

**UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL**

Tatiana Kohatsu Mendes de Carvalho

**BIOPOLÍMERO À BASE DE CELULOSE BACTERIANA PARA
PRESERVAÇÃO DE ALIMENTOS IN NATURA**

Araraquara, SP
2025

Tatiana Kohatsu Mendes de Carvalho

**BIOPOLÍMERO À BASE DE CELULOSE BACTERIANA PARA
PRESERVAÇÃO DE ALIMENTOS IN NATURA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Wilton Rogério Lustrí

Co-Orientadora: Prof. Dra. Silmara Lazarini Frajácómo

Araraquara, SP

2025

FICHA CATALOGRÁFICA

C329b Carvalho, Tatiana Kohatsu Mendes de
Biopolímero à base de celulose bacteriana para preservação de
alimentos in natura/Tatiana Kohatsu Mendes de Carvalho. –
Araraquara: Universidade de Araraquara, 2025.
40f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química medicinal –
UNIARA

Orientador: Prof. Dr. Wilton Rogério Lustrí

1. Embalagem ativa. 2. Celulose bacteriana. 3. Extratos vegetais.
4. Atividade antimicrobiana. 5. Conservação de alimentos. I. Título.


CDU 60

TATIANA KOHATSU MENDES DE CARVALHO

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 14 de fevereiro de 2025.

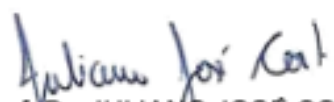
BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 WILTON ROGÉRIO LUSTRI
Data: 25/02/2025 17:33:08-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Prof. Dr. WILTON ROGÉRIO LUSTRI (Orientador)
Universidade de Araraquara – UNIARA

Documento assinado digitalmente
 EDSON CAVALCANTI DA SILVA FILHO
Data: 17/02/2025 11:08:44-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Prof. Dr. EDSON CAVALCANTI DA SILVA FILHO
Universidade Federal do Piauí - UFPI


Prof. Dr. JULIANO JOSÉ CORBI
Escola de Engenharia de São Carlos – UFSCar

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças ao apoio, à orientação e à colaboração de muitas pessoas e instituições, às quais expresso minha mais profunda gratidão.

Ao Laboratório CBQUIM e a todos os colegas e responsáveis que me acolheram e contribuíram com seu apoio técnico, companheirismo e dedicação. Sou grata pela infraestrutura disponibilizada, pelos materiais fornecidos e pelo ambiente propício à pesquisa, que foram fundamentais para o desenvolvimento desta dissertação.

A todos os professores e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA, pela excelência na formação acadêmica, pelo comprometimento com o ensino e pela contribuição valiosa em minha trajetória científica.

Aos membros da banca examinadora, pelo tempo dedicado, pelas contribuições criteriosas e pelo olhar atento, que enriqueceram esta dissertação com reflexões e sugestões relevantes.

Às instituições de fomento CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro que viabilizou as etapas deste trabalho.

À Universidade de Araraquara (UNIARA), pela formação acadêmica, pela qualidade do ensino e pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal ao longo de toda a minha trajetória.

À minha família, pelo amor incondicional, pelo incentivo nos momentos difíceis e por sempre acreditarem nos meus sonhos, mesmo quando pareciam distantes. Sem esse suporte, nada disso seria possível.

Aos meus amigos, pelo companheirismo, pelas palavras de apoio e por estarem sempre presentes, oferecendo ânimo, conselhos e, muitas vezes, também boas risadas que aliviaram a caminhada.

E, de forma muito especial, ao meu orientador, o Professor Dr. Wilton Rogério Lustri, que esteve presente em todas as etapas da minha formação — no ensino médio, na graduação e agora na pós-graduação. Sua orientação firme, seu exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa, e sua confiança no meu trabalho foram essenciais para que este projeto se concretizasse. Sou imensamente grata por ter tido a oportunidade de trilhar este caminho com o seu apoio.

A todos, o meu muito obrigada.

"Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma."

(LAVOISIER, 1789)

Resumo:

A indústria de embalagens está em constante evolução, buscando soluções que transcendem a simples proteção e transporte dos produtos. As embalagens ativas destacam-se como alternativas inovadoras, que permitem a incorporação de substâncias antimicrobianas, antioxidantes e absorventes de gases, oferecendo maior proteção e redução dos riscos de contaminação prolongando sua vida útil especialmente dos alimentos in natura. Neste estudo, investigou-se o uso da celulose bacteriana (CB), produzida por bactérias *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769, como possível utilidade como embalagem ativa. A CB foi caracterizada quanto à sua capacidade de intumescimento com extratos bioativos. Foram obtidos e testados 16 extratos vegetais a partir do alecrim, alho, barbatimão, canela em pó e pau, cominho em semente e pó, cravo em flor e pó, cúrcuma, feno-grego, louro em folhas e pó, noz-moscada, orégano e pimenta calabresa, utilizando os métodos de maceração e decocção. A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada por difusão em discos, sobre *Bacillus cereus* ATCC 14579 e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028. Os extratos de alecrim, barbatimão, canela (pó), cravo (flor e pó) e orégano demonstraram capacidade de inibição na concentração de 0,1 g/mL. As membranas de CB foram incorporadas com esses extratos na concentração de 0,25 g/mL para o teste de funcionalidade de embalagem ativa. No teste de atividade inibitória de crescimento, por contato, uvas contaminadas previamente utilizando uma mistura bacteriana, na escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) composta por *S. enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14025, *B. subtilis* ATCC 19659, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, foram embaladas nas membranas de CB incorporadas com os extratos e, após sete dias de armazenamento, observou-se completa inibição do crescimento bacteriano nas amostras testadas, enquanto o grupo controle (uvas contaminadas embaladas em membranas de CB sem incorporação dos extratos) apresentou crescimento bacteriano. Não foram detectadas alterações no pH das frutas, sugerindo compatibilidade das membranas de CB incorporadas com extratos vegetais para alimentos in natura. Os resultados obtidos destacam o potencial da CB incorporada com extratos vegetais como uma solução sustentável e eficaz para o desenvolvimento de embalagens ativas.

Palavras-chave: Embalagem ativa, celulose bacteriana, extratos vegetais, atividade antimicrobiana, conservação de alimentos.

Abstract:

The packaging industry is in constant evolution, seeking solutions that go beyond mere protection and transportation of products. Active packaging has emerged as an innovative alternative, allowing the incorporation of antimicrobial, antioxidant, and gas-absorbing substances, thereby providing enhanced protection and reducing contamination risks—particularly by extending the shelf life of fresh produce. In this study, bacterial cellulose (BC), produced by *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769, was investigated for its potential application as an active packaging material. BC was characterized for its swelling capacity with bioactive extracts. Sixteen plant extracts were obtained and tested using maceration and decoction methods, from rosemary, garlic, *barbatimão*, cinnamon (ground and stick), cumin (seed and powder), clove (flower and powder), turmeric, fenugreek, bay leaf (whole and ground), nutmeg, oregano, and red pepper flakes. The antimicrobial activity of the extracts was evaluated using the disk diffusion method against *Bacillus cereus* ATCC 14579 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028. Extracts of rosemary, *barbatimão*, cinnamon (powder), clove (flower and powder), and oregano exhibited inhibitory activity at a concentration of 0.1 g/mL. BC membranes were then incorporated with these extracts at a concentration of 0.25 g/mL for functional active packaging testing. In the contact inhibition assay, grapes previously contaminated with a bacterial mixture adjusted to 0.5 McFarland standard (1.5×10^8 CFU/mL)—comprising *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 14025, *Bacillus subtilis* ATCC 19659, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883—were wrapped in BC membranes containing the extracts. After seven days of storage, complete bacterial growth inhibition was observed in the treated samples, while the control group (contaminated grapes wrapped in BC membranes without extract incorporation) showed bacterial growth. No changes in fruit pH were detected, suggesting the compatibility of BC membranes incorporated with plant extracts for use with fresh produce. These findings highlight the potential of BC incorporated with plant extracts as a sustainable and effective solution for the development of active packaging.

Keywords: Active packaging, bacterial cellulose, plant extracts, antimicrobial activity, food preservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção e processamento das membranas de CB.....	14
Figura 2. Processamento dos extratos vegetais.....	16
Figura 3. Difusão em discos.....	17
Figura 4. Teste de atividade antimicrobiana por contato.....	19
Figura 5. Aspecto macroscópico das membranas de CB produzidas, em quadruplicata, por <i>K. hansenii</i> ATCC 23769.....	20
Figura 6. Teste de atividade inibitória de crescimento dos extratos de (1) alecrim, (2) alho, (3) barbatimão, (4) canela em pó – Painel A – <i>B. cereus</i> ; Painel B – <i>S. enterica</i>	22
Figura 7. Teste de atividade inibitória de crescimento dos extratos de (5) canela em pau, (6) cominho semente, (7) cominho em pó, (8) cravo em flor – Painel A – <i>B. cereus</i> ; Painel B – <i>S. enterica</i>	24
Figura 8. Teste de atividade inibitória de crescimento dos extratos de (9) cravo em pó, (10) cúrcuma, (11) feno grego, (12) louro em folhas – Painel A – <i>B. cereus</i> ; Painel B – <i>S. enterica</i>	25
Figura 9. Teste de atividade inibitória de crescimento dos extratos de (13) louro pó, (14) noz moscada, (15) orégano, (16) pimenta calabresa – Painel A – <i>B. cereus</i> ; Painel B – <i>S. enterica</i>	26
Figura 10. Resultados de testes de redução de contaminação das uvas embaladas com CB controle e impregnadas com alecrim e barbatimão.....	27
Figura 11. Demonstração das uvas embaladas com a CB usada como controle (A) e a CB incorporada com o extrato vegetal de alecrim (B).....	29
Figura 12. Resultados de testes de redução de contaminação das uvas embaladas com CB controle e impregnadas com alecrim e barbatimão.....	30
Figura 13. Resultados de testes de redução de contaminação das uvas embaladas com CB impregnadas com canela em pó, cravo em pó, cravo flor e orégano.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos bioativos, com atividade antimicrobiana, dos extratos.....	11
Tabela 2: Valores do intumescimento obtidos	22
Tabela 3: A quantidade de extratos obtidos após as etapas descritas no item 3.2.4.	23
Tabela 4: Medida dos halos de inibição ao redor dos discos de papel filtro incorporados com (1) alecrim, (2) alho, (3) barbatimão, (4) canela pó nas cepas de <i>B. cereus</i> e <i>S. enterica</i>	25
Tabela 5: Medida dos halos de inibição ao redor dos discos de papel filtro incorporados com (5) canela pau, (6) Cominho semente, (7) Cominho pó, (8) cravo flor, nas cepas de <i>B. cereus</i> e <i>S. enterica</i>	25
Tabela 6: Medida dos halos de inibição ao redor dos discos de papel filtro incorporados com (9) Cravo pó, (10) Cúrcuma, (11) feno grego, (12) louro folhas nas cepas de <i>B. cereus</i> e <i>S. enterica</i>	26
Tabela 7: Medida dos halos de inibição ao redor dos discos de papel filtro incorporados com (13) louro pó, (14) Noz moscada, (15) Orégano, (16) pimenta calabresa nas cepas de <i>B. cereus</i> e <i>S. enterica</i>	27

