticas existem muitas espécies de leveduras na kombucha. Uma grande variedade já foi encontrada, incluindo algumas espécies dos gêneros *Saccharomyces*, *Saccharomicodes*, *Schizosaccharomyces*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Torulospora*, *Koleckera*, *Pichia*, *Mycotorula* e *Mycoderma* (JAYABALAN *et al.*, 2014). De acordo com as análises feitas por Chakravorty *et al.* (2016) o gênero *Candida* foi a levedura dominante nas duas porções da kombucha (biofilme e líquido). Diferentemente dos resultados apresentados por Marsh *et al.* (2014), que apresentou dominância de *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*.

3.1.4. Composição química

A composição química da kombucha está diretamente relacionada aos ingredientes utilizados em sua fabricação e aos processos aplicados. A variedade de microrganismos presentes no SCOBY e seus diferentes metabólitos faz com que a bebida tenha composição complexa e extensa (BLAUTH, 2019).

Ao reunir os componentes predominantes na kombucha podemos destacar os ácidos glucônico e acético, ambos produzidos pelas bactérias acéticas, o primeiro a partir da glicose e o segundo a partir do etanol. Outros ácidos presentes em menor quantidade, produzidos por bactérias acéticas, são os glicorônico, cítrico, láctico, málico, tartárico, malônico, oxálico, succínio, pirúvico e úsnico (JAYABALAN *et al.*, 2014). A presença desses ácidos torna o produto fermentado uma bebida com pH baixo, geralmente próximo a 3 (COTON *et al.*, 2017).

Os componentes majoritários da kombucha de chá preto são: ácido acético, ácido glucônico, etanol, açúcar redutor, Teaflavinas, Tearubiginas, cafeína e o ácido D-sacárico-1,4-lactona (DSL) (BLAUTH, 2019). Outros componentes minoritários da kombucha são provenientes dos microrganismos presentes e da fermentação conduzida por eles, como o dióxido de carbono, enzimas (invertase e amilase), proteínas e o DSL. Vitaminas B2, B6 e C, caroteno, enzimas (polifenoloxidasas), purinas pigmentos polifenóis e minerais são provenientes do chá (CHAKRAVORTY *et al.*, 2019).

3.2. Celulose

A celulose ($C_6H_{10}O_5$) é o composto orgânico mais abundante e renovável da natureza, considerado um dos biopolímeros mais promissores (DUARTE *et al.*, 2019). Biodegradável, atóxica e não-alérgica, a celulose possui grandes aplicações na indústria de papel e celulose, indústria madeireira etc. Na natureza, ela pode ser encontrada em diferentes formas de vida como em plantas verdes, protozoários, fungos, bactérias e pode ser extraída de vegetais ou sintetizada por micro-organismos para a confecção de diversos produtos como papeis e fibras, emulsificante, agente dispersante, agente gelificante, entre outros (DONINI *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2009).

Entre janeiro e setembro de 2022 a produção brasileira de celulose alcançou 18,5 milhões de toneladas e em 2020 o país liderou o ranking mundial, ao exportar mais de 15 milhões de toneladas e o tornando um grande fornecedor desse insumo (EPE, 2020).

A estrutura da celulose é linear, constituída por repetidas unidades de β -D-glicopiranoses unidas, em cadeias longas, por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4). Esta unidade repetitiva, conhecida como celobiose, contém seis grupos hidroxila responsáveis por estabelecer pontes de hidrogênio intra e intermoleculares. Essas pontes fazem com que a celulose possua tendência de se aglomerar em cristais, tornando-a completamente insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos (MOHITE & PATIL, 2014; IBÁ, 2019).

A celulose é obtida, industrialmente, a partir do processamento da madeira para produção de polpa celulósica, sendo assim denominada celulose vegetal. Enquanto a celulose obtida por cultivo de micro-organismos (algas, fungos e bactérias) é designada de celulose bacteriana (CB) (GOMES, 2011).

Uma das diferenças fundamentais entre a CB e a celulose vegetal é que a primeira é quimicamente pura, livre de lignina, hemicelulose e outros componentes naturais presentes associados à celulose obtida de plantas. Esses componentes presentes na celulose vegetal podem ser extraídos por um tratamento alcalino, seguido de deslignificação. O processo de extração requer a utilização de produtos químicos corrosivos, prejudiciais ao meio ambiente e responsáveis por maiores custos e tempo de processamento, limita o uso da celulose em áreas mais específicas como a biomedicina (DUARTE *et al.*, 2010). Além de tornar o processo de obtenção complexo e não-amigável ambientalmente (BELGACEM e GANDINI, 2008; PHANTHONG *et al.*, 2018; SHODA, 2005).

No entanto, a CB tem sido amplamente estudada devido à sua pureza e propriedades, tornando-a um biopolímero promissor (DONINI *et al.*, 2010). Essa celulose sintetizada após o processo fermentativo, é composta por células microbianas, açúcares e outros metabólitos secundários que são removidos após um tratamento alcalino suave, sendo o produto um biomaterial com alto grau de pureza (DUARTE *et al.*, 2010).

3.2.1. Celulose bacteriana

A CB é um biopolímero promissor para fins industriais, pois a forma de obtenção dessa a torna livre de impurezas como lignina e pectina, além de diminuir o custo final do produto e redução dos impactos ambientais causados por sua produção (SHODA *et al.*, 2005).

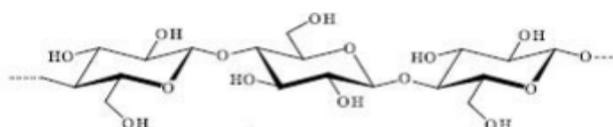
A CB é um homopolissacarídeo extracelular produzido por várias espécies de bactérias, pertencentes aos gêneros *Komagataeibacter* (antiga *Gluconacetobacter*, *Acetobacter*), *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Salmonella*, *Escherichia*, entre outras. Para a sua produção, destaca-se a bactéria Gram-negativa e aeróbia estrita *Komagataeibacter hansenii*, conhecida por produzir celulose na forma de uma membrana na interface líquido/ar do meio de cultivo. A via bioquímica mais compreendida envolve a conversão da glicose como substrato exógeno à celulose (SHODA e SUGANO, 2005; RECOUVREUX, 2008; DONINI *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2014; PFEFFER *et al.*, 2017). As bactérias desse gênero convertem etanol a ácido acético, logo, apresentam uma alta capacidade de tolerância a substância ácidas e são capazes de converter várias fontes de carbono e nitrogênio em celulose, mas o seu mecanismo de síntese ainda não foi completamente elucidado, porém, acredita-se que seja semelhante ao da *K. xylinus*, que começa sempre com o precursor de UDP-glicose e termina formando uma cadeia polissacarídica (BROWN JR., 2004; CACICEDO *et al.*, 2016; IGUCHI *et al.*, 1988; KESHK, 2014; RANGASWAMY; VANITHA; HUNGUND, 2015).

Durante a fermentação estática a membrana formada na interface ar/líquido permite que as bactérias aeróbicas se movam para a superfície, possibilitando uma maior facilidade para obtenção de oxigênio para seu crescimento (CACICEDO *et al.*, 2016; DONINI *et al.*, 2010). Devido ao caráter higroscópico da CB o mecanismo de flotação previne a desidratação do substrato e serve como proteção contra a luz ultravioleta, além de atuar como uma barreira contra o crescimento de outros

microrganismos (DONINI *et al.*, 2010; PORTELA *et al.*, 2019; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; SOUZA, 2014). Durante o processo de fermentação, a celulose é formada somente nas áreas próximas da superfície e não em todo o meio de cultivo. Enquanto o sistema for mantido imóvel, a membrana se mantém suspensa na parede interna do frasco por coesão (TUREK, 2017). As bactérias contidas na membrana podem ser facilmente removidas, pela imersão em soluções alcalinas diluídas em água, seguido pela lavagem exaustiva com água (BARUD, 2010; IGUCHI; YAMANAKA; BUDHIONO, 2000).

Sua fórmula química é a mesma que a celulose vegetal, mas seus aspectos físicos e químicos são distintos (REZAEI *et al.*, 2008). A estrutura química da celulose bacteriana está apresentada na figura 2. Em dimensões nanométricas a CB possui propriedades distintas como a resistência mecânica, resistência a tração, possibilidade de inserções de materiais para obtenção de compósitos, alta capacidade de absorção de água, biocompatibilidade e elevada porosidade. Além disso a membrana de CB possui diversas aplicações biotecnológicas como regeneração tecidual, desenvolvimento de biomateriais, implante vascular artificial, entre outros (DONINI *et al.*, 2010).

Figura 2 - Estrutura química da celulose bacteriana



Fonte: Pértile, 2007

As propriedades mecânicas da CB podem ser comparadas a outros polímeros e fibras complexas e sintéticas. Essas características estão diretamente relacionadas à sua estrutura cristalina de nano e microfibrilas. A combinação da alta cristalinidade com o seu alto conteúdo de água é responsável pela estabilidade térmica da CB, o que torna possível a sua esterilização por autoclave (uma maneira simples e barata de esterilização de biomateriais, uma vez que poucos polímeros suportam altas temperaturas sem que ocorra alguma alteração em suas propriedades) (CACICEDO *et al.*, 2016). A alta porosidade e capacidade de retenção de água, juntamente com a possibilidade de ser moldada em qualquer formato e ser manipulada com diferentes biopolímeros tornam a CB um ótimo material para aplicações biomédicas.

Diante de todas as propriedades comprovadas da CB, esse biopolímero tem sido altamente investigado como um novo tipo de material com potencial para várias aplicações (PUTRA, 2008).

3.2.1.1 Degradação do polímero

A natureza do polímero, as condições ambientais (sol, calor, umidade etc.), fator biótico (interação entre os seres vivos) e a assimilação por um microrganismo vivo (bactérias, fungos e algas) são fatores que influenciam no processo de degradação de um polímero (CAMARGO, 2018).

De maneira geral a degradação da CB na natureza acontece através de processos enzimáticos (PÉRTILE, 2007). Segundo Camargo (2018) a celulose bacteriana úmida apresentou menor tempo de degradação ao comparado com a celulose bacteriana seca. A presença da água pode ser um facilitador de degradação, pois dessa forma os microrganismos se locomovem mais facilmente para o interior da membrana.

3.2.2 Processos metabólicos envolvidos na produção da celulose bacteriana

A CB pode ser biossintetizada por várias espécies de bactérias pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azobacter*, *Escherichia*, *Komagataeibacter* (*Gluconacetobacter*), *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Sarcina* (HASSAN *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2014; ZHIJUN *et al.*, 2014).

Entre as bactérias produtoras mais eficientes destaca-se a espécie *Komagataeubacter xylinus* (anteriormente, *Gluconacetobacter xylinus*). Essa bactéria tem sido utilizada como modelo para estudos da biossíntese, processos de cristalização e propriedades da celulose (DUARTE *et al.*, 2019). Ela tem a capacidade de utilizar uma variedade de substratos carbônicos para sintetizar a celulose, como, por exemplo, hexoses, glicerol, diidroxiaçetona, piruvato e ácido dicarboxílico. Dependendo do tipo de substrato disponível, a via de oxidação utilizada pela bactéria pode ser a de pentoses fosfato, no caso de carboidratos, ou ciclo de Krebs, no caso de ácidos orgânicos e compostos relacionados (SOUZA, 2014; DUARTE *et al.*, 2019).

