



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

**Obtenção e aplicação de nanofibras de resíduo industrial de kombucha em
filmes biodegradáveis**

NATÁLIA PALUDO

Porto Alegre

2021

NATÁLIA PALUDO

Obtenção e aplicação de nanofibras de resíduo industrial de kombucha em filmes biodegradáveis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Como um dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientador: Prof. Dra. Simone Hickmann Flôres

Co- Orientador: Carlos Henrique Pagno

Porto Alegre, 2021

CIP - Catalogação na Publicação

Paludo, Natália

Obtenção e aplicação de nanofibras de resíduo industrial de kombucha em filmes biodegradáveis / Natália Paludo. -- 2021.

85 f.

Orientadora: Simone Hickmann Flôres.

Coorientador: Carlos Henrique Pagno.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. SCOBY. 2. celulose bacteriana. 3. nanofibras. 4. filmes biodegradáveis. I. Hickmann Flôres, Simone, orient. II. Henrique Pagno, Carlos, coorient. III. Título.

RESUMO

A kombucha é uma bebida fermentada que teve seu consumo aumentado nos últimos anos. Ao longo do processo fermentativo da kombucha, uma película de celulose bacteriana chamada SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) é formada e descartada com o tempo, sendo considerada um resíduo no processo industrial. A produção de celulose bacteriana (CB) pelo processo fermentativo é limitada devido ao seu alto custo e baixa produtividade. Com isso, fontes alternativas de baixo custo deste biopolímero como o uso do resíduo da kombucha são interessantes para caracterização e avaliação de sua aplicabilidade. Neste trabalho foi avaliado o efeito do uso de homogeneizador de alta pressão (HAP) a 600 bar no resíduo industrial de kombucha para produção de nanofibras, bem como a caracterização deste resíduo. Foram testados 10, 20 e 30 números de passagens no HAP para diminuir a dimensão das fibras de celulose em escala nanométrica com objetivo de otimizar as propriedades funcionais tecnológicas da CB. A metodologia de purificação reduziu 94,22 % da composição não fibrosa do SCOBY verificado a partir da análise de composição centesimal, que apresentou valores de 70,97 % e 97,33 % de fibra alimentar no SCOBY íntegro e purificado, respectivamente. A eficácia da purificação também foi comprovada por análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) através da verificação visual da remoção das impurezas de sua estrutura e confirmação de diâmetros inferiores a 1 μm de suas nanofibras. Análise termogravimétrica (TGA) não demonstrou diferença significativa entre as amostras de SCOBY purificado sem tratamento mecânico e com 30 passagens no HAP. A aplicabilidade das CBs provenientes do resíduo industrial de kombucha foram avaliadas pela adição de 1 %, 3 % e 5 % de CB com pré tratamento somente no turrax e com 30 passagens em HAP em filmes biodegradáveis de amido. A resistência à tração do filme com adição de 1% de CB com passagens no HAP aumentou em 24 % comparado ao filme controle e não apresentou diferença significativa quando comparado às outras concentrações de CB adicionadas. Nas análises de cor se verificou um aumento gradual da barreira de passagem de luz com aumento da opacidade e diminuição da luminosidade com a adição de CB na

região do UV (210nm) e luz visível (600nm). A solubilidade em água diminuiu com o aumento da concentração de CB ao filme, passando de 37,36 % para filme controle até 7,69 % para o filme com adição de 5 % de CB com 30 passagens no HAP. Em relação às análises de permeabilidade ao vapor de água (PVA) os filmes com adição de CB com passagens no HAP não apresentaram diferenças quanto ao filme controle, enquanto os filmes com tratamento apenas no turrax apresentaram valores superiores. A análise de estabilidade térmica (TGA) não apresentou diferenças significativas entre os filmes controle e com adição de CB. No geral, a CB proveniente do SCOBY apresentou estrutura e comportamento semelhantes aos estudos de celulose bacteriana obtida por fermentação e se mostrou um possível ingrediente promissor principalmente devido ao seu alto teor de fibras alimentares e escala nanométrica obtida. A celulose obtida do SCOBY com tratamento mecânico no HAP pode ser utilizada como reforço de filmes biodegradáveis de amido, otimizando seus parâmetros mecânicos, ópticos e de solubilidade.

Palavras-chave: SCOBY; celulose bacteriana; nanofibras; filmes biodegradáveis.

ABSTRACT

Kombucha is a fermented beverage whose consumption has increased in the last years. A bacterial cellulose film called SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) is formed and discarded over time since it is considered industrial residual during fermentation process. The production of bacterial cellulose from the fermentation process is limited due to its high cost and low productivity. Therefore, low-cost alternative sources of this biopolymer such as industrial kombucha waste are interesting for its applicability characterization and evaluation. In this work, the use of a high-pressure homogenizer (HPH) at 600 bar was tested in the industrial kombucha waste, as well as the characterization of this residue. The SCOBY was tested with 10, 20 and 30 passages in HPH to reduce the size of the cellulose fibers on a nanometric scale and optimize its technological functional properties. The purification methodology reduced 94.22 % of SCOBY's non-fibrous compounds verified from the centesimal composition analysis, with dietary fiber values of 70.97% and 97.33% on intact and purified SCOBY, respectively. The purification effectiveness was also evaluated by scanning electron microscopy (SEM) analysis by visualization of the removal of impurities from its structure and bacterial cellulose nanofibers with diameters smaller than 1 μm and their random arrangement. A thermogravimetric analysis (TGA) showed no significant difference between samples of purified SCOBY without mechanical treatment and with 30 passages in HPH. The bacterial cellulose applicability from industrial kombucha waste was evaluated by addition of 1 %, 3 %, and 5% bacterial cellulose (BC) with pretreatment only on turrax and with 30 passages in HPH on biodegradable starch films. The film's tensile strength with 1 % CB with 30 passages in HPH increased 24 % compared to the control film and showed no significant difference compared to the other concentrations added. In the color analysis, there was a gradual increase in the light passage barrier with increased opacity and decreased luminosity with the addition of CB in the UV region (210nm) and visible (600nm). The solubility in water decreased with a higher CB concentration, going from 37,36 % at control film to 7.69 % at 5% CB with 30 passages in HPH. Regarding the analysis of water vapor permeability (PVA), the films with the addition of CB and passing through the HAP did not differ from the control film, while the films with

only turrax treatment showed higher values. The thermal stability analysis (TGA) did not show significant differences between the control films and those with the addition of CB. In general, bacterial cellulose from SCOBY presented structure and behavior similar to studies of BC obtained by fermentation and was shown to be a possible promising ingredient mainly due to its high content of dietary fiber and nanometric scale. The cellulose obtained from SCOBY with mechanical treatment at HAP can be used as reinforcement for biodegradable starch films, optimizing its mechanical, optical, and solubility parameters.

Keywords: SCOBY; bacterial cellulose; nanofibers; biodegradable films.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Recipiente para fermentação de kombucha com proteção em sua superfície.....	15
Figura 2 – Ilustração do processo fermentativo da kombucha	17
Figura 3 – Imagem do SCOBY com filamentos de levedura	19
Figura 4 – Produção de microfibrilas por <i>Gluconacetobacter xylinum</i>	24
Figura 5 – Embalagem feita de SCOBY	35
Figura 6 – Fluxograma da etapa de purificação do SCOBY	37
Figura 7 – SCOBY íntegro (a) e após etapa de purificação e pré secagem em estufa (b).....	45
Figura 8 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura. SCOBY Íntegro A: 5.000x e B: 20.000x; SCOBY Purificado C: 5.000x e D: 20.000x.....	50
Figura 9 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura das nanofibras obtidas com aceleração de 5 kV e 20.000x de aproximação. A: SP0; B: SP10; C: SP20; D: SP30.	51
Figura 10 – Análise Termogravimétrica das seguintes amostras: SI, SP, SP0, SP10, SP20 e SP30.....	53
Figura 11 – Solução de nanofibras após homogeneizador de alta pressão na concentração de 1% CB.....	55
Figura 12 – Frente e verso do filme obtido com 3% de nanofibras de celulose bacteriana.....	56
Figura 13 – Análise Termogravimétrica dos filmes controle, 30x 1% CB, 30x 3% CB, 30x 5% CB, T 1% CB, T 3% CB e T 5% CB.....	66
Figura 14 – Aparência dos filmes desenvolvidos até 12 dias de biodegradabilidade.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição Centesimal do SCOBY íntegro e purificado	46
Tabela 2 – Valores de Espessura e Propriedades Mecânicas – Resistência à Tração (RT) e Elongação na Ruptura (ER) dos filmes controle, apenas passagem no turrax e de 30 passagens no homogeneizador com adição de 1, 3 e 5% de nanofibras de celulose bacteriana.	57
Tabela 3 – Cor e Opacidade dos filmes controle, com passagem apenas no turrax e com 30 passagens no homogeneizador e adição de 1, 3 e 5% de nanofibras de celulose bacteriana.....	61
Tabela 4 – Permeabilidade ao vapor de água (PVA) e solubilidade em água dos filmes controle, com passagem apenas no turrax e com 30 passagens no homogeneizador e adição de 1, 3 e 5% de nanofibras de celulose bacteriana....	64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos.....	13
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
3.1 Kombucha.....	14
3.2 Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY)	18
3.3 Celulose Bacteriana	22
3.4 Nanofibras de Celulose Bacteriana.....	26
3.5 Aplicação de Celulose e Nanofibras de Celulose em Filmes Biodegradáveis	28
3.6 Embalagens biodegradáveis com uso de SCOBY	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Purificação do SCOBY	37
4.2 Obtenção das Nanofibras	38
4.3 Caracterização do SCOBY e das Nanofibras Obtidas	39
4.3.1 Composição Centesimal do SCOBY.....	39
4.3.2 Características Morfológicas.....	39
4.3.3 Análise Termogravimétrica	40
4.4 Elaboração dos Filmes Biodegradáveis com adição de Nanofibras de Celulose	40
4.5 Caracterização dos Filmes.....	41
4.5.1 Propriedades Mecânicas	41
4.5.2 Propriedades Ópticas	41
4.5.3 Propriedades de Barreira.....	42
4.5.4 Estabilidade Térmica	42
4.5.5 Solubilidade em Água.....	43
4.5.6 Propriedades Morfológicas	43
4.5.7 Biodegradabilidade	43
4.6 Análise Estatística.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44