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI	Meio Infusão - Cérebro - Coração
B.O.D.	Biochemical Oxygen Demand
CB	Celulose bacteriana
C	Massa da fonte de carbono
FRU	Meio frutose
M ₀	Massa seca da membrana
MS1	Meio sintético 1
MS2	Meio sintético 2
M _u	Massa úmida da membrana

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:.....	9
1.1. Aspectos gerais	9
1.2. CB como material para embalagens de alimentos	9
1.3. Extratos vegetais como conservantes naturais.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1. Materiais	13
3.1.1. Reagentes utilizados na preparação dos meios de cultivo para produção de CB.....	13
3.1.2. Extratos vegetais	13
3.2 Métodos	13
3.2.1. Produção e processamento das membranas de CB	13
3.2.2. Análise do rendimento em massa seca das membranas de CB	14
3.2.3. Estudo de intumescimento	15
3.2.4. Obtenção e processamento dos extratos vegetais	15
3.2.6. Teste de atividade antibacteriana dos extratos, por difusão em discos	16
3.2.7. Teste de atividade antimicrobiana por contato.....	18
3.2.8. Testes de redução de contaminação de uvas embaladas em CB impregnadas com os extratos.....	19
3.2.9. Análise das características físico – químicas das uvas embaladas com CB incorporadas com os extratos vegetais.....	20
4. RESULTADOS	22
4.1. Produção das membranas de CB	22
.....	22
4.2. Análise do rendimento em massa seca e determinação da relação volume/área de intumescimento das membranas de CB	22
4.3. Obtenção dos extratos vegetais	23
4.4. Resultados de teste de atividade antimicrobiana por difusão em discos	24

4.5. Resultados de teste de atividade antimicrobiana por teste de contato com as CB incorporadas com os extratos que apresentaram atividade inibitória de crescimento bacteriano no teste de difusão em discos.....	28
4.6. Resultados de testes de redução de contaminação em alimentos in natura (uvas) embaladas com CB incorporada com os extratos vegetais	28
4.7. Análise de características físico-químicas das uvas embaladas com CB incorporadas com extratos vegetais.....	30
5. CONCLUSÕES.....	32
6. PERSPECTIVAS.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

1.1. Aspectos gerais

A embalagem ativa tem se mostrado uma abordagem inovadora e promissora na indústria de embalagens. Diferente das embalagens tradicionais, que tem a função principal de proteger o produto e facilitar o transporte, as embalagens ativas desempenham um papel mais dinâmico, interagindo diretamente com o conteúdo embalado (BRAGA; SILVA, 2017), controlando e regulando as condições ambientais em seu interior, como temperatura e níveis de oxigênio, onde a manutenção das condições ideais de armazenamento pode prolongar significativamente sua vida útil e preservar a qualidade (MIGUEL, 2023). Além disso, as embalagens ativas também podem incorporar propriedades antimicrobianas, antioxidantes e absorvente de gases, fornecendo uma proteção adicional (BHARDWAJ; ALAM; TALWAR, 2019). A celulose bacteriana (CB) é um biopolímero produzido por diferentes microrganismos, especialmente por bactérias do gênero *Komagataeibacter*, com ênfase na espécie *K. hansenii*. Sua síntese ocorre em diversos meios de cultivo, tanto naturais quanto sintéticos, a partir de distintas fontes de carbono. (DUARTE *et al.*, 2019; LAZARINI *et al.*, 2018). A CB tem a mesma estrutura da celulose vegetal, porém é isenta de outros biopolímeros como a pectina, lignina e hemicelulose. Possui características únicas que a tornam adequadas para aplicações em diversos setores industriais, como biomateriais, eletrônicos, alimentos e têxteis (ALBUQUERQUE, 2019).

1.2. CB como material para embalagens de alimentos

Ao longo dos anos, o desenvolvimento de novas embalagens para alimentos, utilizando materiais ecológicos vem despertando o interesse de muitos pesquisadores devido à sua facilidade de desenvolvimento e um papel eficaz como material de embalagem de alimentos sustentável (JANG *et al.*, 2023). Nesta abordagem, a CB tem despertado um interesse crescente na indústria de embalagens, devido às suas propriedades únicas e sustentáveis, , como elevada pureza, elevada resistência mecânica, biocompatibilidade e biodegradabilidade (NASCIMENTO, 2022) permitindo a incorporação de diversos materiais, tais como conservantes naturais (por exemplo, óleos essenciais, extratos vegetais e especiarias), além de aditivos alimentares, para aumentar a vida útil e melhorar as propriedades antimicrobianas e antioxidantes. (JANG *et al.*, 2023). Uma das principais vantagens da CB, como material de embalagem, é a sua alta

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

resistência mecânica, flexibilidade e capacidade de retenção de água, o que a torna uma barreira eficaz, auxiliando na preservação da qualidade e da vida útil dos alimentos embalados (MACHADO, 2022). Essas propriedades tornam a CB uma opção interessante para embalar produtos frescos, como frutas, vegetais e carnes (PINTO, 2020). Outra vantagem da CB é a sua capacidade de moldagem, em diferentes formas e tamanhos, o que permite a produção de embalagens customizadas para diferentes produtos, adaptando-se às necessidades específicas de cada alimento (ENGEL, 2022). Uma abordagem promissora para utilização de extratos vegetais na conservação de alimentos é a sua incorporação em biopolímeros biodegradáveis, não tóxicos e seguros para o contato com alimentos, tornando-os uma alternativa sustentável (SUTIL, 2023), como é o caso da CB.

1.3. Extratos vegetais como conservantes naturais

Há um interesse crescente na utilização de extratos vegetais como agentes conservantes naturais. Esses extratos são ricos em compostos bioativos como polifenóis, flavonoides e carotenoides, que apresentam propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias. Essas propriedades fazem dos extratos vegetais uma opção atraente para substituir aditivos sintéticos na indústria alimentícia (MARTELLI *et al.*, 2021). Estudos relatam atividade antibacteriana de extratos vegetais sobre várias espécies de microrganismos (OLVERA-AGUIRRE *et al.*, 2023; ZHU *et al.*, 2019). Dentre esses extratos, podem ser citados os óleos essenciais de especiarias (ZHU *et al.*, 2019), óleo essencial de orégano (ADRIANE *et al.*, 2023; LASTRA-VARGAS *et al.*, 2023), e extratos de broto de cravo, raiz de gengibre e de alho, com ação sobre bactérias patogênicas de alimentos (SINGH *et al.*, 2023). A Tabela 1 apresenta os compostos bioativos, com atividade antimicrobiana, dos extratos.

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

Tabela 1. Compostos bioativos, com atividade antimicrobiana, dos extratos

EXTRATOS	COMPOSTOS BIOATIVOS ANTIMICROBIANOS	REFERÊNCIAS
ALECRIM	ácido rosmarínico, carnosol e ácido carnósico	AMARAL et al., 2021
ALHO	alicina	OLIVEIRA; CAVALCANTE; RIBEIRO, 2021
BARBATIMÃO	taninos	FERNANDES, 2020
CANELA	cinamaldeído e eugenol	ALVES, 2023
COMINHO	cuminaldeído e o timol	FERREIRA; ZANCHETTIN; BINHARA, 2021
CRAVO	eugenol	SANTANA et al., 2021
CÚRCUMA	curcumina	SCHMIDT, 2022
FENO-GREGO	alcaloides e saponinas	LIMA SOUZA, 2022
LOURO	cineol e eugenol	REIS, 2023
NOZ MOSCADA	miristicina e elemicina	HÜTHER et al., 2023
ORÉGANO	carvacrol e timol	GOMES, 2022
PIMENTA CALABRESA	capsaicina	COLCENTI, 2023

Diante das propriedades benéficas das embalagens ativas e das vantagens oferecidas pela CB como biomaterial para embalagens, justifica-se o desenvolvimento deste trabalho para explorar a aplicação de CB em embalagens ativas alimentícias. Este estudo visa não apenas prolongar a vida útil e preservar a qualidade dos produtos alimentícios in natura, embalados, mas também contribuir para a segurança alimentar, a qual se refere à garantia de acesso contínuo a alimentos seguros, nutritivos e em quantidade suficiente para atender às necessidades de uma população (LIMA; BESSA; SALOMÃO, 2024). Ao explorar a incorporação de extratos vegetais na CB, buscou-se criar embalagens ativas capazes de proporcionar proteção extra contra agentes microbianos, contribuindo para a prevenção da contaminação e deterioração dos alimentos.