A biossíntese ocorre em várias etapas e segundo Donini *et al.*, três etapas principais podem ser destacadas:

1. Polimerização dos resíduos de glicose em cadeias 1-4-glucana;
2. Secreção extracelular das cadeias lineares;
3. Organização e cristalização das cadeias de glucanas, por meio de ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals dispostas hierarquicamente em tiras.

O resultado desse processo é a formação de uma estrutura tridimensional resistente denominado microfibrila. E a CB produzida a partir da bactéria *K. xylinus* apresenta duas características particulares: sua polaridade unidirecional e sua espessura variável.

A síntese da celulose por *K. xylinus* se dá a partir da glicose transportada do meio externo para o citoplasma da bactéria ou de fontes internas. A conversão é catalisada por quatro enzimas, sendo elas: Glicoquinase, responsável pela fosforilação do carbono 6 da glicose, a Fosfoglicomutase que catalisa a reação de isomerização da glicose-6-fosfato para glicose-1-fosfato, a UDPG – pirofosforilase (glicose-1-fosfato uridililtransferase) que sintetiza a UDP-glicose. A síntese da celulose, a partir de fontes endógenas, ocorre a partir da gliconeogênese que ocorre a partir do oxalacetato, via piruvato, devido a um mecanismo de regulação não comum das enzimas oxalacetato descarboxilase e a piruvato fosfato diquinase, que converte o piruvato fosfato em fosfoenolpiruvato (DONINE *et al.*, 2010).

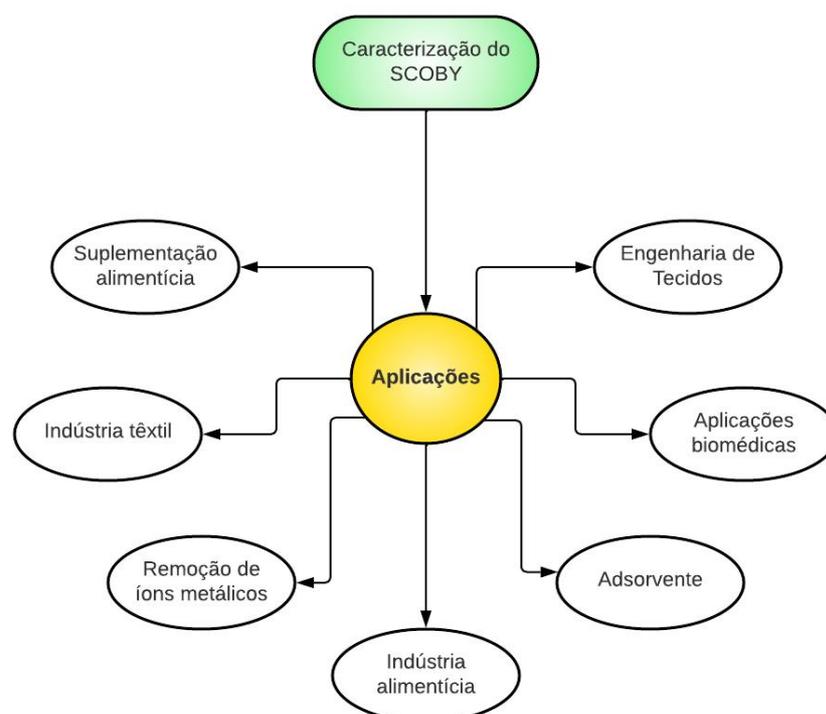
A reação de síntese da CB é um processo em que cerca de 10% do ATP gerado no metabolismo bacteriano seja consumido. Portanto, a energia empregada para a formação da CB é proveniente do metabolismo aeróbio (DONINI *et al.*, 2010).

3.2.3. Aplicações da celulose bacteriana

Diversas são as áreas de aplicação da celulose bacteriana, tornando esse biopolímero de aplicabilidade extensa. Utilizada na indústria de alimentos para produzir nata de coco, sorvetes de baixas calorias, aperitivos, doces, espessante e soro para redução do colesterol. Na indústria de cosméticos é comumente utilizada como hidratante e adstringentes, também é empregada na indústria têxtil, além de participar do processo de fabricação de aparelhos eletroacústicos, célula combustível, aditivo para papel de alta qualidade, membrana de ultrafiltração e membrana para recuperação de óleo e mineral. Na biomedicina tem despertado grande interesse para diversas aplicações como: substituto temporário da pele para recuperação de ferimentos e queimaduras, liberação de fármacos, produção de vasos sanguíneos, recuperação de nervos e gengiva,

recuperação da dura-máter, na engenharia de tecidos, revestimentos de *stents* e biomaterial de regeneração óssea (RECOUVREUX, 2008; AMORIM, 2020). A figura 3 detalha algumas das possíveis aplicações da CB:

Figura 3 - Aplicações da celulose bacteriana produzida a partir da kombucha



4. Metodologia

O estudo será dividido em duas etapas (4.1 e 4.2).

Inicialmente foram fornecidas membranas (membrana mãe), hospedadas em um recipiente com inóculo, que foram produzidas anteriormente na produção de kombucha. A partir dessas membranas mãe foram produzidas as membranas alvo da etapa 1 do estudo.

O objetivo da primeira etapa é a escolha entre o chá preto ou o chá verde.

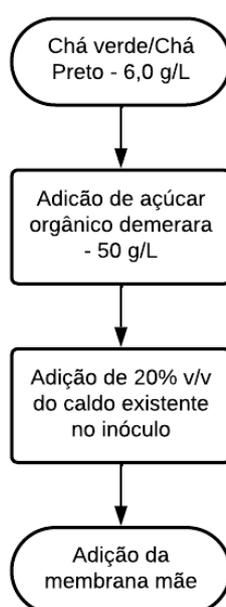
A segunda etapa consiste em produzir membranas a partir do chá escolhido variando a concentração de açúcar no substrato, e analisar a interferência dessa variação ao longo de 3, 6 e 9 dias.

4.1. Síntese da membrana de CB a partir do chá verde e chá preto

A primeira etapa do estudo tem como objetivo sintetizar membranas a partir do chá verde e do chá preto, e a partir da massa final da membrana produzida e das características físico-químicas escolher qual substrato será responsável pelo desenvolvimento da segunda etapa do estudo.

Foram produzidas 4 amostras de chá preto e 4 amostras de chá verde a partir do fluxograma a seguir disposto na figura 4:

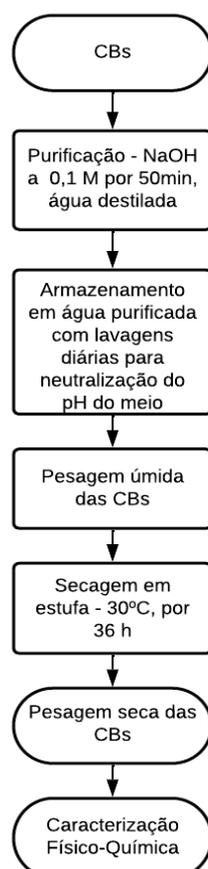
Figura 4 - Fluxograma de produção da kombucha



As amostras foram armazenadas em local seco, com pouca iluminação e condição estática. Nessa primeira etapa o processo de cultivo foi de 15 dias.

A partir da formação das CBs, essas foram submetidas aos processos esquematizados na Figura 5:

Figura 5 – Etapa dos processos de purificação e secagem da celulose



4.1.1. Purificação das membranas

As membranas formadas na superfície do meio de cultivo foram purificadas conforme o método utilizado por Costa (2017). As membranas de celulose bacteriana foram lavadas com água corrente para remoção do cultivo remanescente e em seguida tratadas em solução 0,1 mol/L de NaOH, em banho termostático a 80 °C por 60 min, para remover impurezas bacterianas e outros contaminantes.

Após o tratamento, as membranas foram lavadas com água destilada até atingir o pH neutro, para então serem pesadas (massa úmida) e direcionadas para a etapa de secagem em estufa à 30 °C, durante 36 horas.

4.1.2. Pesagem da massa úmida

A amostra de CB, após o processo de purificação, foi retirada com uma pinça da água destilada e seca em papel absorvente para a retirada do excesso de água superficial com pressão manual constante por 15 s. Após esse processo a amostra foi pesada e com isso obteve-se a massa úmida.

4.1.3. Secagem das membranas

Para secagem das membranas, foi utilizada estufa com circulação de ar (marca Quimis), com temperatura de 30 °C, por 36 h.

4.2. Caracterização físico-química das membranas

4.2.1. Capacidade de retenção de água (CRA)

Para determinar a CRA das membranas foi utilizado a equação 1:

$$CRA = \frac{\text{massa úmida} - \text{massa seca}}{\text{massa seca}} \quad (1)$$

4.2.2. Percentual de água (PA)

Para determinar o PA das membranas foi utilizado a equação 2 a seguir (HUANG et al., 2010):

$$PA(\%) = \left(\frac{\text{massa úmida} - \text{massa seca}}{\text{massa seca}} \right) * 100\% \quad (2)$$

4.2.3. Percentual de redução (PR)

Para determinar o PR das membranas foi utilizado a equação 3 a seguir

$$PR (\%) = \left(\frac{\text{massa úmida} - \text{massa seca}}{\text{massa úmida}} \right) * 100\% \quad (3)$$

4.2.4. Velocidade média de formação (V_m)

Para determinar a V_m de formação das membranas em cada período, foi utilizado a equação 4 a seguir:

$$Vm = \frac{\Delta massa CB}{\Delta tempo} \quad (4)$$

4.2.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O método de espectroscopia FTIR é usado para investigar os componentes químicos e interações intermoleculares através da transmissão de ondas infravermelhas em todo o material, medindo o número de onda de transmissão em uma resolução de 4000-400 cm^{-1} .

Foram realizadas 16 varreduras por amostra, de 400 a 4000 cm^{-1} , no modo de refletância total atenuada (ATR). O experimento foi conduzido no Laboratório de Materiais da Univille, no equipamento Perkin Elmer Spectrum.

4.2.6. Análise termogravimétrica (TGA)

A fim de avaliar a estabilidade térmica das membranas de CB realizou-se a análise de TGA. Essa análise consiste em uma técnica destrutiva, envolvendo a medida da variação de massa das amostras em estado sólido em função da temperatura, em um intervalo de tempo.

A análise foi realizada no equipamento TGA-Q50 (TA Instruments) do laboratório de Materiais da Univille. As amostras foram aquecidas de 25 a 1000 $^{\circ}\text{C}$ a 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera inerte (N_2). As curvas termogravimétricas (TG) e a 1ª derivada das mesmas (DTG) foram obtidas pelo *software* TA Universal Analysis.

4.3. Síntese da membrana a partir do chá escolhido

Com base nos parâmetros analisados na primeira etapa (massa formada da CB, resultados do TGA e FTIR) foi escolhido o melhor chá para a formação de CB, com maior valor de massa e maior estabilidade térmica. A partir do chá escolhido foram produzidos substratos variando a concentração de açúcar no meio (25, 37,5 e 50 g/L) durante o período de 9 dias.

Para avaliar a massa da membrana formada e a concentração de açúcar no meio, foram analisadas as amostras de CBs, em triplicatas, nos tempos 0, 3, 6 e 9 dias. Dessa forma, foi possível analisar a influência do tempo e da concentração de açúcar no crescimento da membrana.