5.1 Caracterização do SCOBY e das Nanofibras	44
5.1.1 Composição Centesimal do SCOBY.....	44
5.1.2 Características Morfológicas.....	49
5.1.3 Análise Termogravimétrica	52
5.2 Elaboração dos filmes biodegradáveis com adição de nanofibras de celulose	55
5.3 Caracterização dos Filmes contendo Nanofibras.....	56
5.3.1 Espessura e Propriedades Mecânicas.....	56
5.3.2 Propriedades Ópticas	59
5.3.3 Propriedades de Barreira e Solubilidade em Água	62
5.3.4 Estabilidade Térmica	65
5.3.5 Biodegradabilidade	67
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70
7. REFERÊNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO

Alimentos e bebidas fermentadas já são utilizados e consumidos pelo homem há milênios, seja por seus potenciais benefícios terapêuticos, pelo aumento na sua conservação ou melhoria de suas propriedades organolépticas devido a modificações em seus componentes. Dentre estes produtos fermentados, podemos citar a kombucha, bebida cuja produção evoluiu da escala artesanal para escala industrial e de grande comercialização nos últimos cinco anos no Brasil. Ainda que sua comercialização em escala industrial seja recente, algumas pesquisas já evidenciaram benefícios relacionados ao consumo da kombucha, como atividade antioxidante, efeito hipolipidêmico, atividade antimicrobiana devido à presença de ácidos e baixo pH, dentre outros (BATTIKH et al., 2013; JAYABALAN; MARIMUTHU; SWAMINATHAN, 2007; YANG et al., 2009).

A kombucha é uma bebida elaborada a partir do chá adoçado da *Camellia sinensis* fermentado com uma associação simbiótica de bactérias (primordialmente bactérias acéticas) e leveduras. Durante este processo fermentativo se forma uma película de celulose bacteriana (CB) na superfície do líquido chamada SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts*) (CHEN; LIU, 2000). Normalmente, para iniciar o novo processo fermentativo, utiliza-se uma quantidade de kombucha já fermentada e uma pequena porção de SCOBY. O restante do SCOBY é descartado, sendo considerado um resíduo para indústria produtora de kombucha.

A celulose é considerada o material orgânico mais abundante na natureza, e pode ser de origem vegetal, bacteriana ou animal (tunicados), não diferindo em sua estrutura molecular e química. A celulose vegetal é a mais utilizada pela sua maior disponibilidade e consequente facilidade de obtenção, porém, exige etapas intensas de purificação para sua utilização.

Um processo que visa otimizar as propriedades tecnológicas da celulose e tem resultados promissores é a obtenção de nanofibras a partir destes resíduos celulósicos para geração de novos produtos, como material de reforço de filmes e embalagens biodegradáveis. Dentro deste contexto, a fonte de celulose proveniente de bactérias tem se mostrado uma alternativa interessante, pois apresentam maior grau de purificação, não contém em sua

composição lignina e hemicelulose, diminuindo assim a quantidade de reagentes e etapas para sua extração e posterior aplicação.

Embora a CB seja um produto com grande potencial de mercado, o seu uso comercial extensivo é limitado por demandar alto custo de produção. Este alto custo é devido à grande área superficial necessária para obtenção desta película, sintetizadas predominantemente sob condições aeróbicas de cultivo. Com isso, o reaproveitamento da CB do SCOBY, proveniente de resíduo industrial da produção de kombucha, torna-se de grande valia para estudar possíveis aplicações do produto de acordo com suas propriedades. Visto que, atualmente, este SCOBY é descartado como rejeito orgânico juntamente com os outros subprodutos do processo produtivo.

As nanofibras de celulose, dentro delas as de CB, apresentam vantagens tecnológicas em relação à celulose vegetal, principalmente relacionadas às suas propriedades mecânicas, como maior área superficial, alta rigidez e resistência, dentre outros. Uma aplicação já estudada e que vem se mostrando promissora, é a utilização de nanofibras como material de reforço para embalagens biodegradáveis combinadas com outros biopolímeros como gelatina e amido, que visam proporcionar alternativas mais ecológicas e ambientalmente corretas para a área de embalagens (LEE et al., 2014; TIBOLLA; MARIA; CECILIA, 2014).

A indústria de kombucha se mostra promissora e está em crescimento considerável nos últimos anos. Estudos recentes já demonstraram capacidade de utilização do SCOBY em filmes com atividade antimicrobiana, curativos medicamentosos, membranas de filtração e até na indústria têxtil. Conseqüentemente, estudos que avaliem a viabilidade de utilização do resíduo gerado em escala industrial como também propostas de possíveis aplicações que se enquadrem nas necessidades da atual sociedade é de suma importância para agregar conhecimento e reaproveitamento desse resíduo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar propriedades físico-químicas do resíduo industrial bacteriano da kombucha para produção de nanofibras e aplicação em filmes biodegradáveis.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar as propriedades físico-químicas do SCOBY da kombucha industrial.
- Avaliar a aplicação de homogeneização sob alta pressão na obtenção de nanofibras a partir do SCOBY.
- Caracterizar as propriedades morfológicas e de estabilidade térmica das nanofibras obtidas.
- Aplicar as nanofibras obtidas em filmes biodegradáveis.
- Caracterizar os filmes produzidos com as nanofibras quanto às suas propriedades mecânicas, ópticas, térmicas, morfológicas, de barreira, solubilidade e biodegradabilidade.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Kombucha

A kombucha, bebida fermentada tradicional e milenar originada no Oriente, foi valorizada durante a Dinastia Tsin, por volta de 220 a.C. devido a suas propriedades desintoxicantes e energizantes, e, hoje já está bastante difundida no Ocidente (JAYABALAN et al., 2014). Esta bebida é obtida pela fermentação de uma infusão de folhas de *Camellia sinensis*, sendo mais comum a utilização de chá verde ou chá preto, e pela adição de açúcar, o qual é o substrato desta fermentação. Por último é adicionada uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras (SCOBY, sigla em inglês) que será responsável pelo processo fermentativo e caracterização da kombucha, resultando em uma bebida um pouco doce, ligeiramente ácida e consumida em todo o mundo (CHEN; LIU, 2000).

A cada fermentação forma-se um novo SCOBY na superfície do recipiente, sendo que parte do mesmo deve ser guardado juntamente com um percentual de seu líquido já fermentado para a próxima fermentação, e assim sucessivamente. Durante este processo, o chá começa a liberar aroma fermentado e há formação de bolhas de gás, resultado do gás carbônico produzido na reação (JAYABALAN et al., 2014). O tempo ideal de fermentação varia de 7 a 12 dias com temperatura entre 22 e 30 °C em recipiente aberto com proteção para que haja passagem de ar, mas sem entrada de insetos ou sujidades, como mostra Figura 1. Ao longo de sua fermentação, a kombucha desenvolve sabor ácido, originado principalmente do ácido acético, diminuindo sua aceitação sensorial. Além disso, outros ácidos orgânicos são gerados, ocasionando redução do pH da bebida (CHAKRAVORTY et al., 2016, 2019; DUFRESNE; FARNWORTH, 2000).

Figura 1 - Recipiente para fermentação de kombucha com proteção em sua superfície.



Fonte: (ORGÂNICO, 2021).

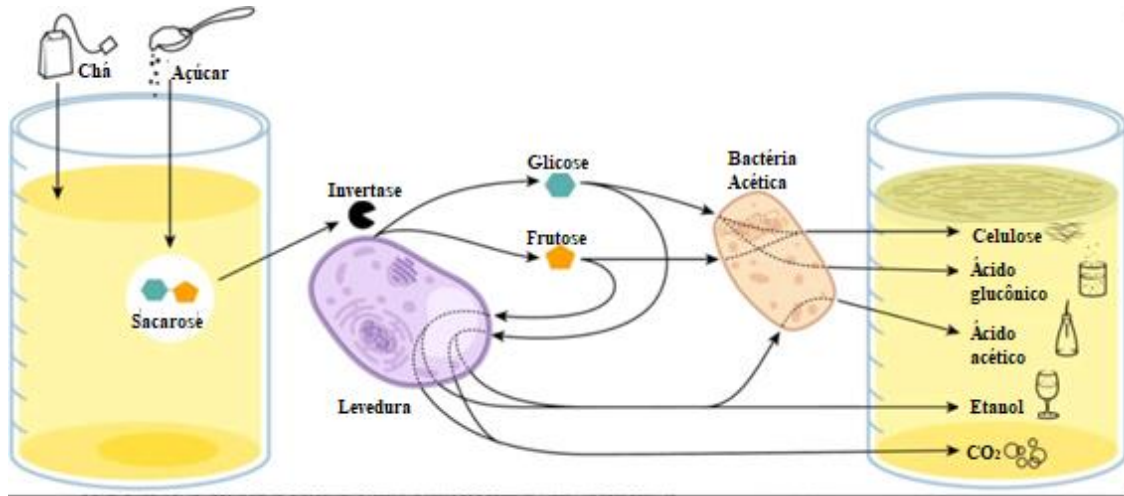
Com o crescente aumento do consumo de kombucha em escala mundial, sua preparação vem sendo modificada, utilizando plantas alternativas à *Camellia sinesis* (AHMED; HIKAL; ABOU-TALEB, 2020; JAKUBCZYK et al., 2020). Embora restrita à utilização de chá (*Camellia sinensis*) para a caracterização da bebida kombucha, como definida pela Instrução Normativa nº41/2019 (BRASIL, 2019), existem diversas variações de chás que incluem chá branco, verde, *oolong* e preto (JAKUBCZYK et al., 2020).

A composição química da kombucha varia tanto quantitativamente quanto qualitativamente, dependendo de fatores como o substrato, as concentrações utilizadas no chá inicial, os microrganismos presentes no inóculo, o tempo e temperatura de fermentação, entre outros. Porém, alguns componentes, como ácidos orgânicos, vitaminas, polifenóis e aminoácidos, estão comprovadamente presentes na maioria das kombuchas (JAYABALAN; MARIMUTHU; SWAMINATHAN, 2007). Os ácidos mais importantes produzidos durante a fermentação são o acético, glucorônico, glucônico, láctico e málico, dentre outros. (JAYABALAN et al., 2014; MARSH et al., 2014).