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Este estudo teve como objetivo investigar a produção de membranas CB utilizando *K. hansenii* ATCC 23769, em cultivo estático, avaliando a influência de diferentes fontes de carbono no rendimento em massa seca, capacidade de intumescimento das membranas e a eficácia antimicrobiana de membranas funcionalizadas com extratos vegetais na inibição e/ou redução de crescimento bacteriano.

2.2. Objetivos específicos:

- Produzir membranas de CB em meios de cultivo com diferentes fontes de carbono, utilizando a cepa *K. hansenii* ATCC 23769, visando identificar as condições que maximizem resistência e capacidade de intumescimento das membranas.
- Avaliar o rendimento em massa seca das membranas de CB produzidas.
- Determinar a capacidade de intumescimento das membranas de CB, fundamental para a incorporação de compostos bioativos.
- Obter e processar extratos vegetais por métodos de maceração e decocção, utilizando diferentes espécies vegetais para avaliação do potencial antimicrobiano.
- Avaliar a atividade inibitória de crescimento bacteriano dos extratos vegetais, utilizando testes de difusão em discos, testes de contato com membranas de CB impregnadas com os extratos e testes de redução de contaminação em alimentos in natura (uvas) embalados com CB impregnada com os extratos que apresentaram atividade antibacteriana nos testes de difusão

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes utilizados na preparação dos meios de cultivo para produção de CB

Os meios de cultivo foram preparados utilizando como fontes de carbono, a glicose, sacarose, frutose e etanol absoluto, Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), hidróxido de sódio (NaOH) da empresa SYNTH. A glicose e o extrato de levedura da empresa MERCK. O ágar da empresa KASVI.

3.1.2. Extratos vegetais

As amostras secas dos vegetais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), alho (*Allium sativum*), barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), canela em pó, canela em pau (*Cinnamomum verum*), cominho em semente, cominho em pó (*Cuminum cyminum*), cravo em flor (*Syzygium aromaticum*), cúrcuma (*Curcuma longa*), feno-grego (*Trigonella foenum-graecum*), louro em folhas, louro em pó (*Laurus nobilis*), noz-moscada (*Myristica fragrans*), orégano (*Origanum vulgare*) e pimenta calabresa (*Capsicum annum*), foram adquiridas em estabelecimentos comerciais locais da cidade de Araraquara/SP.

3.2 Métodos

3.2.1. Produção e processamento das membranas de CB

As amostras de *K. hansenii* ATCC 23769 foram cultivadas em meio contendo frutose (60 g/L), extrato de levedura (5,6 g/L) e etanol absoluto (50 mL/L). O cultivo foi inicialmente, incubado sob agitação, a 250 rpm, em uma estufa incubadora Shaker tipo B.O.D. a 28°C por 24 horas. Em seguida, o cultivo foi mantido em cultivo estático em B.O.D. a 28°C por 7 dias, resultando na formação de uma manta de CB. Após obtenção da membrana de CB, o cultivo foi vigorosamente agitado para remover as bactérias da membrana, e a suspensão bacteriana obtida foi utilizada como pré-inóculo.

O processamento das mantas de CB tem como objetivo a remoção do meio de cultivo, por lavagem em água corrente para eliminar excessos de resíduos superficiais. A seguir, as membranas de CB foram submetidas a um tratamento utilizando solução de NaOH 0,5M, em banho-maria a 80°C. Após o tratamento com NaOH, as membranas foram lavadas em água destilada, com troca periódica, em banho-maria a 60°C, até neutralização do pH.

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos *natura*

Foram testados 3 meios de cultivo com diferentes fontes de carbono para a produção de CB. O Meio Sintético 1 (MS1) utilizando 20g/L glicose, 40g/L sacarose, 50mL álcool absoluto, 5,6g/L extrato de levedura, 1g/L K₂HPO₄, Meio Sintético 2 (MS2) utilizando 12g/L glicose, 42,5g/L sacarose, 12,7g/L frutose, 50mL álcool absoluto, 5,6g/L extrato de levedura, 1g/L K₂HPO₄ e meio Frutose (FRU) utilizando 60g/L de frutose, 5,6g/L de extrato de levedura, 50mL/L de etanol absoluto (Lazarini *et al.*,2016).

A partir do pré-inóculo, foram realizados cultivos nos três meios para a produção de CB, mantidos em cultivo estáticos em B.O.D. a 28°C por 7 dias, visando o desenvolvimento das membranas de CB. Foram produzidas membranas em triplicata em cada meio de cultivo testado, como demonstrado na Figura 1, as quais foram tratadas e secas em estufa à 60°C para análise quanto ao rendimento em massa seca e porcentagem de intumescimento.

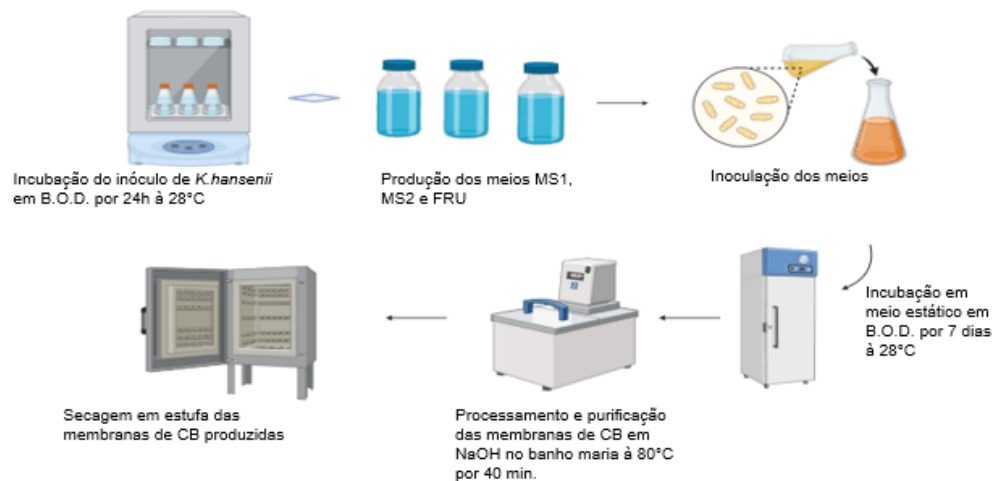


Figura 1 – Produção e processamento das membranas de CB. (Fonte: Próprio autor)

3.2.2. Análise do rendimento em massa seca das membranas de CB

Para a determinação do rendimento em massa seca das membranas de CB produzidas foi utilizada a equação (1):

$$(1) \quad \text{Rendimento (\%)} = \frac{m_0}{C} \times 100$$

Onde m_0 é corresponde à massa seca da membrana de CB (g) e C à massa da fonte de carbono utilizada (g).

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

O resultado, expresso em porcentagem, indica a eficiência de conversão do substrato inicial em biomassa, permitindo avaliar o desempenho do processo de produção.

Esse parâmetro é importante para otimizar o cultivo e compreender fatores que influenciam na produção, como a qualidade da fonte de carbono, as condições ambientais e o tempo de incubação.

3.2.3. Estudo de intumescimento

O procedimento experimental envolveu a imersão das membranas de CB em água destilada, mantida à temperatura ambiente (25°C), até atingir o estado de equilíbrio de intumescimento. O equilíbrio foi estabelecido quando não houve mais variação significativa na massa das membranas, indicando que a máxima saturação de água havia sido alcançada.

Após esse período, as membranas foram cuidadosamente retiradas da solução, garantindo que não houvesse perda de água superficial, para então serem pesadas em uma balança analítica de alta precisão e determinar a massa úmida (MU). A massa seca inicial (M_0) das membranas, previamente obtida por secagem em estufa até peso constante, foi utilizada como parâmetro comparativo.

A porcentagem de intumescimento foi realizada utilizando a expressão (2):

$$(2) \quad \textit{Intumescimento} (\%) = \frac{M_U - M_0}{M_U} \times 100$$

Onde M_U corresponde à massa úmida e M_0 à massa seca da membrana de CB (g).

Após esse período, as membranas foram cuidadosamente retiradas da solução, garantindo que não houvesse perda de água superficial, para então serem pesadas em uma balança analítica de alta precisão e determinar a massa úmida (MU). A massa seca inicial (M_0) das membranas, previamente obtida por secagem em estufa até peso constante, foi utilizada como parâmetro comparativo.

3.2.4. Obtenção e processamento dos extratos vegetais

As amostras de plantas secas (8,6 g de alecrim; 5 g de alho; 16,7 g de barbatimão; 5,56 g de canela em pó; 5,56 g de canela em pau; 5 g de cominho em semente; 5 g de cominho em pó; 5 g de cravo em flor; 5 g de cravo em pó; 5 g de cúrcuma; 3,34 g de feno-grego; 0,96 g de louro em folhas; 0,96 g de louro em pó; 3 g de noz-moscada; 10 g

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

de orégano; e 20 g de pimenta calabresa em pó) foram trituradas. Após trituração, vegetais obtidos foram submetidos à extração por decocção em banho-maria a uma temperatura de 80 °C por 15 minutos e à maceração por 7 dias com agitações periódicas. Foram utilizados como solventes 25 mL de água destilada e 25 mL de etanol a 70%.

Os extratos resultantes dos solventes foram misturados, filtrados, desidratados em estufa a 60 °C e armazenados sob forma de pó em tubos de microcentrífuga para os testes de atividade antimicrobiana, conforme a Figura 2. Posteriormente, esses extratos foram diluídos em água destilada para alcançar as concentrações desejadas nos testes.