A metodologia de purificação e pesagem úmida nessa etapa foi a mesma utilizada na etapa anterior. Através dos valores obtidos de massa úmida e da concentração de açúcar em cada alíquota foi avaliado a interferência da concentração de açúcar e da massa do SCOBY no crescimento da CB.

4.3.1. Produtividade máxima e global

A fim de verificar a produtividade máxima de cada concentração, foi calculado a Produtividade global - P_{global} - (equação 4) e produtividade máxima - $P_{máx}$ - (equação 5):

$$P_{global} = \frac{\text{Média da massa de CB em 15 dias}}{9 \text{ dias}} \quad (4)$$

$$P_{máx} = \frac{\text{Maior valor de massa no período de 9 dias}}{\text{Quantidade de dias desse valor}} \quad (5)$$

4.3.2. Composição bacteriológica

A avaliação das bactérias presentes na membrana foi realizada por um laboratório biotecnológico, localizado em Florianópolis/SC.

Através do Diagnóstico Microbiológico Digital (DMD) foi realizada a análise de sequenciamento de amplicons 16S (DMD Bactéria) com cobertura de 50k reads.

4.3.3. Consumo de concentração de açúcar do meio

A sacarose é um dissacarídeo, disponível em variadas formas como: mascavo, cristal, confeiteiro, refinado etc. Esse açúcar, não redutor, é formado pela ligação entre a frutose e glicose (MANHANI *et al.*, 2014), e por esse motivo é necessário a etapa de hidrólise para que possa ser utilizado a metodologia de ácido dinitrosalicílico (DNS) para a quantificação de sacarose no meio.

Foi realizado a hidrólise ácida da sacarose: em um tubo de ensaio foi adicionado 1mL do meio de cultivo e 1mL de solução de HCl (2 N) e a solução foi levada à fervura por 15 minutos e posteriormente foi resfriada em banho de gelo. Em seguida foi adicionado 2 mL de solução de NaOH (1 N) para neutralizar a solução. Posteriormente foi determinado a concentração de sacarose no meio, através do método de DNS (MILLER, 1959).

Em novos tubos de ensaio foi colocado 1mL da solução hidrolisada (etapa anterior) e adicionado 1mL da solução de DNS (3,5 ácido dinitrosalicílico). Essa nova solução foi submetida à fervura por 5 min, em banho maria, e posteriormente foi resfriada em banho de gelo. Com a solução resfriada foi adicionado 10 mL de água deionizada e foi realizado a leitura em espectrofotômetro LKB Biochrom a 540 nm.

As concentrações de açúcar foram determinadas com base na curva de calibração realizada com amostras padrões (concentração variando de 0 a 2 g/L).

4.3.3.1. Percentual de consumo de sacarose (PCS):

De acordo com os resultados obtidos no item 4.3.3, foi calculado o percentual de consumo de sacarose (PCS) (equação 6) de cada concentração (25,0; 37,5 e 50,0 g/L) a fim de verificar qual das concentrações apresentou o maior consumo final de sacarose:

$$PCS = 100\% - \left(\frac{\text{Concentração de sacarose no tempo } 9}{\text{Concentração de sacarose no tempo } 0} \right) * 100\% \quad (6)$$

Foi calculado o consumo parcial (PCSp) nos tempos 3 e 6 dias, levando em consideração a concentração de sacarose anterior (equação 7):

$$PCSp = 100\% - \left(\frac{\text{Concentração de sacarose no tempo em questão}}{\text{Concentração de sacarose no tempo anterior}} \right) * 100\% \quad (7)$$

5. Resultados e Discussão

5.1. Etapa 1 – Avaliação da síntese de CB a partir do chá verde e chá preto

5.1.1. Pesagem úmida, CRA PA e PR

Após o processo de fermentação, foi possível notar que as membranas formadas a partir do chá preto eram mais espessas e firmes, com maior consistência. Enquanto as membranas formadas a partir do chá verde eram consistentes e firmes, porém com menor espessura. Ao realizar a pesagem de cada membrana os valores obtidos justificaram o maior volume das CBs obtidas a partir do chá preto.

Segundo Pértile (2007), as CBs úmidas possuem alta capacidade de retenção de água (hidrofilicidade), alta cristalinidade, uma rede de nanofibras e alta resistência a tração.

Após os processos de purificação, secagem e a medição dos valores obtidos de massa úmida e seca de cada amostra, foi calculado a capacidade de retenção de água e percentual de água presente em cada amostra de celulose bacteriana.

Na tabela 1 estão os valores obtidos de massa úmida, capacidade de retenção e percentual de cada chá:

Tabela 1 - Massa úmida, capacidade de retenção de água (CRA) e percentual de água (PA) das membranas obtidas a partir do chá verde e chá preto

	Massa úmida (g)	CRA	PA (%)
Chá verde	1,47 ± 0,20	36,50 ± 5,30	3654,00 ± 531,60
Chá preto	2,00 ± 0,32	38,90 ± 6,40	3890,00 ± 636,40

Como resultado do processo de secagem as amostras tiveram sua massa reduzida, devido seu alto percentual de água e sua alta capacidade de retenção de água, justificados através dos cálculos de CPA e PA. A estrutura de rede 3D altamente porosa que é formado na CB, confere a esse biomaterial a alta capacidade de retenção de água, que normalmente é 60-700 vezes mais que sua própria massa seca. Devido à estrutura superfina e seus grupos hidrofílicos são formados “túneis” nas membranas, que são capazes de reter grande quantidade de água (CHEN, 2014). Na tabela 2 estão os valores de massa seca das CBs após o processo de secagem:

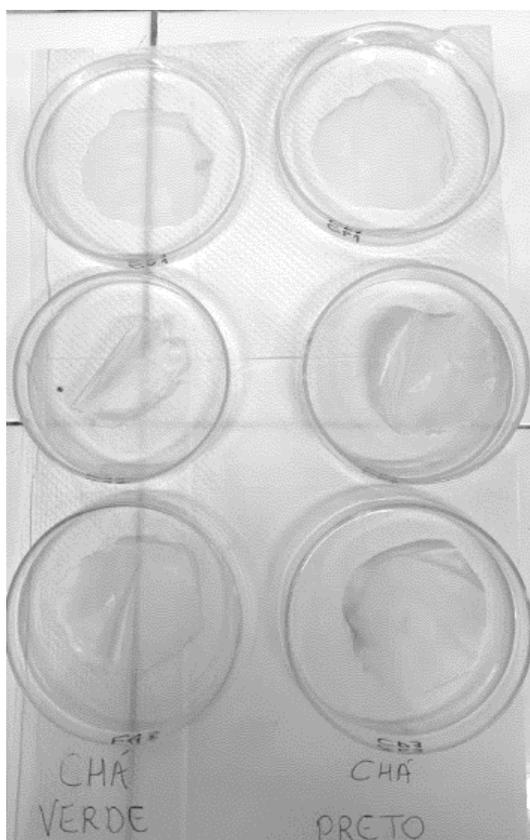
Tabela 2 - Massa seca e PR das membranas obtidas a partir do chá verde e chá preto

	Massa seca (g)	PR (%)
Chá verde	0,04 ± 0,01	97 ± 0,37
Chá preto	0,06 ± 0,02	98 ± 0,54

O percentual de redução da massa das membranas a partir do chá preto foi maior, devido seu maior percentual de água (PA), conforme demonstrado na tabela 1. Porém apesar dessa maior redução, a massa seca final do chá preto ainda superou a massa seca do chá verde, demonstrando que o chá preto mais contribuiu para a formação do SCOBY filho.

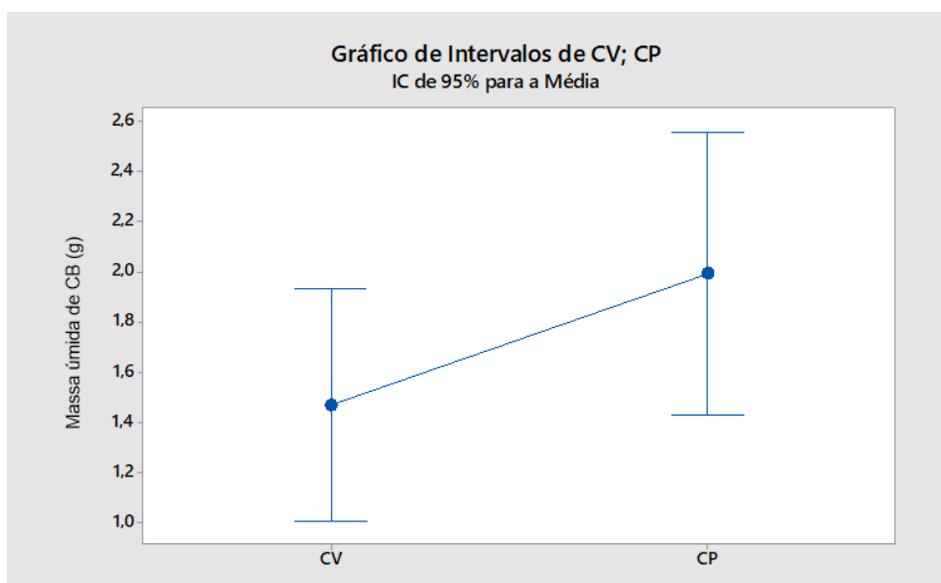
Como resultado da secagem obteve-se finas membranas de celulose, conforme mostra a figura 6. Foi possível notar a baixa resistência das CBs. De acordo com Pértile (2007), as membranas não purificadas apresentam valores significativos de resistência, enquanto as amostras purificadas com NaOH possuem baixa resistência a tração devido suas propriedades de absorção, pois a ordenação entre as fibras é reduzida e isso pode contribuir para a redução da resistência mecânica.

Figura 6 - Celuloses bacterianas do chá verde e chá preto após a secagem



De acordo com o gráfico de intervalos das membranas úmidas (figura 7) obtidas a partir do chá verde e chá preto, com intervalo de confiança de 95% para a média, não houve variância significativa entre as médias das massas:

Figura 7 - Gráfico de intervalos da massa das membranas a partir do chá verde e chá preto



Porém o meio de cultivo utilizando o chá preto como substrato contribuiu para uma maior massa de celulose bacteriana, conforme os valores obtidos da média da massa úmida e seca. Portanto, considerando a massa como fator para escolha do chá, o chá preto contribuiu para uma celulose bacteriana com maior valor de massa.

Batista (2019), em seu estudo observou que sob as mesmas concentrações e condições a membrana obtida a partir do chá preto apresentou maior crescimento ao comparada com o chá verde. Os nutrientes presentes no chá são essenciais para crescimento dos microrganismos e para a produção da película celulósica. Apesar dos chás possuírem a mesma composição, a proporção de cada composto não é a mesma e o grau de oxidação de cada um também se diferencia. Todo benefício do chá é transferido para a kombucha, tornando essa bebida saudável e benéfica para aquele que a consome.