Alguns estudos demonstram que os microrganismos presentes na cultura inicial da kombucha podem sofrer modificações ao longo da fermentação (CHAKRAVORTY et al., 2016; COTON et al., 2017). As espécies comuns conhecidas por produzir celulose microbiana incluem *Acetobacter* (reclassificado como *Komagataeibacter*), *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Sarcina* e *Rhizobium* (JOZALA et al., 2016). Dentre o gênero *Acetobacter*, a espécie dominante mais utilizada para obtenção de celulose microbiana e também na produção de SCOBY é a *Acetobacter xylinum*, que foi reclassificada como *Gluconacetobacter xylinus* e mais recentemente como *Komagataeibacter xylinus* (VILLARREAL-SOTO et al., 2018; YAMADA et al., 2012). Em combinação simbiótica com as bactérias, diversos tipos de leveduras estão presentes na kombucha e as mais recorrentes são a *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces lambicus*, *Brettanomyces custersii* e *Candida stellate* (CHAKRAVORTY et al., 2016; LENG; HEARD; COX, 2004).

A fermentação da kombucha é realizada em duas fases: a primeira fase é o chá líquido; e a segunda é a parte sólida reconhecida como o SCOBY, que se localiza na parte superior do recipiente fermentativo. Os mesmos microrganismos estão presentes tanto no líquido quanto no SCOBY, porém em concentrações diferentes entre eles (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). O processo fermentativo é iniciado pelas leveduras que realizam a hidrólise da sacarose, convertendo-a em glicose e frutose, resultando na produção de etanol, glicerol e dióxido de carbono. Na sequência, as bactérias oxidam etanol produzindo ácido acético e transformam a glicose em ácido glucurônico (GAGGIÀ et al., 2019), a Figura 2 ilustra esse processo. Além disso, a glicose é usada por algumas bactérias, principalmente da espécie *Komagataeibacter*, para produzir um novo SCOBY (COTON et al., 2017).

Figura 2 – Ilustração do processo fermentativo da kombucha.



Fonte: Adaptado de (TRAN et al., 2020).

A kombucha é intensivamente consumida em todo o mundo, por suas supostas propriedades profiláticas e terapêuticas. A maioria das propriedades baseia-se em observações pessoais e depoimentos, porém alguns efeitos já foram demonstrados cientificamente. Um dos benefícios comprovados está relacionado à sua atividade antioxidante com potencial habilidade de eliminação de radicais livres e sua capacidade energizante, muitos deles provenientes da utilização de *Camellia sinensis* em sua matéria-prima (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000; JAYABALAN; MARIMUTHU; SWAMINATHAN, 2007). Yang et al (2009) demonstraram que houve perda de peso causada pelo consumo de kombucha quando analisado o efeito hipolipidêmico *in vivo* em ratos, o qual foi conectado à interação da kombucha com a inibição da lipase e, como resultado, uma restrição na ingestão de calorias. Dentre os resultados do mesmo estudo também houve diminuição no colesterol total e redução do número de gotículas de gordura nos ratos (YANG et al., 2009). Devido ao baixo pH e à presença de ácido acético, foi demonstrado que a kombucha apresenta propriedade antimicrobiana, e inibe o crescimento de bactérias patogênicas (BATTIKH et al., 2013; GREENWALT; LEDFORD; STEINKRAUS, 1998).

Como visto, cada fermentação sucessiva forma uma nova camada de SCOBY acima da antiga. Com isso, ao final da fermentação da kombucha,

novos SCOBYS são gerados e, com o tempo, seu excedente é descartado para não acelerar a acidificação do meio (VILLARREAL-SOTO et al., 2020; WATAWANA et al., 2015). O SCOBY é composto principalmente por celulose bacteriana, um material considerado de alto valor agregado e com diversas potencialidades de uso, e sua valorização pela crescente indústria da kombucha é relevante.

3.2 *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast* – SCOBY

O biofilme microbiano formado ao longo das fermentações da kombucha e que se mantém na superfície do recipiente, é comumente chamado de SCOBY e também conhecido por “fungo do chá”, “mãe kombucha” e “mãe do vinagre” (BLANC, 1996). Dentre os microrganismos presentes na fermentação da kombucha, as bactérias acéticas são as responsáveis por sintetizar esta rede flutuante de celulose (SCOBY) em que as principais relatadas são *Acetobacter xylinum* e *Acetobacter aceti* dentre outras (LIU et al., 1996).

A simbiose dos microrganismos presentes na kombucha é essencial para a produção do SCOBY e suas propriedades tecnológicas. No entanto, outros parâmetros afetam diretamente a produção de polissacarídeos deste filme bacteriano, tais como: condições de cultivo, concentração de carbono e nitrogênio, quantidade de oxigênio dissolvido, temperatura e pH do meio (ILLA; SHARMA; KHANDELWAL, 2019; VILLARREAL-SOTO et al., 2020; YIM; SONG; KIM, 2017). Portanto, a caracterização e otimização desses parâmetros são estudadas para se obter uma fermentação mais eficiente e produtiva do SCOBY.

A fermentação na presença do SCOBY auxilia na conversão do açúcar em ácidos orgânicos e etanol, sendo que ele próprio utiliza essa fonte de carbono para formação de uma nova membrana gelatinosa ao longo da fermentação (GOH et al., 2012). De forma estática, a película de celulose é sintetizada pelas bactérias aeróbicas na interface líquido-ar, e, cresce primeiro para fora até que a área superficial da solução esteja totalmente coberta para que, em seguida, aumente sua espessura. Portanto, a camada superior do SCOBY é sempre considerada a mais recente. Enquanto as leveduras, que

trabalham de forma anaeróbia, se localizam principalmente na parte inferior do SCOBY como mostra a Figura 3. Apenas uma porção deste SCOBY é utilizada para a fermentação conseguinte, o restante é descartado (FRANK, 1995; DUFRESNE; FARNWORTH, 2000; IGUCHI et al., 2000).

Figura 3 - Imagem do SCOBY com filamentos de levedura.



Fonte: (METZ, 2020).

Fontana et al. (1991) investigaram estimuladores da biossíntese de celulose que ocorrem naturalmente em infusões de plantas e os compostos identificados pelos autores por estimular essa produção de celulose da bactéria *Acetobacter xylinum* foram a cafeína e compostos relacionados como teofilina e teobromina. Dentre diversas plantas analisadas, a que obteve maior estímulo na produção de celulose foi a *Camellia sinensis*, que é o insumo base na fermentação de kombucha.

A produtividade do SCOBY está diretamente ligada à razão de área de superfície:profundidade do recipiente fermentativo. A produção do SCOBY aumenta com o aumento da área superficial do recipiente contendo o meio de cultura, visto que os processos metabólicos da síntese de celulose dependem de ar fresco é necessário o suprimento suficiente de oxigênio para garantir o processo fermentativo. Enquanto a temperatura também é um parâmetro de controle necessário durante o processo fermentativo, a faixa de 20-50 °C se mostrou a mais eficaz na produtividade de SCOBY (GOH et al., 2012; SOHEIR S. ABD EL-SALAM, 2012).

A quantidade de substrato – açúcares – utilizados na fermentação não apresenta uma relação linear com o crescimento do SCOBY. Quanto maior a concentração de açúcares, a partir de 100 g/L, há uma gradual diminuição do rendimento da produção do SCOBY, portando há um nível adequado de substrato para otimizar a síntese de celulose bacteriana (AL-KALIFAWI; HASSAN, 2014). O peso úmido e o rendimento do SCOBY aumentam com o tempo de fermentação, sendo progressivo até 14 a 18 dias e, após esse período, apresentam crescimento constante (ALKHALIFAWI; HASSAN, 2014; BORZANI; SOUZA, 2004)

O processo de fermentação da kombucha tradicional é feito de forma estática com a formação do filme de celulose em sua superfície (CHAWLA et al., 2009). Villarreal-Soto (2020) caracterizou o SCOBY formado no processo de fermentação comparando as condições estáticas e de agitação. As diferentes condições fermentativas não alteraram a composição da rede de celulose formada, indicando a possibilidade de obtenção de um SCOBY com propriedades mecânicas e térmicas semelhantes nos dois métodos (VILLARREAL-SOTO et al., 2020). Por outro lado, outros estudos relataram perda de resistência mecânica do biofilme quando fermentado sob agitação (CHAWLA et al., 2009; ZHANG et al., 2018).

Estudo de caracterização bioquímica do SCOBY da kombucha mostrou grande quantidade de proteína bruta, fibra bruta, aminoácidos, sódio, potássio e magnésio. Celulose e oxigênio predominaram entre os componentes e os mesmos são os responsáveis pela formação do SCOBY durante a fermentação. Com base em suas características bioquímicas, o SCOBY pode ser utilizado para formular alimentos para animais, bem como material de bioabsorção e embalagem de alimentos (JAYABALAN et al., 2010).

Pensando na utilização da celulose bacteriana proveniente do SCOBY, alguns estudos já estão sendo realizados a fim de reduzir seus custos e otimizar sua produtividade. Uma metodologia testada para redução de custos foi o reaproveitamento das folhas de chá na infusão. O estudo comparou as propriedades do SCOBY formado a partir de folhas de chá frescas e folhas de chá usadas. Os rendimentos volumétricos de CB obtidos para ambas as metodologias foram semelhantes, assim como a cinética de produção e a morfologia de suas redes de nanofibras. Esses resultados confirmam a

possibilidade de reaproveitamento das folhas de *Camellia sinensis* nas infusões do processo de fermentação, reduzindo, conseqüentemente, os custos de produção de SCOBY (SHARMA; BHARDWAJ, 2019).

Sharma et al. (2021) também compararam o processo de fermentação do método estático convencional com uma tecnologia de lote estático alimentado intermitente (LEAI), usando como meio de cultura o chá de folhas já fermentado do estudo de Sharma et al. (2019). Esta tecnologia LEAI possibilita uma alternativa de obter o fornecimento adequado de nutrientes e oxigênio de forma intermitente, resultando em um aumento considerável na celulose bacteriana produzida em comparação com o método convencional (SHARMA; BHARDWAJ; PATHAK, 2020).