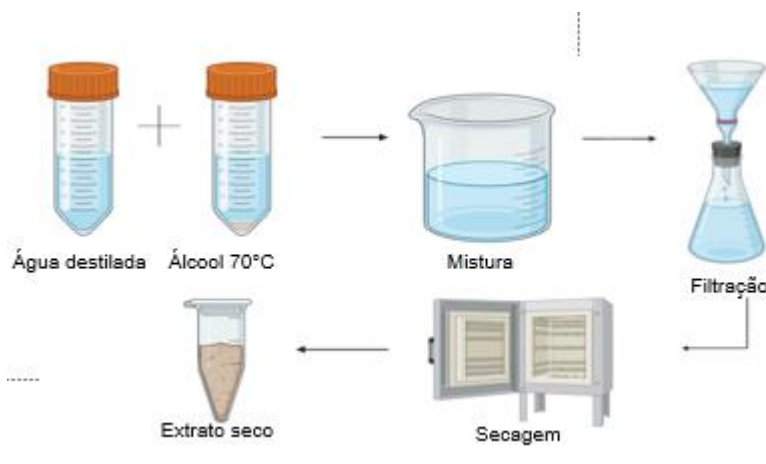


Figura 2 – Obtenção e processamento dos extratos vegetais. (Fonte: Próprio autor)

Os extratos, obtidos foram utilizados nos testes para determinação da atividade antibacteriana, por difusão em discos.

3.2.6. Teste de atividade antibacteriana dos extratos, por difusão em discos

Os organismos *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028, e *Bacillus cereus* ATCC 14579 foram obtidos da Fundação André Tosello. Os testes de atividade antibacteriana por difusão em discos foi realizado seguindo as normas do CLSI 2022 (CLSI, 2022). Um volume de 50µL das suspensões ou soluções dos 16 extratos vegetais obtidos, diluídos a 0,1g/mL, foram impregnados em discos de papel de filtro Whatman nº2 com diâmetro de 10mm com a concentração dadas em gramas por área do disco (g/mm²). Os discos impregnados foram desidratados em estufa ventilada a 36°C. Após secagem, os discos foram colocados na superfície de placas de ágar Mueller-Hinton inoculadas com uma suspensão na escala nefelométrica 0,5 de McFarland (1,5 x 10⁸ unidades formadoras de colônia por mL – UFC/mL) das bactérias, *S. enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028 e *B. cereus* ATCC 14579. As placas foram incubadas por 24

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos naturais

horas a 36°C. A determinação da atividade antibacteriana foi determinada pela formação de halo de inibição ao redor dos discos. Os testes foram realizados em triplicata (Figura 3). OS extratos que apresentaram atividade inibitória de crescimento bacteriano, nesses testes, foram utilizados para impregnação em CB.

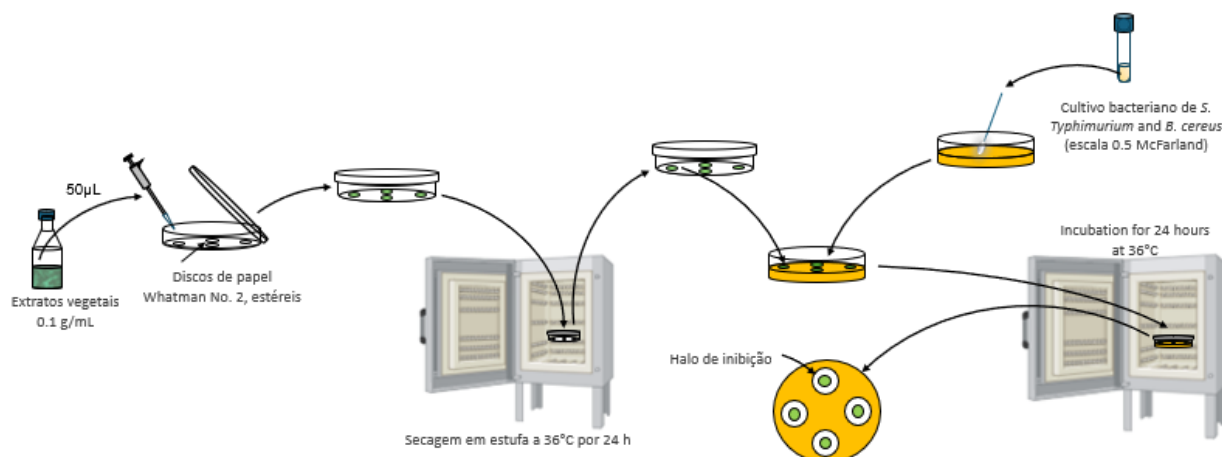


Figura 3 - Difusão em discos. (Fonte: Próprio autor)

3.2.6. Incorporação dos extratos vegetais em CB

Os extratos vegetais com atividade inibitória de crescimento determinada nos testes de difusão em discos foram diluídos nas concentrações de 0,25g/mL. Em seguida, as membranas de CB com diâmetro de 15mm foram submersas nas soluções em 1mL dos extratos vegetais, permanecendo em contato por um período médio de 4 horas. Após a imersão, as membranas foram retiradas das soluções e submetidas novamente à secagem em estufa a 36°C até que a umidade fosse completamente removida. Esse procedimento permitiu a incorporação dos extratos vegetais às membranas de CB. Para quantificar a quantidade de extrato vegetal incorporada por unidade de área das membranas de CB, foi utilizada a concentração superficial média. Este parâmetro foi calculado pela razão entre a massa total de extrato incorporado e a área da superfície da membrana, permitindo expressar de forma padronizada a quantidade de extrato presente em diferentes dimensões de membrana, dadas em mg/mm².

No caso das membranas circulares com 15 mm de diâmetro, a área foi calculada utilizando a fórmula da área do círculo: $A = \pi r^2$. Para as membranas retangulares com dimensões correspondentes a 210 mm × 148,5 mm, a área foi calculada como: $A = 210\text{mm} \times 148,5\text{mm}$.

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

Essa metodologia garantiu a incorporação dos extratos vegetais às membranas, resultando em materiais potencialmente aplicáveis para as avaliações subsequentes.

3.2.7. Teste de atividade antimicrobiana por contato

As membranas de CB de 15 mm de diâmetro, impregnadas com extratos vegetais conforme descrito no item 3.2.6., passaram por um processo de intumescimento, aumentando sua massa em média de 91%, conforme tabela 2 do item 4.2. A incorporação dos extratos foi realizada utilizando uma concentração de 0,25 g/mL, assegurando a absorção da solução. Essa padronização permitiu uma distribuição dos compostos ativos nas membranas. Para o preparo da mistura da suspensão bacteriana, foi realizado o pré-inóculo de cada cepa bacteriana utilizada. As cepas bacterianas utilizadas nesse teste foram *S. enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14025, *B. subtilis* ATCC 19659, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Os pré-inóculos foram ajustados na escala nefalométrica 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL)). Em seguida, 200 µL de cada suspensão bacteriana foram misturados em proporções iguais para formar uma suspensão bacteriana.

Os discos impregnados com extratos foram acondicionados em placas de Petri de vidro estéreis e, individualmente expostos a 50 µL da mistura bacteriana, garantindo a cobertura uniforme de sua superfície. Após a aplicação da mistura bacteriana, as placas foram incubadas a 36° C em estufa bacteriológica por 24 horas. Após esse período, os discos foram transferidos para tubos de vidro contendo 15 mL de água destilada estéril e agitados em vórtex por 15 segundos para suspensão bactérias viáveis possivelmente aderidas às membranas.

A seguir, 50 µL da suspensão, contida em cada tubo de vidro, foram semeados, com o auxílio de alças de Drigalski estéreis, em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 36 °C por 24 horas, conforme descrita na Figura 4. Todos os experimentos foram realizados em triplicata para garantir a confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados.

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

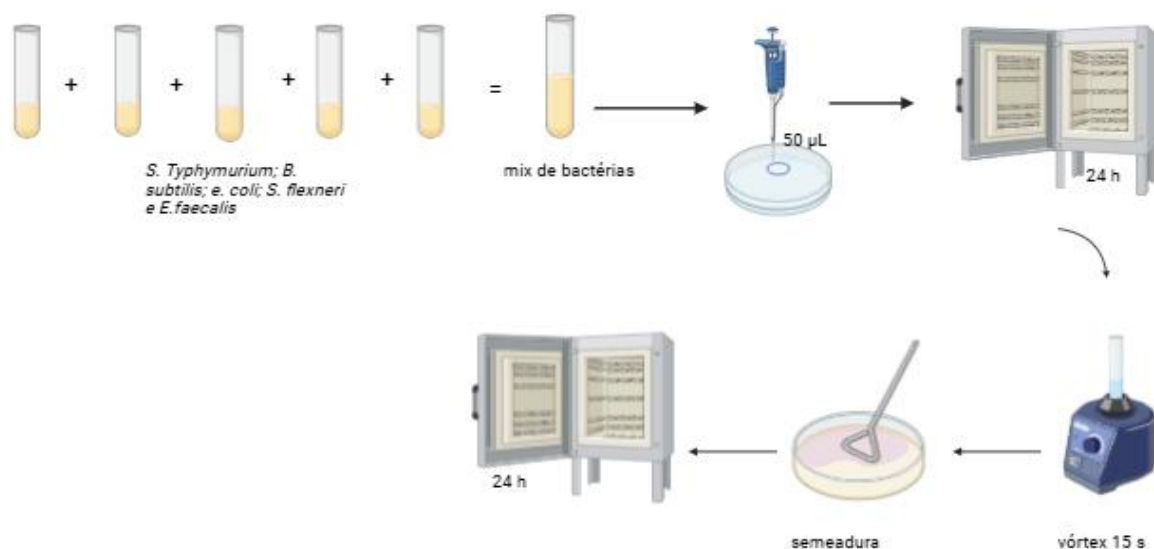


Figura 4: Teste de atividade antimicrobiana por contato. (Fonte: Próprio autor)

3.2.8. Testes de redução de contaminação de uvas embaladas em CB impregnadas com os extratos

Foi preparada uma suspensão bacteriana contendo *E. faecalis* ATCC 29212, *B. subtilis* ATCC19659, e *S. flexneri* ATCC12022. Cada cepa foi cultivada individualmente em caldo nutritivo BHI (cérebro - coração – infusão) a 36°C por 24 horas. Os pré-inóculos foram ajustados individualmente à turbidez correspondente ao padrão de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, cada suspensão bacteriana foi misturada em proporções iguais, totalizando 20 mL de solução contaminante.