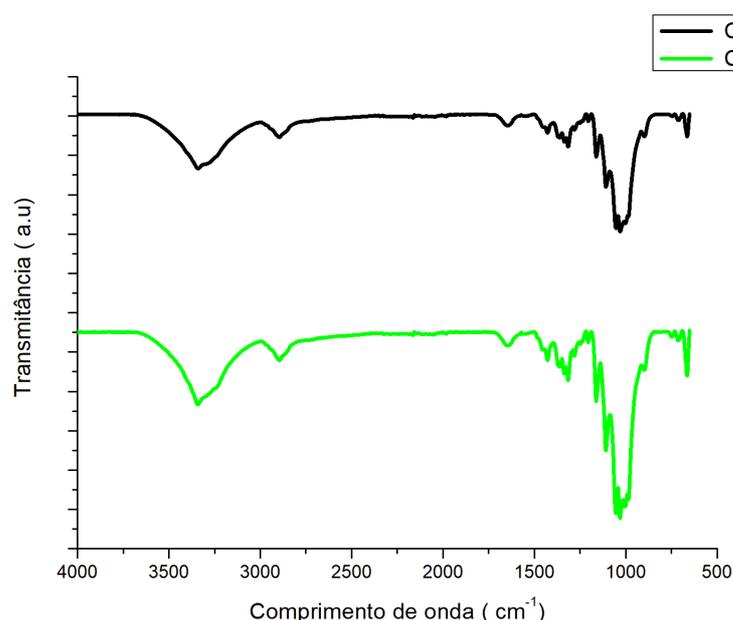
Venturini (2010) definiu que o chá é a infusão obtida pela escalda de folhas de chá verdes (chá verde) ou fermentadas (chá preto). No chá preto, apesar de seu preparo ser chamado de etapa de fermentação, as reações que determinam seu escurecimento são as de oxidação enzimática. O chá verde se difere do chá preto quimicamente e tecnologicamente. Em seu processo de obtenção não há a etapa de oxidação como o chá preto, e a atividade enzimática das folhas é inibida mediante um tratamento térmico, com

vapor ou calor seco logo após sua coleta. Portanto, as características do chá verde são determinadas pela composição intrínseca das folhas no momento da coleta (BLAUTH, 2019).

5.1.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR estão apresentados na figura 8, enquanto as principais bandas obtidas para as amostras de CB a partir do chá verde (CB_{CV}) e para as amostras de CB a partir do chá preto (CB_{CP}) estão dispostos na tabela 3.

Figura 8 - Espectros de FTIR obtidos para as membranas de CB



Fonte: Autor, 2023

Tabela 3 - Atribuições dos grupos funcionais presentes nas amostras

Atribuições	Nº de onda (cm ⁻¹)			Referências
	CB _{LIT}	CB _{CP}	CB _{CV}	
Estiramento O-H	3344	3340	3341	(RICCI et al., 2015)
Estiramento C-H e CH ₂	2896	2895	2895	(PECORARO et al., 2007)
Estiramento de C=C; Deformação Angular H ₂ O	1641	1643	1643	(BARUD, 2010; GINDRI et al., 2020)
COO-	1427	1428	1427	(GINDRI et al., 2020; SCHULZ; BARANSKA, 2007)
Deformação angular simétrica CH ₃	1371	-	1361	(BARANSKA et al., 2005)
Estiramento C-O	1336	-	-	(BORGES et al., 2015)
Deformação simétrica fora do plano CH ₂	1315	1315	1315	(KAČURÁKOVÁ et al., 2002)
Estiramento C=O	1280	1273	-	(GONZALEZ-RIVERA et al., 2021)
O-H aromático	1205	-	-	(BARUD, 2010)
Estiramento C-O	1161	1161	1161	(PECORARO et al., 2007)
Estiramento C-O Estiramento C-C	1109	1107	1108	(KAČURÁKOVÁ et al., 2002)
Estiramento C-O Estiramento C-C	1055	1054	1054	(KAČURÁKOVÁ et al., 2002)
Estiramento C-O	1032	1030	1030	(BORGES et al., 2015; FALCÃO; ARAÚJO, 2013)
Deformação simétrica fora do plano CH ₂	999	-	984	(BARANSKA et al., 2005; DZIMITROWICZ et al., 2019)
Deformação angular C-H	895	-	-	(GEA et al., 2011)
=CH	748	-	712	(MÉNDEZ, 2017)
Deformação angular O-H	664	663	664	(BARUD, 2010)

Para as duas amostras observa-se valores próximos para cada grupo funcional, diferenciando apenas a transmitância entre as amostras, confirmando que se trata do mesmo polímero. A amostra proveniente do chá verde apresentou maior transmitância quando comparada com a amostra proveniente do chá preto. Em ambas as amostras é possível notar a semelhança dos agrupamentos ao comparado com a literatura (CB_{LIT}) e a presença de grupos hidrofílicos, que contribuí para a retenção de água.

Todas as amostras apresentaram bandas com alta intensidade em 3340 cm⁻¹, que pode ser atribuída ao estiramento axial dos grupos hidroxila, característicos de compostos orgânicos (RICCI *et al.*, 2015; SILVA, 2018). O pico próximo a 2895 cm⁻¹ foi observado nas duas amostras e pode ser atribuído às vibrações de estiramento C-H e CH₂. Em 1643 cm⁻¹ notamos o pico referente ao estiramento da dupla ligação entre carbonos (C=C) e a deformação angular da água. No intervalo entre 1427 - 663 cm⁻¹ observa-se a presença dos grupos COO, a deformação angular CH₃, ligação C-O, deformação simétrica CH₂, estiramento C=O, O-H aromático, estiramento C-O e C-C e deformação angular O-H. A CB do chá preto não apresentou deformação simétrica fora do plano do grupo CH₂, deformação angular C-H e ligação =CH, enquanto a amostra de CB do chá verde apresentou picos para deformação simétrica fora do plano do grupo CH₂ e ligação =CH.

Ao comparar os valores obtidos das CBs a partir do chá preto e chá verde com a CB da literatura (CB_{LIT}) é possível afirmar que o material produzido a partir do consórcio é o mesmo ao comparado com a CB obtida a partir da cepa pura. Porém de acordo com Novak *et al.*, (2021) a CB obtida a partir do consórcio é mais vantajosa ao comparado com a CB de cepa pura, devido aos custos e o menor controle do processo, tornando mais vantajoso a produção a partir desse meio alternativo.

5.1.3. Análise termogravimétrica (TGA)

Na figura 9 estão apresentadas as curvas termogravimétricas (curvas TG) e a primeira derivada das curvas TG (DTG) para as amostras de CB a partir do chá preto e chá verde. Os dados obtidos das curvas TG e DTG (perda de massa (%), temperatura máxima de degradação (T_{max}) e percentual de resíduo) estão relacionados na tabela 4.

Figura 9 - Curvas de análise termogravimétrica (TG), obtidas por TGA, para as diferentes amostras de CB

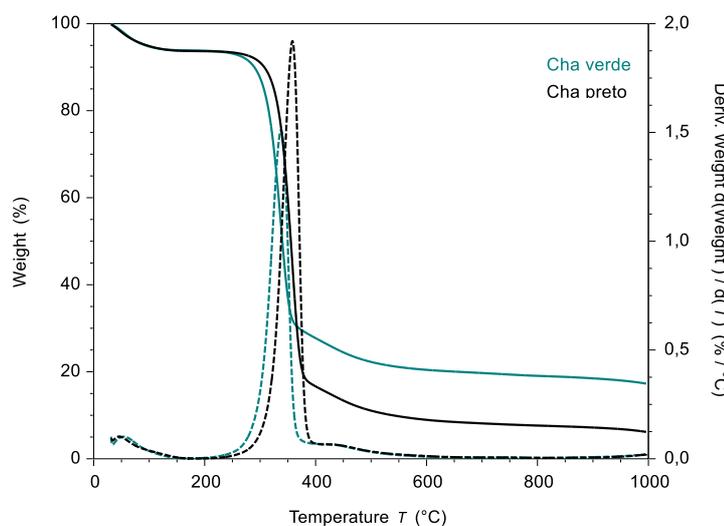


Tabela 4 - Eventos térmicos das amostras obtidos a partir das curvas TG/DTG

Amostra	M ₁ (%)	T _{máx₁} (°C)	M ₂ (%)	T _{máx₂} (°C)	M ₃ (%)	T _{máx₃} (°C)
Chá Verde	6	59	62,25	337	14,18	608
Chá Preto	5,78	48	78,51	358	9,07	641

O perfil de degradação térmica das membranas de CB foram semelhantes e apresentaram 3 estágios de perda de massa.

No 1º estágio a CB de chá verde apresentou a temperatura máxima de 59 °C enquanto a temperatura máxima da CB do chá preto foi 48 °C. A perda de massa nesse primeiro estágio foi semelhante para as duas amostras, aproximadamente 6%. De acordo com Lima *et al.* (2015) e Machado *et al.* (2018) no primeiro estágio a perda está associada a desidratação da celulose (evaporação da água). O alto teor de perda de água está ligado a hidrofiliabilidade (adsorção de água) da celulose.

No 2º estágio a amostra de CB do chá verde apresentou perda de massa de 62,25% e T_{máx2} de 337 °C, enquanto a perda de massa da CB do chá preto foi 78,51% com T_{máx2} de 358 °C. Nesse estágio é possível notar que a CB de chá preto apresentou maior estabilidade térmica. No segundo estágio, de modo geral, a perda está relacionada ao processo de despolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas da celulose (LIMA *et al.*, 2015).

No 3º e último estágio a CB de chá verde apresentou 14,18% de perda de massa e T_{máx3} de 608 °C, e a CB de chá preto 9,07% de perda de massa e T_{máx3} de 641 °C.

Nesse estágio houve a degradação dos resíduos carbonáceos. É possível notar, também, a diferença entre o comportamento das duas amostras, mostrando a maior estabilidade térmica da CB a partir do chá preto, com uma menor perda de massa (LIMA *et al.*, 2015).

De acordo com Wong *et al.* (2009) o intervalo de temperatura máxima de degradação térmica da CB é de 300 – 350 °C. Considerando que a degradação iniciou após o processo de desidratação da celulose (após o 1º estágio), nota-se que as CBs obtidas a partir de um consórcio simbiótico de bactérias acéticas e leveduras possuem maiores valores de temperatura de degradação (337 – 641 °C), indicando maior estabilidade térmica das CBs a partir do consórcio.

A utilização de diferentes microrganismos e meios de cultivos influenciam na variação de temperatura de degradação da CB. Utilizando a *Komagataeibacter medellinensis* como microrganismo para produção de CB, a temperatura de início da degradação registrada foi de 240 °C e em 327 °C foi registrado a maior degradação (RAMIREZ *et al.*, 2017). Porém quando se utiliza um consórcio microbiano de kombucha a temperatura inicial de degradação registrada foi 250 °C e a temperatura que atinge maior degradação foi registrada em 350 °C (AVCIOGLU *et al.*, 2021). Portanto é possível concluir que a CB de chá preto apresentou maior temperatura de degradação, conseqüentemente a utilização desse chá, no substrato, influenciou em uma maior estabilidade térmica da membrana formada a partir do meio utilizando o chá preto como fonte de nitrogênio.