Foi avaliada a influência da temperatura de secagem (25 °C, 50 °C e 75 °C) do SCOBY nas propriedades mecânicas e no tamanho da amostra. Durante a secagem, SCOBY perdeu até 92 % do peso e 87 % da espessura devido ao seu alto grau de umidade. A resistência máxima à tração foi registrada para amostras secas a 25 °C, com valor de 27,9 MPa, em que a umidade foi gradualmente removida e suas propriedades de deformação foram preservadas (SEDERAVIČIŪTĒ; DOMSKIENE; BALTINA, 2019).

Já o efeito da exposição acelerada de alta e baixa temperatura e alta umidade nas propriedades físicas e mecânicas de SCOBY foi investigado por Molina-Romero et al. (2021). As propriedades de tração do módulo de elasticidade e alongamento na ruptura mostraram mudanças significativas após o ensaio, indicando uma tendência à deformação da membrana. A morfologia das membranas manteve-se semelhante, sem fissuras em suas superfícies, mudando apenas de translúcida no início para opaca no final da exposição. O estudo sugere que testes ambientais podem ser realizados em cada polímero de acordo com seu uso pretendido para determinar uma possível aplicação (MOLINA-ROMERO et al., 2021).

As avaliações de melhores metodologias de purificação do SCOBY também foram estudadas. Amarasekara, Wang, & Grady (2020) compararam quatro métodos simples que possam ser aplicados em escala industrial para identificar as melhores condições para a purificação de SCOBY. Os autores demonstraram que as lavagens com hidróxido de sódio e o tratamento com hipoclorito de sódio diluído podem ser aplicados com sucesso para a

purificação da celulose bacteriana da kombucha (AMARASEKARA; WANG; GRADY, 2020). Sederavičiūtė, Bekampienė, & Domskienė (2019) realizaram uma análise comparativa da estrutura e propriedades da membrana de celulose bacteriana quando o pré-tratamento em água e em solução alcalina fraca (0,5 %) é aplicado. Os experimentos mostraram que procedimentos de lavagem menos agressivos e mesmo lavagem com água pura poderiam obter uma membrana de celulose bacteriana de SCOBY com propriedades muito semelhantes. Finalmente, Dima et al. (2017) conduziram um estudo que determinou que a solução de NaOH 1 M leva a aproximadamente 85 % de purificação, e uma concentração mais alta de 4 M garante quase 97 % de remoção de impurezas de SCOBY (DIMA et al., 2017; SEDERAVIČIŪTĖ; BEKAMPIENĖ; DOMSKIENĖ, 2019).

Tendo em vista os aspectos apresentados, o SCOBY se mostra um material promissor para diversas aplicações tais como: curativos (park et al 2014), condutor de materiais eletrônicos (KALAIAPPAN et al., 2019), filmes com atividade antimicrobiana (SHARMA; BHARDWAJ, 2020), membranas de filtração (MOUSAVI et al., 2019), indústria têxtil (KAMIŃSKI et al., 2020) entre outros, além de ser uma alternativa de menor custo para utilização de sua celulose microbiana (SHARMA; BHARDWAJ, 2019).

No presente trabalho não serão discutidas formas de otimizar a fermentação do SCOBY visto que será utilizado o resíduo industrial da produção de kombucha sem controle de espessura e formato pois será processado e homogeneizado para caracterização e aplicação posterior. Este resíduo é obtido a partir dos parâmetros convencionais utilizados na produção, tais como cultura estática, sacarose como substrato, temperatura de fermentação entre 24 e 28 °C e pH entre 3 e 4.

3.3 Celulose Bacteriana

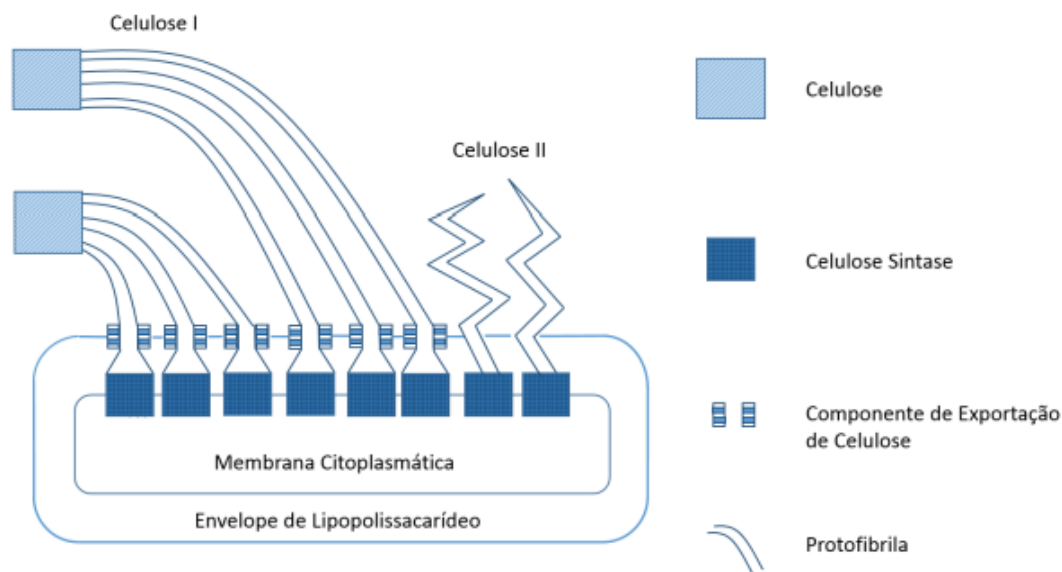
A celulose ($C_6H_{10}O_5$) é o material orgânico renovável mais abundante produzido na biosfera. É amplamente distribuída em plantas superiores, em alguns animais marinhos como tunicados e, também em algas, fungos e bactérias. Independentemente de sua origem, a celulose consiste em longas cadeias lineares homopoliméricas de centenas a 20.000 unidades de D-glicose,

nas quais o segmento de repetição, chamado celobiose, é um dímero de duas unidades de glicose unidas por ligações β (1 \rightarrow 4). O polímero linear de celulose é fortemente associado através das ligações de hidrogênio que são responsáveis pela formação das fibras de celulose. Moléculas de celulose formam ligações de hidrogênio intra e intermoleculares sendo que o primeiro tipo de interação é responsável pela rigidez da cadeia e o segundo pela formação da fibra vegetal (HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010).

A celulose bacteriana (CB) possui distintas vantagens quando comparadas a fontes tradicionais de celulose (obtidas de plantas), mesmo que ambas possuam a mesma estrutura química. A CB possui menor densidade, maiores índices de cristalinidade, capacidade de retenção de água, força mecânica (alto módulo de Young e resistência à tração) devido à sua estrutura de rede e à sua alta pureza, sendo esta última relacionada ao fato de não conter lignina, pectina e hemicelulose na sua composição (BARUD et al., 2016; IGUCHI; YAMANAKA; BUDHIONO, 2000). Esta ausência de impurezas na estrutura da CB faz com que ela seja facilmente purificada utilizando apenas hidróxido de sódio (GOH et al., 2012) ao contrário da celulose originária de plantas em que são realizadas diversas etapas de extração e purificação. Além disso, a CB foi considerada não tóxica por ingestão, contato com a pele ou inalação, e não desencadeia nenhuma outra resposta inflamatória ou oxidativa ao estresse em nível celular (DOURADO; GAMA; RODRIGUES, 2017).

A celulose é composta por regiões amorfas e cristalinas sendo que seu grau de cristalinidade varia de acordo com a fonte da celulose e com o tratamento aplicado. As formas cristalinas mais comuns são as celulosas do tipo I e do tipo II que estão distribuídas paralelas umas às outras e tem orientação planar. A celulose categorizada como tipo I é considerada a celulose nativa e assemelha-se a uma fita. Este tipo tem dois alomorfos de celulose ($I\alpha$ e $I\beta$) que são estruturalmente semelhantes. Outras variações na estrutura cristalina podem ocorrer, chamadas de polimorfismos, que são denominadas de celulose tipo II, tipo III e tipo IV. A celulose do tipo II é considerada mais estável e amorfa, ela é produzida em partes da membrana onde o componente de exportação está faltando no exterior do revestimento bacteriano, como ilustrado na Figura 4 (IGUCHI; YAMANAKA; BUDHIONO, 2000; NISHIYAMA et al., 2010).

Figura 4 - Produção de microfibrilas por *Gluconacetobacter xylinum*.



Fonte: (CHAWLA et al., 2009).

A celulose tipo I é sintetizada por plantas e por bactérias do gênero *Gluconacetobacter* sob cultura estática e possui cadeias β -D-glicopiranosose paralelas e dispostas uniaxialmente. Enquanto a celulose tipo II possui cadeias arranjadas aleatoriamente. A presença de grupos hidroxila na superfície permite a modificação da celulose com a utilização de produtos químicos. Esse processo é considerado irreversível e converte a celulose do tipo I em celulose do tipo II alterando sua morfologia para que suas propriedades mecânicas se tornem ajustáveis de acordo com sua aplicação (LAAVANYA; SHIRKOLE; BALASUBRAMANIAN, 2021; YOUNESI; WU; AKKUS, 2019).

Os principais tipos de bactérias que sintetizam extracelularmente a celulose são reconhecidas como *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Sarcina ventriculi*. Dentre estas, as mais utilizadas para a produção de celulose são *Gluconacetobacter xylinum* (anteriormente chamada de *Acetobacter xylinum*) e *Gluconacetobacter hansenii*. A biossíntese da celulose começa quando as bactérias polimerizam resíduos de glicose em cadeias lineares de ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4) e produzem uma secreção extracelular das cadeias formadas. Na sequência, eles montam e cristalizam as correntes em fitas compostas. Este processo leva à formação de uma consistente rede tridimensional ultrafina de fibras de

celulose alinhadas em paralelo à superfície de um meio líquido. Essa rede é chamada de película e sua geometria é determinada por interações intra e intermoleculares de ligação de hidrogênio, interações hidrofóbicas e de van der Waals (CZAJA et al., 2007; SALMON et al., 2006; TORRES; ARROYO; TRONCOSO, 2019).

No primeiro estágio de processo fermentativo, as bactérias produtoras de celulose se multiplicam usando o oxigênio dissolvido no líquido. Concomitantemente, os microrganismos sintetizam parte da celulose no meio líquido, entretanto apenas as bactérias localizadas na interface ar/meio mantêm essa atividade formando camadas sobrepostas e aumentando a espessura da CB ao longo do processo de fermentação. O desenvolvimento da CB continuará enquanto houver oxigênio no meio, até que se torne inativa, isto é, pare de consumir substratos e se desenvolver (ESA; TASIRIN; RAHMAN, 2014). No entanto, essa inatividade pode ser revertida quando o líquido onde a bactéria está presente é usado como inóculo em uma fermentação subsequente com um meio fornecido com oxigênio e substrato fermentativo (RUKA; SIMON; DEAN, 2012).