Uvas in natura e intactas foram selecionadas e previamente higienizadas com água destilada estéril. As uvas foram imersas individualmente na mistura bacteriana por 1 minuto para garantir a contaminação uniforme. Após a imersão, as uvas foram deixadas em contato com o ar por 15 minutos em condições assépticas para permitir a adesão das bactérias à superfície.

Membranas de CB com dimensões de 210 mm × 148,5 mm foram inicialmente submetidas a um processo de intumescimento de aproximadamente 91%, conforme demonstrado na Tabela 2. Posteriormente, essas membranas foram incorporadas com extratos vegetais de alecrim, barbatimão, canela em pó, cravo em flor, cravo em pó e orégano, utilizando soluções com concentração de 0,25 g/mL. Após a impregnação, as membranas foram submetidas novamente à secagem a 36°C até a completa remoção da umidade, garantindo a fixação dos compostos ativos dos extratos vegetais. Para

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

avaliar a eficácia antimicrobiana dos extratos, três uvas previamente contaminadas foram colocadas em contato direto com cada membrana incorporadas com os extratos vegetais, possibilitando a análise da redução da carga bacteriana na superfície das frutas. Em seguida, as uvas embaladas com as CBs, foram acondicionadas em sacos estéreis e armazenadas em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) por 7 dias.

Após o contato com as membranas impregnadas com os extratos e com a CB pura (controle), as uvas foram transferidas para tubos contendo água destilada estéril e agitadas em vórtex por 20 segundos para remover as bactérias aderidas. Em seguida, 100 µL da solução resultante foram

inoculados em placas de Petri contendo meio ágar Muller-Hinton, utilizando uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 36°C por 24 horas.

Decorridas 24 horas de incubação, foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) nas placas para determinar a redução bacteriana em comparação com os controles, como descrito na Figura 5. O experimento foi conduzido em triplicata para cada extrato e o controle.

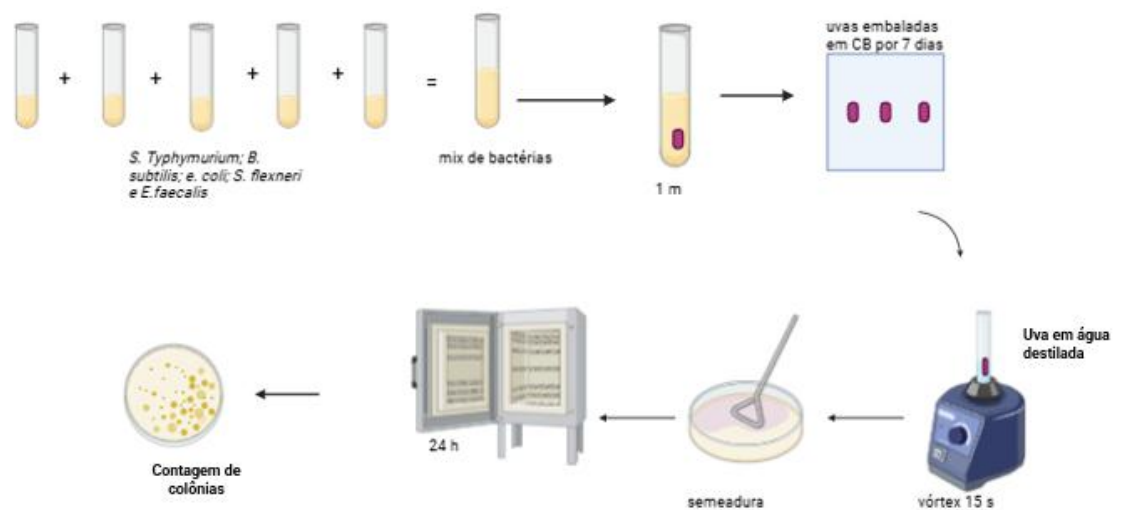


Figura 5: Testes de redução de contaminação de uvas embaladas em CB impregnadas com os extratos. (Fonte: Próprio autor).

3.2.9. Análise das características físico – químicas das uvas embaladas com CB incorporadas com os extratos vegetais

Foram utilizadas uvas, in natura do tipo Vitória, adquiridas em um hortifruti da cidade de Araraquara-SP. Para a realização desses experimentos foram escolhidas uvas, com peso médio de 4 g, selecionadas com base na uniformidade de tamanho e

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

aparência. As uvas foram distribuídas em grupos, sendo cada grupo composto por três uvas envoltas individualmente com membranas de CB impregnadas com os extratos vegetais que apresentaram atividade antibacteriana.

Cada tipo de membrana de CB incorporada com extrato vegetal foi utilizada para embalar um grupo contendo 3 uvas. Após as uvas serem embaladas com as membranas de CB, as amostras foram acondicionadas em sacos estéreis e mantidas em condições ambientais controladas, a uma temperatura de 25°C, por um período de 7 dias. Após esse período, as uvas foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL e submetidas a esmagamento manual para extração do suco. O pH do suco foi medido utilizando fitas medidoras de pH. As medições foram realizadas antes do início do experimento (uvas frescas sem tratamento) e após 7 dias de interação com as membranas de CB. O experimento foi conduzido em triplicata para cada tipo de membrana incorporada com extrato vegetal.

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

4. RESULTADOS

4.1. Produção das membranas de CB

As membranas de CB produzidas por *K. hansenii* ATCC 23769, foram processadas, conforme descrito no item 3.2.1. Foram produzidas 3 membranas de cada meio, as quais foram tratadas e secas em estufa à 60°C (Figura 6) para estudos dos diferentes meios quanto ao rendimento em massa seca e porcentagem de intumescimento.



Figura 6 – Aspecto macroscópico das membranas de CB produzidas, em quadruplicata, por *K. hansenii* ATCC 23769. (Fonte: Próprio autor)

4.2. Análise do rendimento em massa seca e determinação da relação volume/área de intumescimento das membranas de CB

A determinação do rendimento em massa seca e a relação volume/área de intumescimento, parâmetros importantes para a realização do estudo de liberação sustentada de fármacos, foi realizada conforme descrito por Lazarini e colaboradores (LAZARINI et al., 2018). Após a determinação desses parâmetros, foi possível calcular a porcentagem de intumescimento para determinação do volume de extrato a ser incorporado nas membranas. Como pode ser observado na Tabela 2, os meios MS1 e FRU apresentaram maior porcentagem de intumescimento.

MEIO DE CULTIVO	MASSA ÚMIDA DA CB (mg)	MASSA SECA DA CB (mg)	INTUMESCIMENTO %	DESVIO PADRÃO
MS1	954	8	91,00	1,41

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

MS2	877	8	89,67	1,7
FRU	605	6	90,34	3,30

Tabela 2: Valores do intumescimento obtidos.

Os resultados na Tabela 2 demonstram que, embora MS1 e FRU tenham valores de porcentagem de intumescimento próximos, o MS1 apresenta uma maior consistência nos resultados, conforme evidenciado pelo menor desvio padrão que foi calculado pela porcentagem de intumescimento das membranas de CB.

4.3. Obtenção dos extratos vegetais

PLANTAS SECAS	MASSA DE PLANTAS SECAS (g)	MASSA DE EXTRATO OBTIDO (g)
ALECRIM	8,6	0,7
ALHO	5	0,37
BARBATIMÃO	16,7	0,830
CANELA PÓ	5,6	0,37
CANELA PAU	5,6	0,13
COMINHO SEMEMTE	5	0,3
COMINHO PÓ	5	0,48
CRAVO FLOR	5	0,35
CRAVO PÓ	5	0,27
CÚRCUMA	5	0,13
FENO GREGO	3,4	0,061
LOURO FOLHAS	0,96	0,115
LOURO PÓ	0,96	0,137
NOZ MOSCADA	3	0,13
ORÉGANO	10	0,525
PIMENTA CALABRESA	20	0,115

Tabela 3: A quantidade de extratos obtidos após as etapas descritas no item 3.2.4.

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

Com base nos dados da Tabela 3, foram obtidos extratos de todas as plantas secas em diferentes rendimentos em massa seca. Esses extratos são conhecidos por suas propriedades antimicrobianas e foram investigados para avaliar seu potencial na inibição de crescimento de bactérias das espécies *B. cereus* ATCC 14579, e *S. enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028.

4.4. Resultados de teste de atividade antimicrobiana por difusão em discos

Os halos de inibição ao redor dos discos de papel de filtro impregnados com os extratos foram mensurados após 24 horas de incubação a 36°C para avaliar a eficácia antimicrobiana dos 16 extratos vegetais (Tabelas 4, 5, 6 e 7). Dos 16 extratos vegetais avaliados, seis apresentaram atividade antibacteriana na concentração testada de 0,1g/mL.