5.2. Etapa 2 – Avaliação da concentração de açúcar na obtenção de celulose bacteriana a partir do chá preto

5.2.1. Pesagem das CBs durante a produção

Os valores obtidos das massas produzidas em cada tempo estabelecido estão na tabela 5:

Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão das massas de membranas de CBs produzidas em cada período

	Massa média das membranas produzidas em cada período (g)		
	3 dias	6 dias	9 dias
25 g/L	0,14 ± 0,02	0,32 ± 0,06	0,45 ± 0,02
37,5 g/L	0,09 ± 0,05	0,30 ± 0,07	0,45 ± 0,06
50 g/L	0,28 ± 0,11	0,36 ± 0,06	0,41 ± 0,09

De acordo com o crescimento das membranas em função do tempo foi plotado o gráfico da Massa CB x tempo (figura 11) e calculado a velocidade de formação em cada período (tabela 5):

Figura 10 - Crescimento da CB em função do tempo

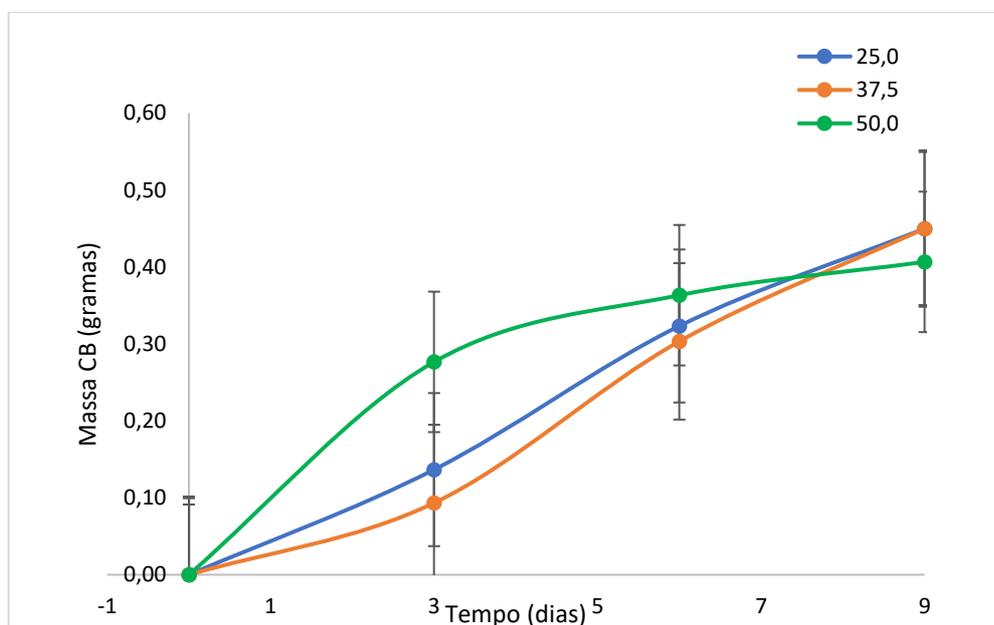


Tabela 5 - Velocidade média de formação da CB

	Velocidade média de formação parcial (g/dia)		
	3 dias	6 dias	9 dias
25 g/L	0,05 ± 0,02	0,06 ± 0,07	0,04 ± 0,08
37,5 g/L	0,03 ± 0,05	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,02
50 g/L	0,09 ± 0,04	0,03 ± 0,05	0,02 ± 0,06

Observa-se que há o crescimento das membranas, independente da concentração do meio, e que as diferentes concentrações não demonstram diferenças significativas, de massa de membrana, ao final do tempo estabelecido (9^o dia).

Nota-se que no início da produção o meio com maior concentração de açúcar (50 g/L) apresentou maior velocidade de formação da membrana, ou seja, nos três primeiros dias houve produção significativa de CB (0,09 g/dia) ao comparado com a concentração de 25,0 g/L (0,05 g/dia) e 37,5 (0,03 g/dia). Porém apesar de continuar em crescimento, nota-se que houve a queda de produção de CB nos tempos 6 e 9 dias, reduzindo significativamente a massa produzida. Para produções em poucos dias (até 3) a concentração de sacarose de 50,0 g/L se torna interessante.

A massa das membranas com concentração de 25,0 g/L e 50,0 g/L tiveram valores iguais (0,38 gramas) próximo do sétimo dia. Enquanto próximo ao oitavo dia, a massa de CB dos meios com concentrações de 37,5 e 50,0 g/L foram iguais (0,39 gramas). No nono dia as massas das membranas de 25,0 e 37,5 g/L foram iguais (0,43 gramas) e a partir de então as curvas dessas duas concentrações se assemelham.

A tabela 6 relaciona a produtividade global (P_{global}) e a produtividade máxima ($P_{\text{máx}}$) de cada concentração, de acordo com os valores obtidos:

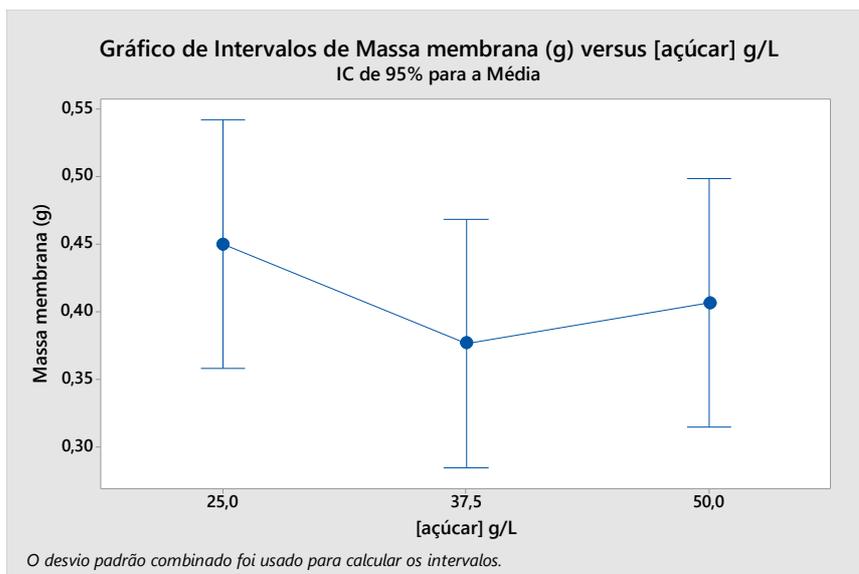
Tabela 6 - Produtividade global e produtividade máxima

	P_{global} (g/dia)	$P_{\text{máx}}$ (g/dia)
25 g/L	0,05	0,05
37,5 g/L	0,05	0,05
50 g/L	0,06	0,06

Os valores de produtividades global e máxima são os mesmos, pois o maior valor de massa obtido, foi respectivamente no maior tempo de produção. Ao comparar a curva obtida na figura 11 notou-se que há sempre o crescimento, considerando os nove dias de cultivo. Por esse motivo os valores P_{global} e $P_{\text{máx}}$ são os mesmos.

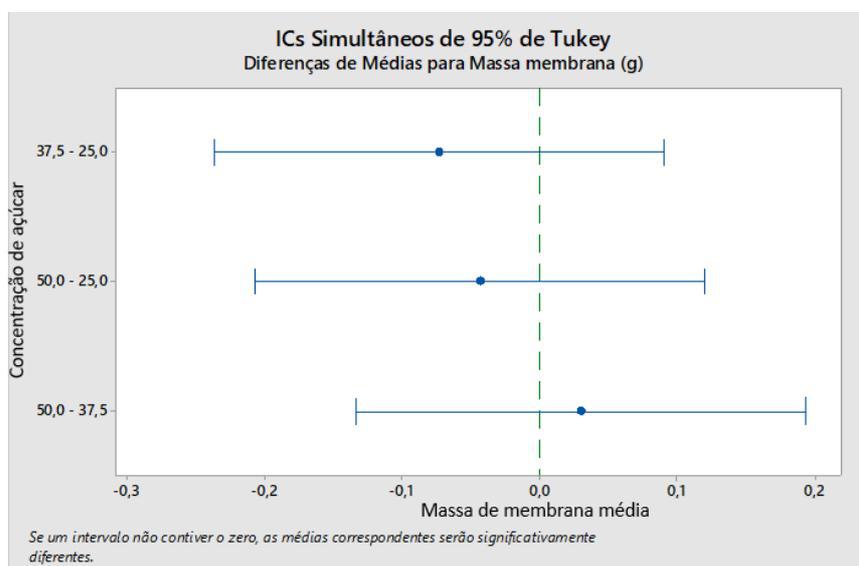
De acordo com Kalifawi *et al.* (2014) o rendimento da CB formada está diretamente relacionada a concentração de sacarose, utilizada como principal fonte de carbono e a concentração do chá preto, utilizada como principal fonte de nitrogênio. De acordo com o tempo do experimento desse estudo, 9 dias, a CB ao final do processo ainda apresentava crescimento, e as variações da concentração da fonte de carbono, açúcar (sacarose), utilizadas no estudo, não apresentou variação significativa na massa produzida da CB ao final do processo, conforme o gráfico de intervalos de massa da membrana x concentração de açúcar (figura 11), com intervalo de confiança de 95% para a média:

Figura 11 - Intervalos da massa das membranas de diferentes concentrações de açúcar



Ao realizar a análise pelo método de comparações emparelhadas de Tukey, para os valores médios da massa da membrana formada, para cada concentração, se confirma que não houve variações significativas entre a massa de membrana formada:

Figura 12 - Diferença das médias para massa de membrana formada de cada concentração de açúcar

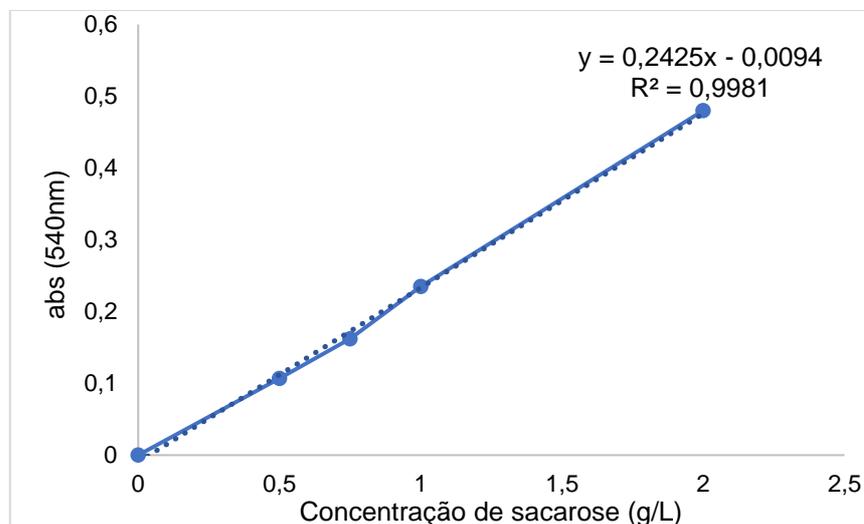


5.2.2. Consumo do açúcar do meio

De acordo com o método descrito no item 4.3.3 e por meio da curva de correlação (figura 13) obteve-se a equação da reta, que possibilita a medição da concentração de açúcar no meio. A equação foi obtida através das leituras, da absorbância, realizadas no

espectrofotômetro para os padrões de sacarose, com concentração de 0; 0,5; 0,75; 1,0 e 2,0 g/L. Através da figura 13 é possível ver a equação da reta obtida e a reta:

Figura 13 - Curva padrão para análise da concentração de açúcar no meio



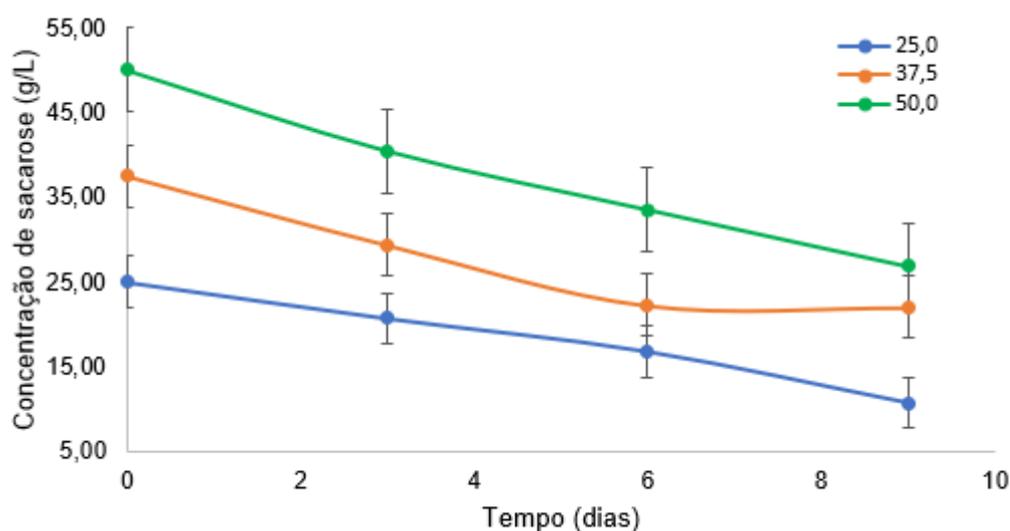
Os valores obtidos para a concentração de açúcar ao longo do tempo, de acordo com cada concentração inicial, estão dispostos na tabela 5:

Tabela 6 – Variação da concentração de açúcar ao longo do tempo

Concentração de açúcar no meio de acordo com o tempo				
	0 dia	3 dias	6 dias	9 dias
25,0 g/L	25,00 ± 0,41	20,70 ± 2,63	16,79 ± 0,97	10,73 ± 3,46
37,5 g/L	37,50 ± 3,33	29,38 ± 0,80	22,23 ± 1,26	21,99 ± 0,46
50,0 g/L	50,00 ± 2,71	40,49 ± 2,93	33,58 ± 0,11	26,91 ± 1,74

Ao plotar o gráfico do consumo de açúcar do meio substrato (figura 14) ao longo do tempo, para cada concentração, é possível concluir que houve o consumo do açúcar disponível no substrato e que o período analisado (9 dias) não é o período em que há o consumo total da sacarose disponível:

Figura 14 - Consumo do açúcar do meio em relação ao tempo



Avaliando o percentual de consumo de sacarose parcial (PCSp) (tabela 6) é possível notar que no início da fermentação (3 dias) o substrato com concentração de 37,5 g/L de sacarose teve maior consumo de açúcar, seguido do substrato com 50,0 g/L e 25,0 g/L.

Em 6 dias o meio com 37,5 g/L de sacarose ainda apresentou maior consumo de açúcar, seguido do meio com 25,0 g/L e por último o meio de 50,0 g/L.

Os valores, entre a mesma concentração, desses dias são aproximados e não apresentaram grande variação no consumo.

Tabela 7 - Percentual de consumo de sacarose parcial

	PCSp 3 dias	PCSp 6 dias	PSCp 9 dias
25,0 g/L	17%	19%	36%
37,5 g/L	22%	24%	1%
50,0 g/L	19%	17%	20%

Porém ao analisarmos o final do processo (9 dias) é notório o baixo consumo de açúcar do substrato com 37,5 g/L, enquanto o meio com concentração de 25,0 g/L aumentou significativamente seu consumo (36%) e o consumo em 50,0 g/L aumentou, porém não significativamente como o aumento apresentado na concentração de 25,0 g/L.

Para certificar qual foi o maior consumo ao longo dos 9 dias foi calculado o percentual de consumo de sacarose final (tabela 7):

Tabela 8 - Percentual de consumo de sacarose em 9 dias

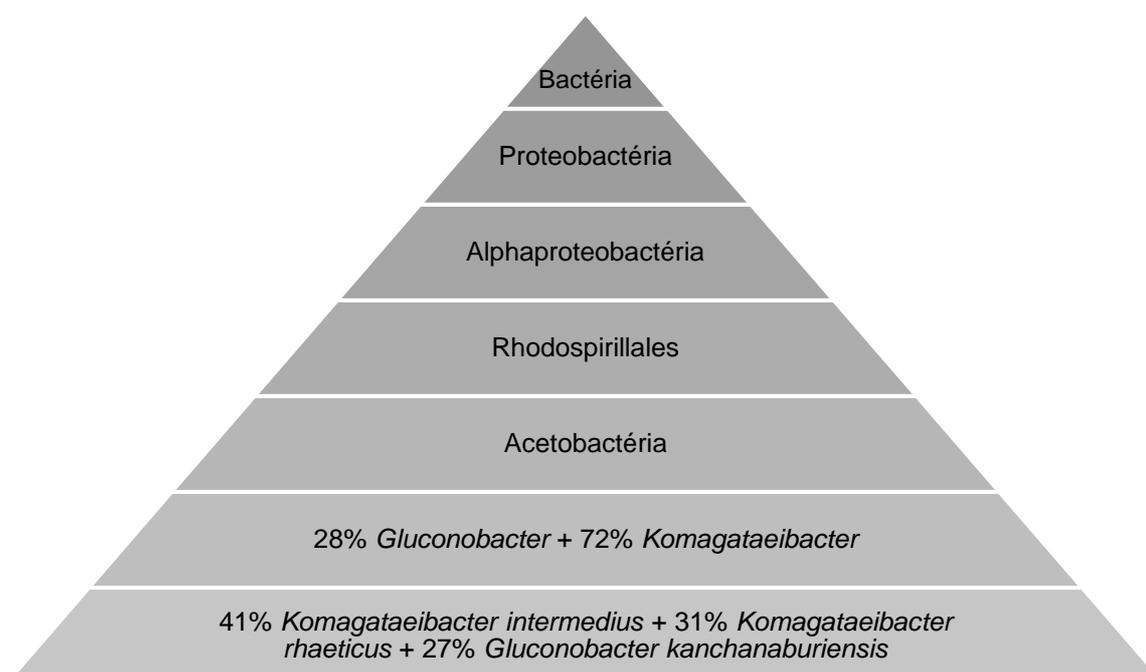
	PCS
25,0 g/L	57%
37,5 g/L	41%
50,0 g/L	46%

Apesar da concentração de 37,5 g/L apresentar maior consumo até o 6º dia, esse consumo não foi o suficiente para superar o aumento significativo do consumo de açúcar da concentração de 25,0 g/L. E devido ao baixo consumo final (6 a 9 dias) a concentração de 37,5 g/L foi a menor no período total de fermentação.

É possível concluir que independente do tempo analisado, o consumo de sacarose é apresentado em todas as concentrações e em todo o intervalo de tempo analisado. Porém considerando o tempo de 9 dias de processo, a concentração de 25,0 g/L apresentou maior consumo. E considerando apenas 6 dias de processo, em que há o consumo significativo pela concentração de 37,5 g/L, essa se torna interessante, devido ao menor tempo de fermentação necessária para o consumo de açúcar.

5.2.3. Análise bacteriológica

De acordo com a análise realizada o reino, filo, classe, ordem, família, gênero e espécie da membrana são:



As leituras realizadas atribuíram que a membrana é formada por bactérias, o filo dominante foi a *Proteobactéria*, classe *Alphaproteobactéria* e ordem *Rhodospirillales*. A família presente é a *Acetobactéria*, presentes em bebidas fermentadas (assim como a kombucha) e os gêneros presentes são *Gluconobacter* e *Komagataeibacter*.

O gênero *Gluconobacter* são aeróbicas e com temperatura ótima de crescimento entre 25 e 30 °C. Quimiorganotróficas (utilizam compostos orgânicos como fonte de energia e carbono), elas oxidam etanol a ácido acético. Enquanto as espécies pertencentes ao gênero *Komagataeibacter* são boas produtoras de CB a níveis comerciais e devido às suas propriedades únicas demonstram aplicabilidade em vários setores industriais, como o de alimentos e saúde (SILVA, 2020).

Em seu estudo, Leonarski (2020) identificou a presença de bactérias ácido acéticas (*K. rhaeticus*, *K. xylinus* e *K. hansenii*, *R. xylanophilus* e *S. griseus*) no inóculo utilizado para preparação da kombucha. A predominância da família *Acetobactéria*, em particular a espécie *K. rhaeticus* (99,83%), *K. hansenii* (0,13%) e *K. xylinus* (0,04%) foi observado na composição microbiológica do inóculo utilizado.

Blauth (2019), relata que as bactérias mais abundantes no SCOBY são as do gênero *Acetobacter* e *Gluconobacter*. E de acordo com Dutta *et al.*, (2019) as principais bactérias identificadas tradicionalmente no SCOBY são *Acetobacter xylinoides*, *Komagataeibacter xylinus*, *Gluconacetobacter xylinus*, *Acetobacter aceti* e *Acetobacter pasteurianus*. Sendo a *Gluconacetobacter xylinus* a principal responsável pela síntese da matriz de celulose que acomoda a microbiota da kombucha, promovendo a associação entre bactérias e leveduras (SANTOS, 2016).

5.2.4. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A fim de analisar os principais grupos funcionais presentes, os espectros de FTIR estão apresentados na figura 15, para membranas de diferentes concentrações (CB_{25,0}; CB_{37,5} e CB_{50,0}) e os valores e grupos funcionais estão dispostos na tabela 9:

Figura 15 - Espectros de FTIR obtidos para as membranas de acordo com cada concentração