A síntese celulósica no processo de fermentação pode ocorrer de duas formas: em culturas estáticas ou sob agitação (TORGBO; SUKYAI, 2018). A CB é mais frequentemente sintetizada a partir de condições estáticas de fermentação, com temperaturas entre 26 e 30 °C, onde se adiciona o meio de cultura em frascos de laboratório ou recipientes específicos em que se pode definir o formato da película de acordo com a geometria da superfície do recipiente. No decorrer do processo fermentativo a CB é desenvolvida e sua espessura aumenta com o tempo (CHAWLA et al., 2009). Enquanto a CB é produzida sob cultura estática, esta película formada é suspensa pela coesão para a parede interna do recipiente e desliza continuamente para baixo à medida que engrossa sua espessura (AZEREDO et al., 2019).

O processo fermentativo alternativo é o sob condição de agitação em torno de 150 rpm para oferecer mais ar para as bactérias aeróbias (CZAJA; ROMANOVICZ; BROWN, 2004). Nesta condição de agitação a CB produzida não se torna plana na superfície do recipiente e sim em formato esférico e que aumenta constantemente com o tempo (TOYOSAKI et al., 1995). A CB produzida de forma estática demanda uma grande área superficial, sendo um

ponto negativo em sua produção. No entanto, a produção sob condição de agitação demanda um maior custo de energia para geração de potência mecânica, com isso, biorreatores de cultura mais adequados e eficazes foram desenvolvidos para diminuição de custos.

Já foram estudados os melhores substratos para o desenvolvimento de um novo tipo de tecido sustentável e ecológico a partir da síntese de CB. Foram avaliados os efeitos de quatro diferentes tipos de chás como fonte de nitrogênio: verde, preto, roibos e de seda de milho; Juntamente com a avaliação de quatro fontes de carbono: sacarose, frutose, mel e xarope de milho. O objetivo foi produzir um tecido que apresentasse espessura para manter a forma e a superfície lisa. O melhor resultado na produtividade da CB foi obtido quando utilizado chá verde e sacarose como fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente. Sendo estas as matérias-primas tradicionais utilizadas como substrato para a produção de kombucha (YIM; SONG; KIM, 2017).

Como visto, a CB é um material de propriedades promissoras e se mostra vantajoso quanto a etapas de purificação e posteriores aplicações quando comparados a outras fontes de celulose. Porém, um dos grandes fatores que dificultam sua ampla utilização é o alto custo de produção. Uma alternativa promissora com o aumento da produção e comercialização de kombucha é a possibilidade de aproveitar seu subproduto proveniente do processo fermentativo, o SCOBY.

3.4 Nanofibras de Celulose Bacteriana

Diversas pesquisas avaliam o isolamento, caracterização e a busca de aplicações de novas formas de celulose, que são comumente chamadas de cristalitos, nanocristais, *whiskers*, nanofibrilas e nanofibras (KLEMM et al., 2011). Essas nanopartículas, quando isoladas, são avaliadas como material de reforço em matrizes poliméricas pelo seu potencial em melhorar propriedades mecânicas, ópticas, dielétricas, entre outras, dessas matrizes. O principal fator determinante para a otimização do material em escala nano é a grande área superficial destes materiais, com diâmetro inferior a 1 μm , sendo chamados genericamente como nanoceluloses (TORRES; ARROYO; TRONCOSO, 2019).

Embora a celulose seja o biopolímero mais abundante na Terra, a obtenção de nanocelulose a partir de matrizes vegetais se torna mais difícil devido à presença de rede intercalada com outros biopolímeros como lignina, pectina e hemicelulose. Para remoção destes componentes, necessita-se de solventes e mais etapas para obtenção das nanofibras, tornando-os menos convenientes por razões ambientais e econômicas. A celulose obtida através de processos microbianos é muitas vezes chamada de nanocelulose devido à sua cristalinidade e às nanodimensões de suas fibras, que apresentam diâmetros que variam de 25 a 100 nm e cerca de 100 µm de comprimento (LEE et al., 2014; SEMJONOV et al., 2017).

Outra característica vantajosa da CB é que ela possui suas nanofibras aleatoriamente alinhadas nas membranas e estas podem ser facilmente orientadas uniaxialmente ou uniplanarmente se for aplicada uma tensão durante sua secagem. Quando ainda úmidas, as películas de CB podem ser facilmente desintegradas em nanofibras, diferentemente da nano ou microcelulose obtida de plantas, que precisa ser produzida a partir da homogeneização ou fibrilação para obter dimensões na escala nano (LEE et al., 2014). A principal característica da matriz de CB, é que em vez de apresentar estrutura concentrada de moléculas, ela apresenta arranjo de nanofibras, podendo ser considerada como uma estrutura supra-molecular de dimensões nanométricas (TORRES; ARROYO; TRONCOSO, 2019).

Existem três procedimentos bem conhecidos pelos quais a formação de nanocompositos de celulose bacteriana é realizada a partir de uma modificação da estrutura original desta celulose. Dentre eles estão a desintegração matricial da celulose por processo químico ou físico, a metodologia de *crosslinking* e a extração de *nanowhiskers* da celulose bacteriana (QIU; NETRAVALI, 2014; TORRES; ARROYO; TRONCOSO, 2019).

Os procedimentos para obtenção de nanofibras de celulose em que se mantém a estrutura matricial dividem-se em duas metodologias, *Bottom-up* e *Top-down*. A metodologia mais convencional é a *Top-down*, que parte de um sistema maior até chegar a subsistemas menores, ou seja, da fibra à nanofibra. Exemplos destes processos são: a utilização de hidrólise ácida, oxidação mediada por tempo, homogeneização, microfluidização e *cryocrushing*. Já a metodologia *Bottom-up* é uma abordagem utilizada na nanotecnologia, em que

são parte de uma base elementar, manipulando átomos e moléculas até se criar nanoestruturas. Dentro do *Bottom-up* estão inclusas produção de celulose bacteriana, celulose de tunicados e a técnica de *eletrospinning* (SHARMA et al., 2019).

Nanopartículas de celulose são comumente isoladas por meio de tratamento mecânico ou processo de hidrólise ácida. No tratamento mecânico, forças de cisalhamento, pressão e cavitação aplicadas em um homogeneizador de alta pressão causam clivagem transversal ao longo do eixo longitudinal da estrutura da celulose resultando em nanofibrilas de celulose (LI et al., 2012). Dima et al. (2017) com objetivo de romper mecanicamente a macroestrutura celulósica do SCOPY em nanofibras, avaliaram o efeito de três diferentes tratamentos mecânicos: atomização, moagem coloidal e microfluidização com alta pressão de 1300 bar. Foram testadas 1, 10 e 25 passagens no microfluidizador para uma maior dispersão das nanofibras de celulose e obtiveram uma redução significativa de suas fibras, chegando até a uma estrutura com fibras de celulose inferiores a 10 μm . No presente trabalho será obtida nanofibras através de metodologia *Top-down* utilizando SCOPY, já formado e desenvolvido, resíduo da indústria de kombucha combinando com o tratamento mecânico do homogeneizador de alta pressão para otimização da celulose bacteriana proveniente deste resíduo.

3.5 Aplicação de Celulose e Nanofibras de Celulose em Filmes Biodegradáveis

O desenvolvimento de novos filmes biodegradáveis a partir de polímeros, como amido, gelatina e celulose, são uma alternativa aos plásticos à base de petroquímicos, que causam sérios problemas ambientais pelo acúmulo de resíduos e tem se mostrado uma prática insustentável (HOPEWELL; DVORAK; KOSIOR, 2009). Estes polímeros naturais apresentam vantagens em comparação às sintéticas, especialmente pela sua baixa massa molar, fácil reciclagem e biodegradação (MASMOUDI et al., 2016).

As nanofibras obtidas de celulose são bastante estudadas e ganham importância devido às suas características únicas, principalmente relacionadas à sua elevada área superficial em relação ao volume e interessantes propriedades mecânicas como flexibilidade e força (VARANASI et al., 2018). Estudos otimizam a obtenção destas nanofibras a partir de resíduos industriais de fontes vegetais (PELLISSARI; MENEGALLI, 2014; VARANASI et al., 2018) de madeira (CHEN et al., 2011) e bacteriana (ROZENBERGA et al., 2016), pois se mostram como uma interessante aplicação em filmes biodegradáveis como reforço para sua estrutura.

No estudo de Orts et al. (2005), a adição de microfibrilas de celulose (algodão, madeira e bacteriana) como agentes de reforço, melhoraram significativamente as propriedades mecânicas como resistência à ensaios de tensão e alongação na ruptura dos géis e filmes poliméricos. Em outro estudo, utilizando matrizes de quitosana, foi testado o efeito da adição de nanofibras de CB na produção de filmes. Os filmes com presença de nanofibras de CB obtiveram melhores propriedades mecânicas (Módulo de Young e alongação à ruptura) que a padrão e obtiveram alta transparência e flexibilidade. Esta combinação de filmes renováveis com nanofibras de quitosana e celulose bacteriana também apresentaram estabilidade térmica e baixa permeabilidade ao O₂ (FERNANDES et al., 2009). Além disso, quando aplicadas em resina acrílica para produção de filmes com conteúdo de fibras de celulose bacteriana de até 70% resultou em um filme com alta taxa de transparência, com redução de 10% com o padrão apenas, além de coeficiente de expansão térmica baixo, indicando a celulose bacteriana como um compósito de boa flexibilidade (YANO et al., 2005).

Nanocristais de celulose (CNC) foram utilizados como reforço em filmes biodegradáveis preparados a partir de isolado de proteína de soja (SPI), glicerol e éter diglicídico de etilenoglicol (EDGE) (ZHANG et al., 2016). Propriedades mecânicas, resistência à água e estabilidade térmica dos filmes foram analisados. O módulo de Young e a resistência à tração dos filmes modificados pelos nanocristais de celulose aumentaram 128,3 e 53,0 %, respectivamente, em comparação aos filmes SPI não modificados, resultantes da formação de estruturas de ligação de hidrogênio e reticulação física entre o CNC e a matriz.