A Figura 7 apresenta os resultados obtidos no ensaio de atividade antibacteriana dos extratos de (1) alecrim, (2) alho, (3) barbatimão e (4) canela em pó, frente às espécies *Bacillus cereus* e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium.

Para cada extrato, foi aplicada uma massa de aproximadamente 5 mg de extrato puro por disco de 10 mm de diâmetro, obtida a partir da aplicação de 50 µL de solução contendo 0,1 g/mL do respectivo extrato. Os resultados demonstraram que o extrato de alecrim foi eficaz na inibição do crescimento de ambas as espécies bacterianas, evidenciando seu potencial como agente antimicrobiano natural. O extrato de alho, nas condições testadas, não apresentou atividade antibacteriana. Por sua vez, o extrato de barbatimão demonstrou eficácia na inibição de *B. cereus* e *S. enterica* sorovar Typhimurium. De maneira semelhante, o extrato de canela em pó também apresentou efeito inibitório sobre o crescimento das duas espécies bacterianas analisadas.

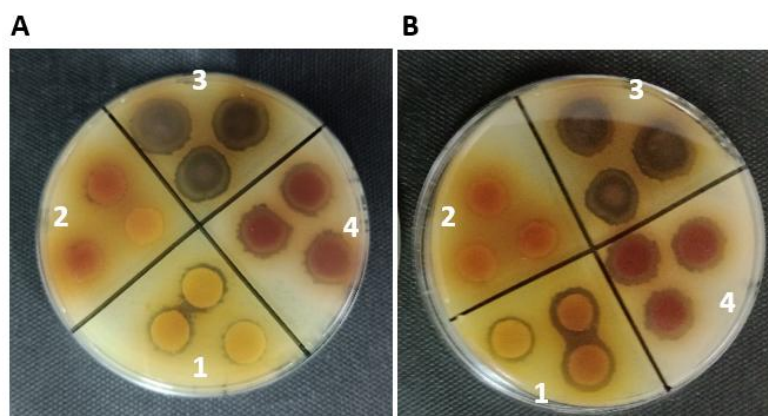


Figura 7 – Teste de atividade inibitória de crescimento dos extratos de (1) alecrim, (2) alho, (3) barbatimão, (4) canela em pó – Paineis A – *B. cereus*; Paineis B – *S. enterica*.

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

Halos (mm)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. enterica</i>
1 - Alecrim	22 ± 1,2	24 ± 1,4
2 – Alho	0	0
3 - Barbatimão	27 ± 1,7	29 ± 1,9
4 – Canela pó	26 ± 1,6	26 ± 1,6

Tabela 4: Medida dos halos de inibição de crescimento bacteriano.

A Figura 8 apresenta os resultados obtidos no teste de atividade antibacteriana dos extratos de (5) canela em pau, (6) cominho semente, (7) cominho em pó e (8) cravo em flor, sobre as espécies *B. cereus* e *S. enterica* sorovar Typhimurium. O extrato de canela em pau apresentou concentrações inferiores às observadas no extrato de canela em pó e não apresentou efeito inibitório sobre as bactérias nas condições avaliadas. O extrato de cominho em pó apresentou maior rendimento em comparação ao extrato das sementes inteiras. Não foi observada atividade antimicrobiana para o extrato de cominho em pó, na concentração testada, frente às cepas utilizadas. Já o extrato de cravo em flor demonstrou eficácia na inibição de *B. cereus* e *S. enterica* sorovar Typhimurium.

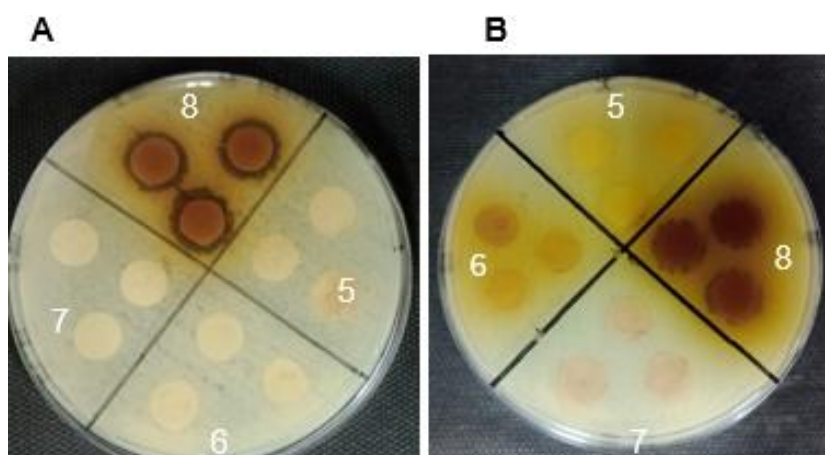


Figura 8 – Teste de atividade inibitória de crescimento dos extratos de (5) canela em pau, (6) cominho semente, (7) cominho em pó, (8) cravo em flor – Painel A – *B. cereus*; Painel B – *S. enterica*.

Halos (mm)		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. enterica</i>
5 – Canela pau	0	0
6 – Cominho semente	0	0
7 – Cominho pó	0	0

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

8 – Cravo Flor	$28 \pm 1,8$	$24 \pm 1,4$
-----------------------	--------------	--------------

Tabela 5: Medida dos halos de inibição de crescimento bacteriano.

A Figura 9 apresenta os resultados obtidos no teste de atividade antibacteriana dos extratos de (9) cravo em pó, (10) cúrcuma, (11) feno-grego e (12) louro em folhas, frente às espécies *Bacillus cereus* e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. Para todos os extratos, foi aplicada de 50 μ L de solução contendo 0,1 g/mL de extrato, resultando na deposição de 5 mg de extrato sobre discos de 10 mm de diâmetro. O extrato de cravo em pó apresentou atividade inibitória significativa sobre o crescimento das espécies bacterianas avaliadas, evidenciando seu potencial como agente antimicrobiano natural. Em contrapartida, os extratos de cúrcuma, feno-grego e louro em folhas não demonstraram atividade antimicrobiana sob as condições experimentais testadas.

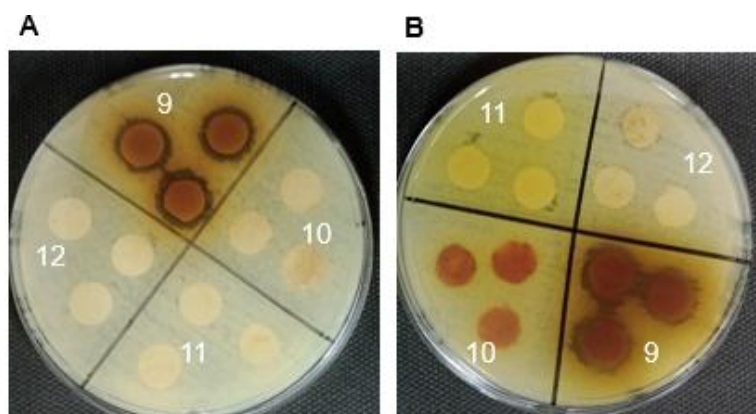


Figura 9 – Teste de atividade inibitória de crescimento dos extratos de (9) cravo em pó, (10) cúrcuma, (11) feno grego, (12) louro em folhas – Painel A – *B. cereus*; Painel B – *S. enterica*.

	Halos (mm)	
	<i>B. cereus</i>	<i>S. enterica</i>
9 – Cravo pó	$28 \pm 1,8$	3 ± 2
10 – Cúrcuma	0	0
11 – Feno grego	0	0
12 – Louro folhas	0	0

Tabela 6: Medida dos halos de inibição de crescimento bacteriano.

A Figura 10 apresenta os resultados obtidos no teste de atividade antibacteriana dos extratos de (13) louro em pó, (14) noz-moscada, (15) orégano e (16) pimenta calabresa, frente às espécies *Bacillus cereus* e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. Para cada extrato, foi aplicada 50 μ L de solução contendo 0,1 g/mL de extrato, correspondendo à aplicação de 5 mg de extrato puro sobre discos de 10 mm de

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

diâmetro. O extrato de louro em pó apresentou maior rendimento na obtenção do extrato em comparação ao louro em folhas; contudo, não demonstrou atividade antimicrobiana sob as condições avaliadas. De modo semelhante, o extrato de noz-moscada não exibiu efeito inibitório sobre as cepas bacterianas testadas. Por outro lado, o extrato de orégano, reconhecido pela presença de compostos bioativos como carvacrol e timol, foi eficaz na inibição do crescimento de ambas as espécies bacterianas. O extrato de pimenta calabresa, não apresentou atividade antimicrobiana nas condições experimentais utilizadas.

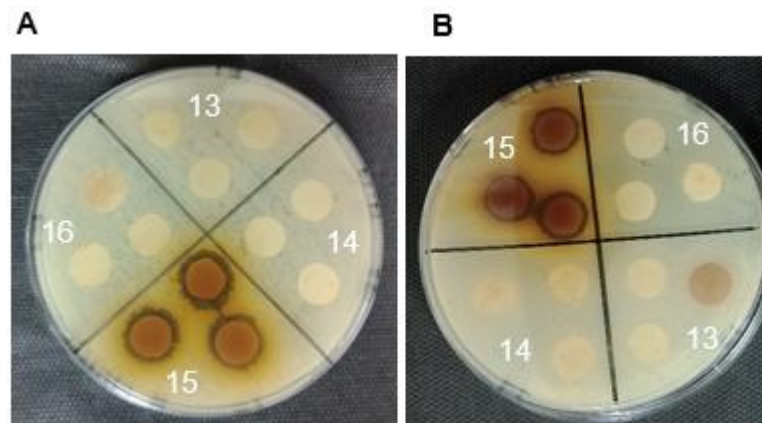


Figura 10 – Teste de atividade inibitória de crescimento dos extratos de (13) louro pó, (14) noz moscada, (15) orégano, (16) pimenta calabresa – Painel A – *B. cereus*; Painel B – *S. enterica*.