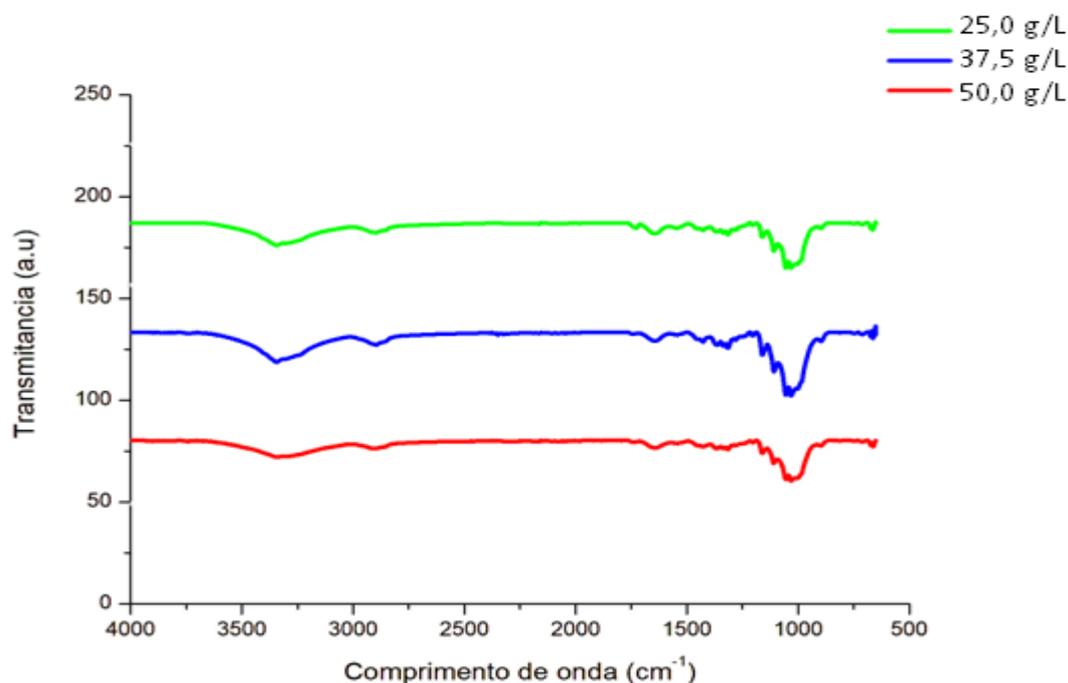


Tabela 9 - Atribuições dos grupos funcionais presentes nas amostras de CB

Atribuições	CB _{LIT}	CB _{25,0}	CB _{37,5}	CB _{50,0}	Referências
Estiramento O-H	3344	3344	3344	3342	(RICCI <i>et al.</i> , 2015)
Estiramento C-H e CH ₂	2896	2896	2895	2896	(PECORARO <i>et al.</i> , 2007)
C=C					
Deformação angular H ₂ O	1641	1637	1646	1645	(BARUD, 2010; GINDRI <i>et al.</i> , 2020)
COO-	1427		1427		(GINDRI <i>et al.</i> , 2020; SCHULZ; BARANSKA, 2007)
Deformação simétrica fora do plano CH ₂	1315	1314	1314	1315	(KAČURÁKOVÁ <i>et al.</i> , 2002)
Estiramento C-O	1161	1161	1160	1160	(PECORARO <i>et al.</i> , 2007)
Estiramento C-O e C-C	1109	1108	1108	1108	(KAČURÁKOVÁ <i>et al.</i> , 2002)
Estiramento C-O e C-C	1055	1055	1055	1055	(KAČURÁKOVÁ <i>et al.</i> , 2002)
Estiramento C-O	1032	1031	1031	1031	(BORGES <i>et al.</i> , 2015; FALCÃO; ARAÚJO, 2013)
Deformação angular O-H	664	664	663	663	(BARUD, 2010)

Em todas as amostras analisadas observa-se valores próximos para cada grupo funcional, confirmando que se trata do mesmo polímero, e notar a semelhança dos grupos funcionais e seus valores ao comparado com a literatura (CB_{LIT}).

Em todas as três amostras nota-se bandas com alta intensidade próximos a 3344 cm⁻¹, semelhante a celulose bacteriana da literatura. Esse estiramento axial pode ser atribuído aos grupos hidroxila, característicos de compostos orgânicos (RICCI *et al.*, 2015; SILVA, 2018). Aproximadamente em 2895 cm⁻¹ foi observado o pico, referente às vibrações de estiramento C-H e CH₂. O pico referente ao estiramento da dupla ligação entre carbonos (C=C) e a deformação angular da água foi observado aproximadamente em 1640 cm⁻¹. Em 1427 cm⁻¹ foi observado o pico, somente na amostra CB_{37,5}, referente a presença do grupo COO. No intervalo entre 1314 - 663 cm⁻¹ observa-se a deformação simétrica fora do plano do grupo CH₂, o estiramento das ligações entre C-O e C-C, além da deformação angular do grupo O-H.

Realizando a comparação dos valores obtidos das CBs de diferentes concentrações com a CB da literatura (CB_{LIT}) é possível afirmar que o material produzido a partir do consórcio é o mesmo ao comparado com a CB obtida a partir da cepa pura. Porém conforme mencionado anteriormente, a CB a partir do consórcio microbiano se torna mais vantajosa devido aos menores custos envolvidos e o menor controle de processo necessário.

5.2.5. Análise termogravimétrica (TGA)

Na figura 16 estão apresentadas as curvas termogravimétricas (curvas TG) e a primeira derivada das curvas TG (DTG) para as amostras de CB de diferentes concentrações de sacarose (25,0; 37,5 e 50,0 g/L). Os dados obtidos das curvas TG e DTG (perda de massa (%), temperatura máxima de degradação (T_{máx}) e percentual de resíduo) estão relacionados na tabela 10:

Figura 16 - Curvas de análise termogravimétrica (TG), obtidas por TGA, para as diferentes amostras de CB

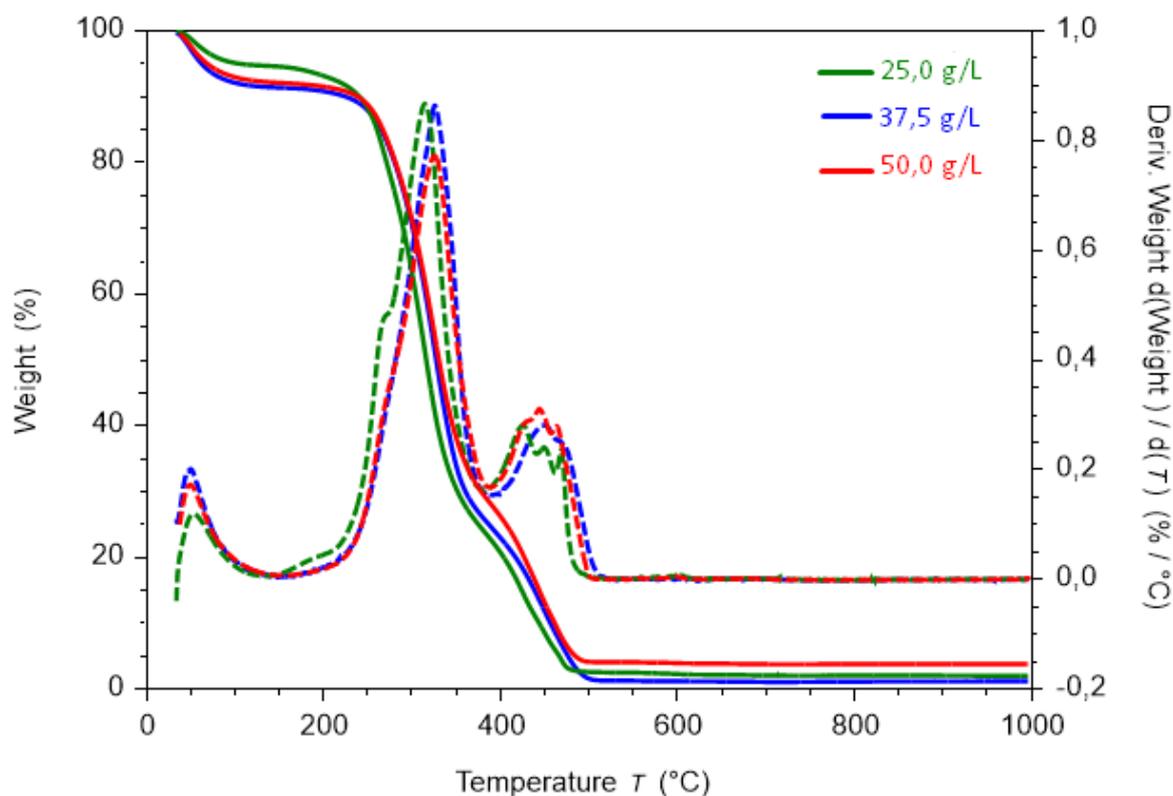


Tabela 10 - Eventos térmicos das amostras obtidos a partir das curvas TG/DTG

Amostra	M ₁ (%)	T _{máx₁} (°C)	M ₂ (%)	T _{máx₂} (°C)	M ₃ (%)	T _{máx₃} (°C)
25,0 g/L	5,25	54	70,62	314	21,51	426
37,5 g/L	8,57	50	67,11	325	22,99	452
50,0 g/L	7,90	50	63,88	325	24,07	446

No primeiro estágio a perda está associada a desidratação da celulose (evaporação da água). O alto teor de perda de água está ligado a hidrofiliabilidade (adsorção de água) da celulose (LIMA *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2018). A temperatura nesse primeiro estágio para as CB_{37,5} e CB_{50,0} foi de 50 °C enquanto a CB_{25,0} apresentou maior temperatura de degradação (54 °C). O percentual de perda de massa da CB_{25,0} foi menor ao comparado com as outras CBs. Nesse estágio a CB_{25,0} apresentou maior estabilidade térmica.

No estágio onde ocorre a perda relacionada ao processo de despolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas da celulose (LIMA *et al.*, 2015) –

2º estágio – nota-se que as CB_{37,5} e CB_{50,0} tiveram comportamentos semelhantes: a temperatura de degradação dessas duas amostras foi de 325 °C e a perda de massa foi 67,11 e 63,88%, respectivamente. A CB_{25,0} apresentou menor temperatura de degradação (314 °C), ao comparado com as outras amostras, além do percentual de perda de massa ter sido maior nesse estágio (70,62%).

No terceiro estágio houve a degradação dos resíduos carbonáceos (LIMA, *et al.*, 2015). É possível notar que a CB_{37,5} apresentou maior valor de temperatura de degradação (452 °C), enquanto a temperatura da CB_{50,0} foi 446 °C e 426 °C a T_{máx3} da CB_{25,0}.

Considerando que o intervalo de temperatura máxima de degradação térmica da CB é 300 – 500 °C (WONG *et al.*, 2009), é possível concluir que as CBs a partir do consórcio possuem maior temperatura de degradação e conseqüentemente são mais estáveis termicamente.

6. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos é possível concluir que as características físico-químicas da CB a partir do consórcio microbiano são iguais as características da CB de cepa pura, porém a CB a partir do consórcio apresenta maior estabilidade térmica, tornando-a mais interessante para aplicações que exigem temperaturas mais elevadas. Ao considerar a fonte de nitrogênio, o chá preto contribuiu mais para o crescimento da membrana formada a partir dele.

As diferentes concentrações de sacarose analisadas (25,0; 37,5 e 50,0 g/L) no substrato a partir do chá preto, ao final do processo fermentativo (9 dias) não tiveram diferenças significativas no valor da massa final de CB. Portanto, considerado o período de 9 dias, o substrato com menor concentração (25,0 g/L) mostrou-se eficaz na formação da membrana, assim como os substratos com concentrações maiores (37,5 e 50,0 g/L). Porém o substrato com concentração de 50,0 g/L de açúcar apresentou maior velocidade inicial de formação, o que torna interessante a utilização dessa concentração para processos em que o tempo de fermentação deve ser reduzido.

Com o estudo do consumo de concentração de açúcar foi possível concluir que independente da concentração do meio, há o consumo do açúcar presente no substrato e que nos 6 primeiros dias o meio com 37,5 g/L de sacarose apresentou maior consumo, mas esse consumo não foi determinante para a massa obtida nesse período. O percentual de consumo final foi maior no meio com concentração de 25,0 g/L.