Viana et al. (2018) avaliaram as propriedades de filmes de purês de frutas (goiaba e manga) compostos por CB nanofibrilada combinadas ou não com pectina e em diferentes proporções. A substituição parcial ou total da pectina por celulose bacteriana nanofibrilada (CBNF) resultou em melhores propriedades físicas dos filmes comestíveis (aqueles com ou sem purê de frutas), tornando-os mais fortes, mais rígidos, mais resistentes à água e com maior barreira ao vapor de água. Filmes com maior conteúdo de CBNF são recomendados para aplicações em embalagens devido às suas melhores propriedades mecânicas, enquanto filmes apenas com pectina em sua matriz são recomendados para aplicações que dissoluções em água são desejadas (VIANA et al., 2018).

Nano-biocompósitos com amido de milho termoplástico (TPS) contendo nanocristais de CB foram desenvolvidos e caracterizados em termos de propriedades morfológicas, ópticas, de barreira e de tração. A adição dos nanocristais resultou em um enrijecimento dos filmes refletido por um aumento no módulo de elasticidade. A proporção de 15% em peso dos nanocristais foram adequadamente dispersos na matriz resultando em uma subsequente melhoria nas propriedades de barreira de água e oxigênio do filme (FABRA et al., 2016).

Com o objetivo de aumentar as característica hidrofóbicas de superfície da membrana da CB e, assim, melhorar suas propriedades de barreira, Tomé et al. (2010) avaliaram a preparação e caracterização de membranas de celulose bacteriana modificadas (CBM) a partir de esterificação com cloreto de hexanoil. A CBM esterificada mostrou uma hidrofobicidade aumentada, mantendo a estrutura geral da CB intocada e se observou uma redução de cerca de 50 % na permeabilidade à água para a CBM em todas as umidades relativas testadas, que variaram de 31 a 83 % UR. As membranas de CBM também apresentaram uma diminuição significativa na permeabilidade de CO₂ (57 %), O₂ (49 %) e N₂ (52 %) a 100 % de UR nas membranas de CBM quando comparadas à membrana de CB sem modificações (TOME et al., 2010).

Propriedades físico-mecânicas de filmes poliméricos utilizando CB como base foram caracterizadas e comparadas nas versões de CB pura, CB com polivinilpirrolidona (PVP) e os dois compósitos anteriores aliados ao carboximetil celulose (CMC), totalizando 3 tipos de filmes: CB, PVP-CB e PVP-

CMC-CB (BANDYOPADHYAY et al., 2018). O filme contendo apenas CB apresentou maior valor de módulo de Young (6,3 GPa), enquanto o filme PVP-CMC-CB mostrou a melhor resistência à tração (135,02 MPa) e alongamento na ruptura (20,6 %) entre os três filmes, atribuindo uma melhor propriedade mecânica à adição de CMC no filme. O filme PVP-CMC-CB foi o que apresentou o valor de Croma mais alto (147,18), indicando uma coloração mais escura – amarelada - quando comparado aos outros dois filmes, podendo ser utilizada em alimentos em que seja preferível um armazenamento com maior proteção à luminosidade, enquanto os filmes com apenas CB ou PVP-CB apresentaram cor mais pálida (105,28 e 104,04 respectivamente) e valores próximos ao padrão.

Shahmohammadi Jebel e Almasi (2016) avaliaram a morfologia da CB e demonstraram que as nanofibras de CB formam uma estrutura porosa interconectiva com tamanho de poro na faixa de 120-160 nm. Essa rede porosa permite que moléculas de agentes ativos, como o nanopartículas de ZnO neste estudo, se difundam facilmente em seu espaço interno (SHAHMOHAMMADI JEBEL; ALMASI, 2016). A grande área superficial da CB juntamente com sua alta porosidade seriam capazes de facilitar a emissão de vapores voláteis de agentes ativos, sendo assim, Moradian et al. (2017) avaliaram o efeito das membranas ativas de CB incorporadas com extratos vegetais para aumento de vida de prateleira de cogumelos *Agaricus bisporus*. As membranas ativas à base de CB exibiram propriedades antioxidantes e antimicrobianas sem estar em contato direto com os cogumelos. Alterações de cor e escurecimento, crescimento microbiano e perda de atributos sensoriais foram inibidas significativamente pelo uso de membranas ativas, mostrando a possibilidade do uso de CB com incorporação de extratos vegetais como membrana ativa em embalagens (MORADIAN; ALMASI; MOINI, 2017).

A adição de CB como agente de reforço também foi avaliada em filmes de casca de batata por Xie et al. (2020). Foram testadas diferentes concentrações de casca de batata em pó (3 a 5 %) e de CB (0, 5, 10 e 15 % baseado no pó da casca de batata). Foram observadas interações de ligação de hidrogênio entre os biopolímeros de CB e casca de batata no FTIR. A adição de 10% de CB melhorou significativamente a resistência à tração (de 5,08 MPa para 11,30 MPa e 13,87 MPa para filmes com 3 e 5 % de casca de

batata, respectivamente), mas reduziu sua permeabilidade ao vapor de água em ambas concentrações de casca de batata (de 1,7 a 1,2 g.m/Pa.h.m²). A permeabilidade ao oxigênio também teve seus valores reduzidos com adição de 10 % de CB (de 7,0x10⁻³ a 6,2x10⁻³ g/m.s.Pa) e teor de umidade (de 0,195 a 0,171 % para 3 % de casca de batata e de 0,238 a 0,184 para 5 % de casca de batata). Enquanto a estabilidade térmica dos filmes não apresentou mudanças com a adição de CB que no intervalo de 150 a 300 °C houve maior degradação. A microscopia eletrônica de varredura revelou que a concentração de 10 % de CB possuía uma compatibilidade promissora com a matriz, apresentando também melhores propriedades mecânicas e de barreira nos filmes de casca de batata. O mesmo estudo também avaliou a adição de curcumina (1 a 5 %) aos filmes de CB e casca de batata aplicados à carne de porco fresca. Os filmes apresentaram resultados promissores com a inibição efetiva da oxidação lipídica da carne mensurados pelo menor teor de malondialdeído ao longo do armazenamento (XIE et al., 2020).

O desenvolvimento de filmes comestíveis com diferentes conteúdos de nanofibras de celulose bacteriana (NFCB) foi avaliado utilizando como componente base o glucomanano konjac (GMK), um polissacarídeo biológico extraído da erva perene konjac (LIU et al., 2020). Foram testadas concentrações de 0 a 4 % (p/p) de NFCB nos filmes de GMK. A microscopia eletrônica de varredura indicou que as NFCB estavam bem dispersas nos filmes de GMK, enquanto a análise de Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho indicou as ligações de hidrogênio formadas no desenvolvimento do filme entre as NFCB e GMK. A cristalinidade e a estabilidade térmica dos filmes aumentaram com o aumento das NFCB. As propriedades mecânicas e de barreira dos filmes de GMK foram melhoradas com a adição de NFCB. De modo geral, a adição das NFCB melhorou as propriedades gerais dos filmes baseados em GMK e a concentração de 2 % de NFCB exibiu melhores propriedades, sendo consideradas um agente promissor e de grande potencial para aplicação como filmes comestíveis para embalagens de alimentos (LIU et al., 2020).

Foram avaliadas e descritas as características morfológicas, térmicas, mecânicas e de propriedades de barreira de novos compósitos formados pela adição de diferentes quantidades de nanofibras de CB em uma matriz de álcool

polivinílico/amido (PVA/amido). A obtenção das nanofibras de CB foi feita a partir da técnica de desfibrilação mecânica para um resultado com menores ingredientes nocivos nas embalagens de alimentos. O melhor desempenho mecânico foi obtido com apenas 1 % de nanofibras da CB no filme PVA/amido. Enquanto as análises de permeabilidade de vapor de água, resistência à tração e módulo de Young tiveram seus valores dobrados após adição de 2 % de CB comparados ao controle. A concentração de 2 % de CB nos filmes de PVA/amido foi proposta como material de alto potencial para aplicações em embalagens de alimentos neste estudo (CHIULAN et al., 2018)

Pradipasena et al. (2018), realizaram a caracterização de pedaços de CB considerada resíduo de uma indústria de nata de coco e avaliaram sua possível aplicação como embalagem de alimentos com valor agregado, reforçando-o com pasta de papel e/ou amido modificado. A adição de 2 % de amido de mandioca modificado catiônico melhorou os índices de resistência à tração (79 para 94,29 KN m/kg), bem como resistência à permeação do oxigênio do filme de CB (de 12 para 5 cm³/mm.m² kPa por dia), sendo um material promissor como embalagem (PRADIPASENA; CHOLLAKUP; TANTRATIAN, 2018).

Para melhorar as propriedades mecânicas e reforçar os filmes de celulose bacteriana (CB) produzidas por *Komagataeibacter xylinus*, Cazón et al. (2019) avaliaram o efeito da imersão da CB em concentrados de álcool polivinílico (PVA) e quitosana nos filmes. O PVA e a quitosana diminuíram a porosidade e aumentaram a densidade dos filmes. A adição de PVA aumentou os valores de transmitância na região UV-VIS, melhorou a transparência e a aparência visual e diminuiu a permeabilidade ao vapor de água dos filmes (3.40×10^{-11} para 1.47×10^{-11} g/m s Pa). Os filmes desenvolvidos apresentaram propriedades de barreira à luz UV e ótima aparência visual, sendo uma alternativa sugerida pelos autores para aplicação na indústria de alimentos como biopolímero ativo para evitar oxidação lipídica nos alimentos (CAZÓN; VELÁZQUEZ; VÁZQUEZ, 2019).

3.6 Embalagens biodegradáveis com uso de SCOBY

A utilização de SCOBY em filmes biodegradáveis ainda é recente e suas propriedades e possibilidades de aplicação vêm sendo estudadas. Ramírez Tapias et al. (2020) desenvolveram novos materiais biodegradáveis e ativos a partir do resíduo integral – não purificado – da fermentação da kombucha, o SCOBY. Os filmes foram produzidos a partir da técnica de *casting* e exibiram uma matriz celulósica homogênea e contínua de nanofibras em forma de fita. Além do SCOBY, foi utilizado glicerol, que otimizou as propriedades mecânicas do filme. A espectroscopia do infravermelho, análises termogravimétricas e capacidade antioxidante indicaram que as amostras eram constituídas basicamente por células com presença de compostos de baixa e alta massa molar que apresentavam alta atividade antioxidante, sugerindo que os materiais são sistemas ativos naturais provenientes da matéria prima utilizada na produção da kombucha (RAMÍREZ TAPIAS et al., 2020).