	Halos (mm)	
	<i>B. cereus</i>	<i>S. enterica</i>
13 – Louro pó	0	0
14 – Noz moscada	0	0
15 – Orégano	27 ± 1,7	24 ± 1,4
16 – Pimenta calabresa	0	0

Tabela 7: Medida dos halos de inibição de crescimento bacteriano.

Os extratos de (1) alecrim, (3) barbatimão, (4) canela em pó, (8) cravo em flor, (9) cravo em pó e (15) orégano apresentaram atividade antimicrobiana frente às espécies *Bacillus cereus* ATCC 14579 e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028. Para todos os extratos, foi aplicada uma solução na concentração de 0,1 g/mL, com volume de 50 µL sobre discos de 10 mm de diâmetro, totalizando 5 mg de extrato por disco. Os resultados indicaram que todos os extratos mencionados foram eficazes na inibição do crescimento bacteriano sob as condições avaliadas, evidenciando seu potencial como fontes naturais de agentes antimicrobianos.

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

4.5. Resultados de teste de atividade antimicrobiana por teste de contato com as CB incorporadas com os extratos que apresentaram atividade inibitória de crescimento bacteriano no teste de difusão em discos

Os resultados obtidos no teste de contato demonstraram a eficácia antimicrobiana das membranas de CB incorporadas com extratos naturais de alecrim, barbatimão, canela em pó, cravo em flor, cravo em pó e orégano frente ao mix bacteriano contendo *S. enterica* sorovar Typhimurium, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. flexneri* e *E. faecalis*. As membranas de CB, com 15 mm de diâmetro, apresentaram um intumescimento de 91%. Para incorporação dos extratos vegetais, cada membrana foi submetida à imersão em solução contendo 0,25 g/mL do respectivo extrato, resultando na absorção de cerca de 946 µL de solução por membrana. Nessa condição, a quantidade de extrato incorporado por disco foi aproximadamente 236,5 mg, equivalente a uma concentração superficial de 1,338 mg/mm² para todos os extratos aplicados, considerando a área total da membrana (176,71 mm²).

Os testes demonstraram que todas as membranas de CB contendo os extratos avaliados apresentaram atividade inibitória significativa sobre o crescimento das espécies bacterianas testadas, evidenciando o potencial dos extratos vegetais impregnados nas membranas como agentes antimicrobianos naturais em sistemas de contato direto.

4.6. Resultados de testes de redução de contaminação em alimentos in natura (uvas) embaladas com CB incorporada com os extratos vegetais

A Figura 11 ilustra uma embalagem de CB pura (A) e uma embalagem de CB impregnada com extrato de alecrim (B).

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

A



B



Figura 11 – Demonstração das uvas embaladas com a CB usada como controle (A) e a CB incorporada com o extrato vegetal de alecrim (B).

Como pode ser observado nas Figuras 12 e 13, os resultados obtidos no teste demonstraram completa inibição do crescimento bacteriano em todas as amostras embaladas com membranas de CB com dimensões de 210 mm × 148,5 mm, incorporadas com os extratos vegetais testados (alecrim, barbatimão, canela em pó, cravo em flor, cravo em pó e orégano) utilizando uma concentração de 0,25 g/mL. Considerando essa condição, a massa total de extrato incorporada foi de aproximadamente 2,80 g para alecrim, 3,32 g para barbatimão, 1,48 g para canela em pó, 1,40 g para cravo em flor, 1,08 g para cravo em pó e 2,10 g para orégano. Além disso, o volume de solução utilizada para impregnação das membranas foi de aproximadamente 11,20 mL para alecrim, 13,28 mL para barbatimão, 5,92 mL para canela em pó, 5,60 mL para cravo em flor, 4,32 mL para cravo em pó e 8,40 mL para orégano. Esses resultados evidenciam o potencial das membranas de CB funcionalizadas na inibição do crescimento bacteriano quando comparadas ao controle (membrana de CB pura sem incorporação dos extratos).

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

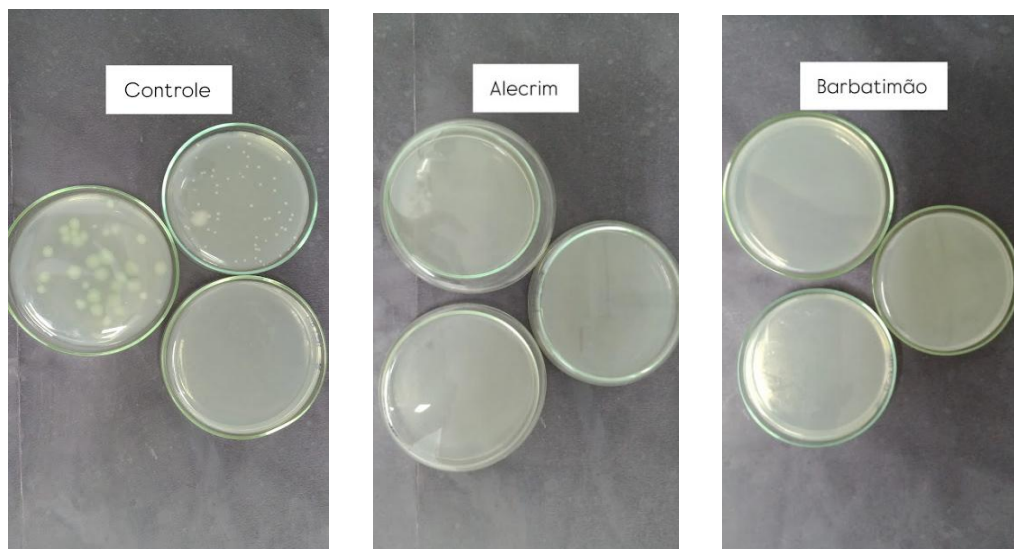


Figura 12 - Resultados de testes de redução de contaminação das uvas embaladas com CB controle e impregnadas com alecrim e barbatimão.

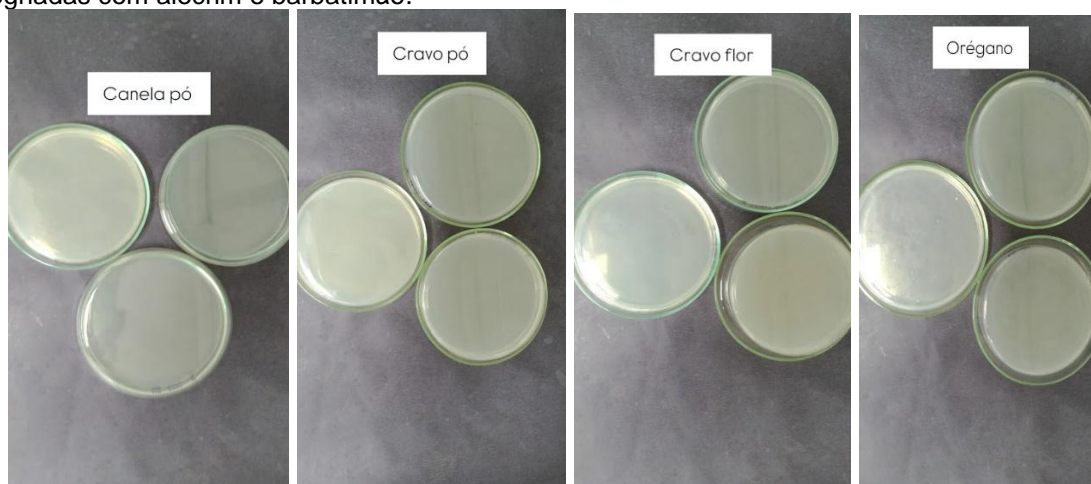


Figura 13 - Resultados de testes de redução de contaminação das uvas embaladas com CB impregnadas com canela em pó, cravo em pó, cravo flor e orégano.

Esses resultados ressaltam o potencial das membranas de CB incorporadas com extratos vegetais como uma abordagem eficiente na redução de bactérias contaminantes em superfícies alimentares, especialmente quando comparados ao controle (Figuras 11 e 12). Esses resultados reforçam o potencial das membranas de CB impregnadas com extratos vegetais para aplicação na conservação de alimentos frescos, fornecendo uma alternativa sustentável e segura.

4.7. Análise de características físico-químicas das uvas embaladas com CB incorporadas com extratos vegetais

Após a análise das características físico-químicas das uvas embaladas com membranas de CB incorporadas com extratos vegetais de alecrim, barbatimão, canela

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

pó, cravo pó e em flor e orégano, os seguintes resultados foram observados após sete dias de armazenamento: As uvas mantiveram o peso médio inicial de 4 g em todos os grupos experimentais, indicando que as membranas de CB foram eficazes em minimizar a perda de massa associada à desidratação. A textura das uvas permaneceu consistente, com aparência firme e ausência de sinais de amolecimento excessivo. A cor das uvas não apresentou alterações visíveis em comparação com as amostras. A análise visual indicou que as membranas de CB incorporadas com extratos vegetais contribuíram para a estabilidade da aparência externa das frutas. O pH das uvas, medido antes e após sete dias de contato com as membranas de CB, manteve-se estável entre 3 e 4, indicando que os extratos vegetais presentes nas membranas não interferiram na acidez das frutas. Não foram observados sinais significativos de desidratação nas uvas embaladas com as membranas de CB, reforçando a eficiência do material na redução da perda de umidade durante o período de armazenamento. Esses resultados demonstram que as membranas de CB incorporadas com extratos vegetais são eficazes na preservação das características físico-químicas de uvas frescas, garantindo a manutenção de sua qualidade, incluindo a estabilidade do pH entre 3 e 4, durante o armazenamento.