A presença das espécies bacteriológicas *Komagataeibacter intermedius*, *Komagataeibacter rhaeticus* e *Gluconobacter kanchanaburiensis* na CB formada a partir do chá preto confirmou a qualidade da celulose bacteriana e sua composição.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, J. D. P. **Obtenção de celulose bacteriana aditivada com extrato de propólis para aplicação em cosméticos**. 2020. 108 f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciência dos Materiais) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- AVCIOGLU, Nermin Hande et al. Optimization and physicochemical characterization of enhanced microbial cellulose production with a new Kombucha consortium. **Process Biochemistry**, v. 108, p. 60-68, 2021. DOI: 10.1016/j.procbio.2021.06.005.
- BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Res. Int*, Amsterdam, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002
- BLAUTH, C. M. Kombucha: tecnologia e produção. 2019. 53 f. **Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (Bacharelado em Nutrição)** – Bacharel, [S.I], 2019.
- CAMARGO, M. S. A. Avaliação da degradação de celulose bacteriana após exposição em diferentes meios abióticos e bióticos. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade da Região de Joinville. 177 p.: il.; 30 cm. 2018. Disponível em: https://www.univille.edu.br/account/mep/VirtualDisk.html/downloadDirect/1399307/Dissertacao-Michely_S_A_Camargo.pdf.
- CHAKRAVORTY, S.; BHATTACHARYA, S.; BHATTACHARYA, D.; SARKAR, S.; GACHHUI, R. Kombucha: A Promising Functional Beverage Prepared From Tea. **Non-alcoholic Beverages**, v. 6, p.285-327, 2019.
- CHEN, X. **Degradation studies on plant cellulose and bacterial cellulose by FTIR and ESEM**. 2014. 59f. Dissertação (Mestrado) - University Birmingham. 2014
- Costa, A. F. S., Almeida, F. C. G., Vinhas, G. M., & Sarubbo, L. A. (2017). Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using corn steep liquor as nutrient sources. *Frontiers in Microbiology*.
- CHAKRAVORTY, S.; BHATTACHARYA, S.; CHATZINOTAS, A.; CHAKRABORTY, W.; BHATTACHARYA, D.; GACHHUI, R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 220, p.63-72, mar. 2016.
- COSTA, Andrea F. S. et al. Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* Using Corn Steep Liquor As Nutrient Sources. *Frontiers In Microbiology*, v. 8, p. 1-12, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02027.
- COSTA, Pedro Zöhner Rodrigues da; BIZ, Pedro. Cultivando materiais: o uso da celulose bacteriana no design de produtos. In: SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESIGN DA

- ESDI, 3., 2017, Rio de Janeiro. **Anais eletrônicos** [...]. Rio de Janeiro: ESDI, 2017.
- COTON, M.; PAWTOWSKI, A.; TAMINIAU, B.; BURGAUD, G.; DENIEL, F.; LABARTHE, L. C.; FALL, A.; DAUBE, G.; COTON, E. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. **Fems Microbiology Ecology**, [s.l.], v. 93, n. 5, 18 abr. 2017. Oxford University Press (OUP)
- Dima, S.-O., Panaitescu, D.-M., Orban, C., Ghiurea, M., Doncea, S.-M., Fierascu, R., Nistor, C., Alexandrescu, E., Nicolae, C.-A., Trică, B., Moraru, A., & Oancea, F. (2017). Bacterial nanocellulose from side-streams of kombucha beverages production: Preparation and physical-chemical properties. *Polymers*, 9(8), 5–10. <https://doi.org/10.3390/polym9080374>.
- DONINI, Í.A.N.; SALVI, D.T.B; FUKUMOTO, F.K.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S.; MARCHETTO, R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Biossintese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana, *Eclética Química*, v. 35, n. 4, pp. 165–178, 2010.
- DUARTE, E. B.; ANDRADE, F. K.; LIMA, H. L. S.; NASCIMENTO, E. S.; CARNEIRO, M. J. M.; BORGES, M. F.; LUZ, E. P. C. G.; CHAGAS, B. S.; ROSA, M. F. *Celulose Bacteriana: Propriedades, Meios Fermentativos e Aplicações*. 2019. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 2179-8184;186.
- DUTTA, H.; PAUL, S. K. *Kombucha Drink: Production, Quality, and Safety Aspects. Production And Management Of Beverages*, [s.l.], p.259-288, 2019. Elsevier.
- EL-SALAM, S. S. A. Bacterial Cellulose of Kombucha Mushroom Tea. **New York Science Journal**, [s. l.], 2012, ed. 4, p. 1-7.
- Emiljanowicz, K. E., & Malinowska-Pańczyk, E. (2020). Kombucha from al-ternative raw materials – The review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(19), 3185–3194. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1679714>
- FERREIRA, G. Os benefícios da kombucha na sociedade moderna: uma revisão da literatura. 2022.
- GOH, W. N. et al. Fermentation of black tea broth (kombucha): I. effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose. *International Food Research Journal*, v. 19, n. 1, p. 109–117, 2012.
- GÜNDÜZ, Gökhan; AŞĐK, Nejla. Production and Characterization of Bacterial Cellulose with Different Nutrient Source and Surface–Volume Ratios. **Drvna Industrija**, v. 69, n. 2, p. 141-148, 2018. DOI: 10.5552/drind.2018.1744. Disponível em: <https://hrcak.srce.hr/202897>.
- HASSAN, E. A.; ABDELHADY, H. M.; EL-SALAM, S. S. A.; ABDULLAH, S. M. The characterization of bacterial cellulose produced by *Acetobacter xylinum* and

Komagataeibacter saccharovorans under optimized fermentation conditions. **British Microbiology Research Journal**, Gurgaon, v. 9, n. 3, p. 1-13, 2015

HUANG, Y.; ZHU, C.; YANG, J.; NIE, Y.; CHEN, C.; SUN, D. Recent advances in bacterial Cellulose. *Cellulose*, Houten, v. 21, p. 1-30, 2014.

JAYABALAN R.; MALBASA R. V.; LONCAR E.S.; VITAS, J. S.; SATHISHKUMAR, M. 2014. A Review on Kombucha Tea – Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4): 538-50.

JOZALA, A. F.; NOVAES, L. C. L.; LOPES, A. M.; EBINUMA, V. C. S.; MAZZOLA, P. G.; JR, A. P.; GROTTTO, D.; GERENUTTI, M.; CHAUD, M. V. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 100, n. 5, p.2063-2072, 8 jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC.

KALIFAWI et al – Factors Influence on the yield of Bacteria Cellulose of Kombucha (Khubdat Humza)

KALLEL, L. et al. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International*, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 226-232, 2012.

KAUFMANN, K. Kombucha Rediscovered: The medicinal benefits of an ancient healing tea. Books Alive, 2013, Tennessee, EUA. ISBN: 9780920470763.

KBI (Kombucha Brewers International) PUBLIC MAGAZINES: SYMBIOSIS MAGAZINE – SUMMER 2020.

KESH, S. M. A. S. (2014). Vitamin C enhances bacterial cellulose production in *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**; 99: 98-100.

LEE, K. Y.; BULDUM, G.; MANTALARIS, A.; BISMARCK, A. More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. **Macromolecular Bioscience**, Weinheim, v. 14, n. 1, p. 10-32, 2014.

LEONARSKI, E., CESCO, K., Borges, O. M. A., de OLIVEIRA, D., POLETTO, P. (2021). Typical kombucha fermentation: Kinetic evaluation of beverage and morphological characterization of bacterial cellulose. *Journal of Food Processing and Preservation*, 00, e16100. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16100>

LIMA, Helder L. et al. Celulose bacteriana obtida por diferentes fontes agroindustriais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 13., 2015, Natal. **Anais eletrônicos** [...].

Disponível

em:

<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1028239/1/13cbpol345541432812929.pdf>.

MANHANI, T. M.; CAMPOS, M. V. M.; DONATI, F. P.; MORENO, A. D. H. Sacarose, Suas Propriedades e os Novos Edulcorantes. *Revista Brasileira Multidisciplinar*, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 113-125, 2014. DOI: 10.25061/2527-2675/ReBraM/2014.v17i1.12. Disponível em: <https://revistarebram.com/index.php/revistauniara/article/view/12>.

MARSH, A. J.; SULLIVAN, O.; HILL, C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, [s.l.], v. 38, p.171-178, abr. 2014.

MAY, A.; NARAYANAN, S.; ALCOCK, J.; VARSANI, A.; MALEY, C.; AKTIPIS, A. Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. **Peerj**, [s.l.], v. 7, p:7e7565, 3 set. 2019.

MARTINI, G. V. Perspectivas de reaproveitamento de celulose bacteriana de kombucha por hidrólise enzimática para obtenção de açúcares. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

MILLER, G. L. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, VOL. 31, NO. 3, p.426-428.

MOLINA-RAMÍREZ, Carlos et al. Physical Characterization of Bacterial Cellulose Produced by *Komagataeibacter medellinensis* Using Food Supply Chain Waste and Agricultural By-Products as Alternative Low-Cost Feedstocks. **Journal Of Polymers And The Environment**, v. 26, n. 2, p. 830-837, 2017. DOI: 10.1007/s10924-017-0993-6. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/315650137_Physical_Characterization_of_Bacterial_Cellulose_Produced_by_Komagataeibacter_medellinensis_Using_Food_Supply_Chain_Waste_and_Agricultural_By-Products_as_Alternative_Low-Cost_Feedstocks.

PALUDO, N. *Desenvolvimento e caracterização de kombucha obtida a partir de chá verde e extrato de erva-mate*: processo artesanal e escala laboratorial. Porto Alegre, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

PERTILE, R.A.N. **Estudo in vitro da interação da linhagem de fibroblastos L929 com membrana de celulose bacteriana para aplicações em engenharia de tecidos**. 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2007.

PHISALAPHONG, M.; JATAPAIBOON, N. (2008). Biosynthesis and characterization of bacterial cellulose-chitosan film. **Carbohydrate Polymers**; 74:482-488.

PURE, A. E.; PURE, M. E. Antioxidant and antibacterial activity of kombucha beverages prepared using banana peel, common nettles and black tea infusions. *Applied Food Biotechnology*, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 125-130, 2016.

PUTRA, A.; KAKUGO, A.; FURUKAWA, H.; GONG, J. P.; OSADA, Y. (2008). Tubular bacterial cellulose gel with oriented fibrils on the curved surface. *Polymer*; 49:1885-1991.

RECOUVREUX, D. O. S. **Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos**. 2008. 145p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

REZAEI, A.; DERAYAT, J.; GODINI, H.; POURTAHUI, G. Adsorption of Mercury from synthetic solutions by a *Acetobacter xylinum* biofilm. **Res. J. Environ. Sci.**, 2: 401-407 – 2008.

SANTOS, M. J. Kombucha: Caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração. **Dissertação: FCT**, 2016.

SILVA, T. R. S. **Desenvolvimento de hidrogéis de celulose bacteriana para cultura de células e permeação de biomoléculas**. 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

COSTA, J. F. C.; GARCIA, M. C.; APATI, G. P.; BARUD, H.S.; SCHNEIDER, A. L. S.; PEZZIN, A. P. T. **Nanocristais de celulose bacteriana**: da obtenção, sob diferentes condições de hidrólise, à incorporação como reforço em poli(L-ácido láctico). 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade da Região de Joinville, Santa Catarina. *Revista Matéria (Rio de J.)*: 2017 Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1517-707620170005.0253>>.

SHODA, M., SUGANO, Y. Recent advances in bacterial cellulose production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. 2005. Yokohama, Japan. Chemical Resources Laboratory. 2005.

WONG, S.S., KASAPIS, S., TAN, Y. **Carbohydrate Polymers**, 2009, 77, 280-287

ZHIJUN, S.; YUE, Z.; GUYON, O. P.; GUANG, Y. Utilization of bacterial cellulose in food. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 35, p. 539-545, 2014.

<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1109174/1/DOC19001.pdf>