Aduri et al. (2019) propuseram o desenvolvimento de embalagens para armazenamento de alimentos a partir do SCOBY, observando sua interação com alimentos em diferentes variáveis, bem como seu poder antimicrobiano. As análises foram realizadas embalando tomates, espinafre e uvas separadamente. O SCOBY foi lavado em água corrente, seco ao sol em temperatura ambiente e depois costurado para se obter a embalagem para acomodar os alimentos como ilustrado na Figura 5. Amostras de embalagens plásticas foram utilizadas como controle. Comparando as amostras em embalagens de plástico e SCOBY, não foram observadas perdas nutricionais nos alimentos em relação à gordura, vitaminas (A, B5 e B6), minerais (zinco, ferro, magnésio e cobre) e compostos bioativos (carotenoides totais, luteína, licopeno e beta-caroteno). Uma pequena quantidade de leite foi testada como amostra líquida e colocada em um sachê preparado com o material de embalagem. No entanto, a embalagem produzida por meio do SCOBY não foi eficiente na vedação de vazamentos. Boa capacidade antibacteriana foi observada nas embalagens produzidas com SCOBY para *Bacillus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas*, mas não para *Escherichia coli* (ADURI et al., 2019).

Figura 5 - Embalagem feita de SCOBY.



Fonte (ADURI et al., 2019)

A modificação de SCOBY com a adição de bioextratos de plantas herbais foi estudada para produzir filmes de nanocelulose antibacteriana totalmente natural. O SCOBY obtido pela fermentação com chá preto foi purificado e colocado em solução com o extrato vegetal para adsorção de seus princípios ativos. A análise Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos filmes modificados revelou a presença de uma camada turva de bioextratos na rede de nanofibras do SCOBY. Os filmes adicionados dos bioextratos mostraram considerável atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* e *Aerococcus viridians*, sendo o extrato da *Terminalia arjuna* o mais eficaz (SHARMA; BHARDWAJ, 2020).

A adição de proteínas de origem vegetal, como proteína isolada de soja (PIS) e proteína de cogumelo (PC) em SCOBYs, foi estudada a fim de desenvolver um tecido similar ao couro, de CB, ecologicamente correto e melhorar sua durabilidade. As quantidades de PIS e PC foram determinadas como sendo 20 e 50% em peso de CB, respectivamente. A durabilidade, flexibilidade e recuperação de vincos do couro de CB aumentaram após o aprisionamento dos dois tipos de proteínas vegetais testadas. Porém, o filme obtido a partir do aprisionamento de PC revelou resultados mais competitivos quando comparado ao couro bovino, sendo considerado um material promissor (KIM; SONG; KIM, 2021).

Os procedimentos para implantação de filmes e embalagens biodegradáveis provenientes de SCOBY ainda precisam ser aprimorados de forma a tornar o produto mais aplicável e com menor custo para a indústria (AZEREDO et al., 2019; RAMÍREZ TAPIAS et al., 2020). A aplicação da CB obtida pelo método convencional em filmes e revestimentos já foi estudada, e a maioria envolve o uso da celulose bacteriana dissociada, seja em suspensão com água ou na forma de pó (FABRA et al., 2016; VIANA et al., 2018). A técnica de *casting* é a mais comum para formar filmes a partir de CB dissociada, que consiste em verter uma dispersão filmogênica sobre uma superfície adequada, normalmente uma placa de acrílico e evaporar o solvente (AZEREDO et al., 2019; DE MORAES et al., 2013),

O amido de mandioca é considerado uma boa matéria-prima para elaboração de filmes devido a sua baixa temperatura de gelatinização, em torno de 60 °C, referentes à quantidade de amilose, ao grau de cristalinidade e ao comprimento das cadeias de amilopectina (ZHOU et al., 2002). Porém, estes filmes elaborados apenas com amido são quebradiços e pouco flexíveis, sendo necessária a utilização de agentes plastificantes para reduzir sua fragilidade e melhorar suas características mecânicas (ARVANITTOYANNIS; BILIADERIS, 1999). Aliado ao plastificante, as propriedades mecânicas e de barreira podem ser melhoradas incorporando nanocelulose bacteriana aos filmes de amido (STARK, 2016). Visto isso, o presente trabalho caracterizará o resíduo industrial de kombucha, o SCOBY, e avaliará o efeito da adição da nanocelulose proveniente do SCOBY nas propriedades dos filmes de amido.

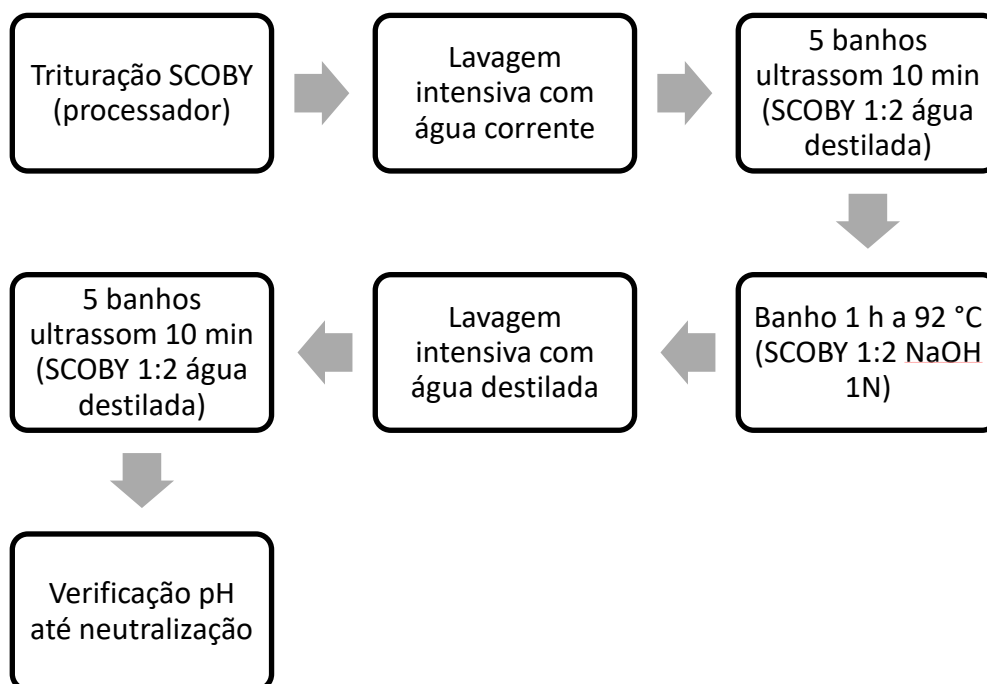
4. MATERIAIS E MÉTODOS

A matéria prima utilizada no presente trabalho foi o resíduo industrial de SCOBY cedido pela empresa Tao Indústria de Bebidas Ltda de Porto Alegre – RS. O SCOBY foi sintetizado a partir de fermentação estática e utilização de chá verde, chá preto e açúcar cristal como substratos. O material foi retirado na própria indústria, transportado em embalagens apropriadas até o Laboratório de Compostos Bioativos e Processamento de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) e armazenado sob refrigeração até seu uso.

4.1 PURIFICAÇÃO DO SCOBY

A purificação do SCOBY consistiu basicamente na remoção de componentes como proteínas e açúcares que estão ligadas à celulose bacteriana. A remoção destas impurezas foi realizada a partir da metodologia adaptada de Rozenberga et al. (2016) e as etapas estão descritas no fluxograma da Figura 6.

Figura 6 – Fluxograma da etapa de purificação do SCOBY



A etapa de trituração do SCOBY foi realizada em processador convencional (Walita, Philipps), enquanto a etapa de ultrassom foi realizado no equipamento Unique, USC 1400A. Após lavagens, foi verificado se o pH estava neutro (6-7) para finalizar a etapa de purificação, se não, mais lavagens com água destilada foram realizadas até a neutralização. Para validação do processo de purificação, foi utilizado ao longo dos testes, a análise de proteínas pelo método de Kjeldahl até que só restasse traços de proteínas na amostra purificada, além de uma observação visual do SCOBY transparente e cristalino. Para facilitar a posterior caracterização, as amostras foram nomeadas como SCOBY íntegro (SI) sendo a versão anterior à etapa de lavagem e purificação e SCOBY purificado (SP) após o processo de purificação.

Posteriormente as amostras foram secas em estufa a 105 °C por 24 horas e triturada em moinho de facas (SL – 31 Solab Científica) para obtenção de uma farinha homogênea, e, armazenadas em embalagem a vácuo para análise de composição centesimal. Para as demais análises de caracterização foi utilizado o SCOBY liofilizado, congelado a -70 °C e triturado no moinho de facas.

4.2 OBTENÇÃO DE NANOFIBRAS

Após purificação, a celulose bacteriana foi diluída em água destilada na proporção 1:2 e triturada em homogeneizador Ultra-Turrax (Ika, T25, China), por 5 min (3 repetições) a 15000 rpm com haste (S 25 N – 25 G) para melhor dispersão da celulose bacteriana como pré-etapa de homogeneização, a qual foi denominada SP0. Para obtenção das nanofibras, foi utilizado um homogeneizador de alta pressão (NS 1001 L – Panda 2K, GEA Niro Soavi Brasil). Foram realizadas 10, 20 e 30 passagens da amostra no homogeneizador com pressão de 600 bar, maior pressão atingida no equipamento utilizado, para avaliação das melhores condições e caracterização das nanofibras (DIMA et al., 2017; OKIYAMA; MOTOKI; I, 1993). As amostras purificadas que passaram pelo turrax e pelo homogeneizador de alta pressão foram denominadas de acordo com seu

número de passagens, sendo SP10 (10 passagens), SP20 (20 passagens) e SP30 (30 passagens).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO SCOBYS E DAS NANOFIBRAS OBTIDAS

As análises de caracterização dos SCOBYS foram realizadas com as amostras de 1 - SCOBYS Integro (SI) e 2 - SCOBYS Purificado (SP), com o objetivo principal de avaliar o efeito da etapa de purificação em sua estrutura, composição centesimal e estabilidade térmica.