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

5. CONCLUSÕES

Foram produzidas membranas de CB utilizando *K. hansenii* ATCC 23769 em diferentes meios de cultivo, com fontes de carbono variadas e uma fonte de nitrogênio.

Os três meios utilizados (MS1, MS2 e FRU) apresentaram valores próximos para rendimento em massa seca e capacidade de intumescimento, evidenciando a adequação de todos os meios para a produção de membranas com propriedades satisfatórias.

As membranas de CB apresentaram rendimento significativo em massa seca e alta capacidade de intumescimento, fundamentais para a incorporação de compostos bioativos.

Foram obtidos 16 extratos vegetais por maceração e decocção.

Os extratos de alecrim, barbatimão, canela em pó, cravo em flor, cravo em pó e orégano demonstraram atividade antimicrobiana significativa nos testes de difusão em discos contra *B. cereus* e *S. enterica* sorovar Typhimurium.

As membranas de CB incorporadas com os extratos de canela em pó, cravo em flor, cravo em pó e orégano foram eficazes nos testes de contato, inibindo o crescimento de uma mistura bacteriana composta por *S. enterica*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. flexneri* e *E. faecalis*.

As membranas de CB incorporadas com os extratos CB impregnadas com os extratos canela em pó, cravo em flor, cravo em pó e orégano, de canela em pó, cravo em flor, cravo em pó e orégano demonstraram inibição do crescimento bacteriano após sete dias de armazenamento.

As análises físico-químicas das uvas frescas demonstraram que o pH permaneceu estável entre 3 e 4 ao longo do período experimental, confirmando que as membranas impregnadas com os extratos vegetais não alteraram as propriedades naturais do alimento.

As uvas também mantiveram peso, textura e cor, indicando a eficiência das membranas na preservação das características de qualidade de uvas in natura.

O estudo reforça a perspectiva de que as membranas de CB incorporadas com os extratos possuem grande potencial como embalagens ativas, promovendo a extensão da vida útil de alimentos frescos.

A pesquisa contribuiu para a consolidação do uso de biomateriais que não apenas atuam como barreiras físicas, mas também desempenham funções bioativas para melhorar a segurança alimentar.

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

A combinação de CB com extratos vegetais tem a possibilidade de atender à crescente demanda da indústria alimentícia por alternativas naturais aos conservantes químicos.

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

5. PERSPECTIVAS

- Realizar testes com maiores concentrações dos extratos que não apresentaram atividade inibitória de crescimento bacteriano;
- Realizar a caracterização dessas membranas produzidas por MEV e FTIR;
- Avaliar a viabilidade dos vegetais embalados, por períodos mais prolongados para verificar o aumento da vida útil;
- Produzir e caracterizar das membranas incorporadas com outros extratos vegetais por microscopia eletrônica de varredura, análise térmica.
- Produzir protótipos de embalagens ativas, com dimensões variadas para revestimento de outros vegetais e frutos.

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

REFERÊNCIAS

ADRIANE, L. et al. **Effect of an antimicrobial photoinactivation approach based on a blend of curcumin and Origanum essential oils on the quality attributes of chilled chicken breast.** v. 176, n. Janeiro, 2023.

ALBUQUERQUE, R. M. B. **Desenvolvimento de uma blenda biodegradável à base de celulose bacteriana (Cb) e Polihidroxibutirato (Phb) para aplicação como embalagem ativa para alimentos.** 2019. 131 p.

ALVES, M. B. **Bioprospecção de óleos essenciais de especiarias e avaliação das atividades antioxidante, tóxica e antibacteriana contra *Corynebacterium diphtheriae*.** 2023. 105 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Maranhão, [S. l.], 2023.

AMARAL, S. M. et al. **Alecrim (*Rosmarinus officinalis*): principais características.** Revista de Casos e Consultoria, [s. l.], v. 12, n. 1, 16 maio 2021.

BHARDWAJ, A.; ALAM, T.; TALWAR, N. **Recent Advances in Active Packaging of Agri-food Products: a Review.** Journal of Postharvest Technology, v. 7, n. 1, p. 33–62, 2019.

BRAGA, L. R.; SILVA, F. M. **Embalagens ativas: uma nova abordagem para embalagens alimentícias.** Brazilian Journal of Food Research, Campo Mourão, v. 8, n. 4, 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.** 2022.

COLCENTI, S. C. **Uso das plantas aromáticas e condimentares na produção de caponatas de berinjela.** 2023. 34 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, [S. l.], 2023.

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

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

ENGEL, J. B. **Desenvolvimento de embalagens e vedantes biodegradáveis a partir de materiais renováveis e resíduos agroindustriais**. 2022. 237 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [S. I.], 2022.

FERNANDES, W. R. **Avaliação da atividade antimicrobiana da planta *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão)**. 2020. 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Centro Universitário Uniguairaca, [S. I.], 2020.

FREIRE DA COSTA, G. **Desenvolvimento de filmes biodegradáveis antioxidantes e antimicrobianos para preservação de carne bovina refrigerada**. 2020.

FERREIRA, F. D.; ZANCHETTIN, M.; BINHARA, R. DA C. **Atividade antimicrobiana de condimentos tradicionalmente utilizados no Brasil**. In: **Ciência e Tecnologia de Alimentos: pesquisa e práticas contemporâneas**. v. 2, p. 112–127, 2021.

GOMES, E. A. **Atividades biológicas dos compostos presentes no *Origanum vulgare***. 2022. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Nutrição) – Universidade Federal Fluminense, [S. I.], 2022.

HÜTHER, C. M. et al. **Aqui tem Química: Parte VI. O Prazer dos Sabores Naturais**. Revista Virtual de Química, v. 15, n. 1, p. 12–34, 2023.

JANG, E. J. et al. **Antibacterial and biodegradable food packaging film from bacterial cellulose**. Food Control, v. 153, p. 109902, nov. 2023.

LASTRA-VARGAS, L. et al. **Oregano essential oil as an alternative antimicrobial for the control of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in Turkey mortadella during refrigerated storage**. Food Chemistry Advances, v. 2, n. June 2022, p. 100314, 2023.

LAZARINI, S. C. et al. **Membranas de celulose bacteriana produzidas a partir de meios de cultivo com diferentes fontes de carboidratos para utilização como**

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura suporte de liberação sustentada de ceftriaxona. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences, v. 37, n. 3, 2016.

LAZARINI, S. C. et al. **Influence of chemical and physical conditions in selection of *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 strains with high capacity to production bacterial cellulose for application as sustained antimicrobial drug release supports.** Journal of Applied Microbiology, v. 33017300, n. 7361, p. 0–1, 2018.

LIMA, J. P. F.; BESSA, R. R.; SALOMÃO, P. E. A. **A importância da agricultura familiar para a segurança alimentar.** Revista Multidisciplinar do Nordeste Mineiro, v. 9, n. 1, 2024.

LIMA SOUZA, D. **Plantas medicinais como alternativa no controle da *diabetes Mellitus* Tipo 2.** Instituto Federal Goiano Campus Rio Verde Bacharelado em Ciências Biológicas, 2022.

MACHADO, L. V. M. **O uso de revestimentos em pescado: matérias-primas mais utilizadas nas pesquisas - Uma revisão.** 2022. 85 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, [S. I.], 2022.

MARTELLI, E. C. et al. **Uso de substâncias bioativas como conservantes naturais em formas farmacêuticas: uma revisão.** Brazilian Journal of Health Review, v. 4, n. 2, p. 8120–8133, 2021.

MARTINAZZO, J. et al. **Embalagens ativas: uma tecnologia promissora na conservação de alimentos.** Brazilian Journal of Food Research, v. 11, n. 2, p. 171, 2020.

MIGUEL, T. B. V. **Desenvolvimento de filmes biodegradáveis a partir do amido da semente de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) com a incorporação de resíduo de acerola (*Malpighia emarginata*).** 2023. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, [S. I.], 2023.

NASCIMENTO, H. A. **Produção de biopolímero de celulose bacteriana aditivado com antioxidante natural.** 2022. 115 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Pernambuco, [S. I.], 2022.

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura

OLIVEIRA, E. B. DE J.; CAVALCANTE, L. B. DA S.; RIBEIRO, D. L. R. **Atividade antimicrobiana do *Allium sativum* em combate a *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*: uma revisão de literatura.** Brazilian Journal of Development, v. 7, n. 1, p. 9205–9231, 2021.

OLVERA-AGUIRRE, G. et al. **Using plant-based compounds as preservatives for meat products: A review.** v. 9, n. maio 2023.

PINTO, M. Â. L. **Desenvolvimento de laminados de celulose/zeína para embalagem alimentar.** 2020.

REIS, D. S. **Óleos essenciais: potencial como conservantes de alimentos.** 2023. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – [Instituição], [S. I.], 2023.

SANTANA, M. S. DE et al. **Propriedades funcionais do eugenol e sua aplicação em alimentos.** In: **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos.** v. 4, p. 59–73, 2021.
SCHMIDT, M. **Avaliação do potencial tintorial do extrato da cúrcuma sobre fibras têxteis e a liberação do seu princípio ativo curcumina.** 2022. 137 p.

SINGH, A. A. et al. **Antimicrobial activity of selected plant extracts against common food borne pathogens.** 2023.

SUTIL, G. A. **Impregnação supercrítica de piperina e extrato de pimenta do reino em filmes de PLLA para embalagens ativas de alimentos.** 2023. 167 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, [S. I.], 2023.

ZHU, Y. et al. **The inhibitory effects of spicy essential oils and rapidly prediction on the growth of *Clostridium perfringens* in cooked chicken breast.** Food Control, p. 106978, 2019.

Biopolímero a base de celulose bacteriana para preservação de alimentos in natura