Já a caracterização das nanofibras obtidas foi realizadas nas seguintes amostras: 3- SCOBYS Purificado somente passagem ultraturrax (SP0), 4- SCOBYS Purificado 10x passagem homogeneizador (SP10), 5- SCOBYS Purificado 20x passagem homogeneizador (SP20), 6- SCOBYS Purificado 30x passagem homogeneizador (SP30).

4.3.1 Composição Centesimal do SCOBYS

Para caracterização do SCOBYS, íntegro e após o processo de purificação, inicialmente foi determinado o teor de umidade por diferença de peso após secagem em estufa a 105 °C. Em seguida foram realizadas análises de acordo com os métodos da AOAC (2005). O teor de proteínas foi determinado pelo método de Kjeldahl ($N \times 6,25 \%$). O teor de lipídeos foi determinado pela método de Bligh & Dyer (BLIGH; DYER, 1959) e o teor de cinzas determinado em mufla (modelo 312.6SO ML1729, Elektro ThermLinn, Alemanha) a 550 °C. As fibras totais alimentares foram determinadas através do Kit enzimático gravimétrico da Aldrich (Kit Total DietaryFiber, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). O conteúdo de carboidratos foi determinado por diferença.

4.3.2 Características Morfológicas

As análises de microestrutura foram realizadas junto ao Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da UFRGS, por meio do uso de Microscopia

Eletrônica de Varredura (MEV) para avaliação da microestrutura do SCOPY e das nanofibras obtidas após passagens no homogeneizador de alta pressão. As amostras liofilizadas foram colocadas em suportes de alumínio e metalizadas com uma camada de 92 Å de ouro para melhorar a sua condutividade, sob tensão de aceleração de 5 e 10 kV de acordo com metodologia de Tibolla *et al.* (2014).

4.3.3 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica das amostras foi realizada em analisador termogravimétrico (modelo TGA-50, Shimadzu, Japão) sob fluxo de nitrogênio, com uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ da temperatura ambiente até 600 °C. Ao final, a perda de peso foi calculada pela porcentagem (%) em relação ao peso inicial das amostras e um gráfico de temperatura (°C) por perda de peso (%) foi plotado (TONGNUANCHAN *et al.*, 2015).

4.4 ELABORAÇÃO DOS FILMES BIODEGRADÁVEIS DE AMIDO COM ADIÇÃO DE NANOFIBRAS DE CELULOSE

Os filmes foram elaborados à base de amido de mandioca (Yoki Alimentos, São Paulo, Brasil), pelo método de *casting* utilizando glicerol (Sigma, São Paulo, Brasil) como plastificante. A solução filmogênica à base de amido (4 g/100 g) foi submetida a agitação mecânica por 30 minutos a 80 °C para gelatinização, em seguida o plastificante (0,1 g/g de amido) foi adicionado, obtendo assim a solução filmogênica controle. Para elaboração dos filmes contendo nanofibras de celulose, diferentes concentrações das mesmas foram adicionadas à solução filmogênica controle (1, 3 e 5,0% (p/v) de nanofibra bacteriana obtida anteriormente por volume de amido). Para uma avaliação da efetividade do homogeneizador de alta pressão nas fibras de CB, filmes de amido adicionado das amostras de CB com apenas passagem no ultraturrax foram elaboradas nas mesmas concentrações das adições de nanofibras (1, 3 e 5,0% (p/v) de celulose bacteriana – SP0 - por volume de amido). Amostras

das soluções foram colocadas em placas acrílicas (24 g.cm⁻²) e secas em estufa com circulação forçada (DeLeo, modelo B5AFD, Brasil) a 35 °C por 16 h (DICK et al., 2015).

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

4.5.1 Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas de tensão de ruptura no ensaio de tração e percentual de alongamento na ruptura foram avaliadas em texturômetro (TA.XT2i e Stable Micro Systems, UK) com uma célula de carga de 5 kg, uma distância inicial entre as garras de 50 mm e velocidade de tração de 0,8 mm/s. Os filmes foram cortados em tiras (100 x- 25 mm) e a espessura medida com micrômetro digital (DIGIMESS, IP40, Precision 0,001 mm, resolução / 0 mm - 25 mm, Brasil) em cinco posições aleatórias de cada tira. A resistência à tração (TS) e o percentual de elongação na ruptura (ER) foram determinados a partir de dez tiras de cada filme de acordo com metodologia descrita por ASTM D882-09 (2009).

4.5.2 Propriedades Ópticas (Cor e Opacidade)

A opacidade foi determinada pela medida da absorvância dos filmes a 210 e 600nm utilizando um espectrofotômetro de UV (Shimadzu UV-1800). Os filmes foram cortados em um retângulo e colocados diretamente em uma célula de teste de espectrofotômetro. Uma célula de teste vazia foi usada como referência. A opacidade dos filmes foi calculada dividindo os valores da absorvância (nm) pela espessura do filme (mm) (PAGNO et al., 2015). A cor foi determinada com colorímetro (sistema Hunter Lab, modelo Miniscan XE, EUA) operado com D65 (luz do dia) e utilizando os parâmetros de cores CIELab, onde L^* (luminosidade), a^* (vermelho-verde) e b^* (amarelo-azul) foram determinados. A diferença de cor (ΔE) foi calculada de acordo com a equação 1 (ROTTA et al., 2009).

$$\text{Equação (1:)} \quad \Delta E^* = [\Delta L^*2 + \Delta a^*2 + \Delta b^*2]^{1/2}$$

4.5.3 Permeabilidade ao vapor de Água

A permeabilidade de vapor de água (PVA) foi determinada gravimetricamente de acordo com o método descrito por Mei *et al.* (2013). As amostras foram colocadas em células de permeação (diâmetro interno = 63,5 mm, altura = 25 mm) preenchidas com cloreto de cálcio anidro granular e hermeticamente seladas. As células de permeação foram colocadas numa câmara de vidro com uma solução saturada de cloreto de sódio para obtenção de gradientes de HR de 0 % / 75 % a 25 °C. O ganho de massa foi determinado pesando a permeação celular em balança analítica (AY 220, Shimadzu) em intervalos de 2 h durante o período de 24 h. A permeabilidade ao vapor de água das amostras foi determinada em triplicata usando a Equação 2.

Equação (2):
$$PVA = (W \cdot L) / (A \cdot T \cdot \Delta p)$$

onde W é a massa da água que permeia o filme (g), L é a espessura do filme (m), A é a área de permeação (m^2), t é o tempo de permeação (h) e Δp é a diferença de pressão de vapor de água entre os dois lados do filme (Pa).

4.5.4 Solubilidade em Água

Para determinar a solubilidade dos filmes em água, as amostras (discos de 2 cm de diâmetro) foram previamente secas em estufa (DeLeo, TLK48, Brasil) a 105 °C por 24 horas. Em seguida, as amostras remanescentes do processo de secagem foram imersas em água destilada (30 mL) sob leve agitação (25 °C / 24 h) (Nova técnica, NT145, Brasil). Todas as amostras foram novamente submetidas à secagem (105 °C / 24 h), onde o material não solubilizado foi pesado para a determinação do peso final seco resultante do processo de solubilização (ASSIS *et al.*, 2018). A solubilidade foi calculada a partir da equação (3):

Equação (3): $S (\%) = [(m_f - m_o)/m_o] \times 100$

Onde: m_o é a massa inicial da amostra seca de filme e m_f é a massa seca remanescente após a etapa de solubilização.

4.5.5 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica dos filmes foi analisada usando metodologia termogravimétrica e realizada sob fluxo de nitrogênio em um modelo Shimadzu Instrument TGA-502, com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min desde a temperatura ambiente até atingir 600 °C. Ao final, a perda de peso foi calculada pela porcentagem (%) em relação ao peso inicial das amostras e um gráfico de temperatura (°C) por perda de peso (%) será plotado.

4.5.6 Características Morfológicas

As análises de microestrutura foram realizadas junto ao Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da UFRGS, por meio do uso de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para avaliação da microestrutura dos filmes elaborados. Os filmes foram colocados em suportes de alumínio e metalizadas com uma camada de 92 Å de ouro para melhorar a sua condutividade, sob tensão de aceleração de 5 kV de acordo com metodologia de Tibolla *et al.* (2014).

4.5.7 Biodegradabilidade

A avaliação da biodegradabilidade foi realizada para os filmes obtidos a partir da adição das amostras SP0 e SP30 de celulose bacteriana. O método empregado foi baseado na avaliação da biodegradação dos filmes quando os mesmos são enterrados e expostos à microflora natural encontrada no solo, de acordo com metodologia empregada por Martucci e Ruseckaite (2009). Para isso, caixas de plástico compartimentadas (5,5 cm × 6 cm × 6,5 cm) e com área superficial de 33 cm² foram preenchidas com solo orgânico natural (Vida

Ecological Development Ltda, Brasil), que foi utilizado como meio de degradação de substrato para filmes. Os filmes foram recortados em retângulos (2 cm x 3 cm) e secos em estufa (modelo TLK48, DeLeo, Brasil) a 60 °C até peso constante (m_0). Em seguida, foram acondicionados separadamente em recipientes (3 cm x 4 cm) feitos de malha de aço de 2 mm, que foram previamente secos durante 48 h a 60 °C e pesados antes de serem adicionados da amostra de filme. Os recipientes contendo as amostras foram adicionados aos compartimentos de plástico contendo solo e enterrados a uma profundidade de 4 cm da superfície do solo. A cada 3 dias, o conjunto malha/filme foi retirado do solo, lavado com água destilada para remover as partículas do solo e seco a 60 °C até peso constante (m_t). O solo será mantido em 40% de teor de água. A perda de peso dos filmes (%) após a biodegradação do solo foi determinada pela equação (4):

Equação (4): $WL(\%) = [(m_t - m_0)/m_0] \times 100$

Onde: m_0 é a massa inicial da amostra seca de filme e m_t é a massa seca remanescente no tempo de 3,6,9 ou 12 dias (MARTUCCI; RUSECKAITE, 2009a).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram submetidos à análise estatística usando ANOVA e teste de comparação de médias de Tukey ao nível de 5% de significância, através do programa *Statistica* 12.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

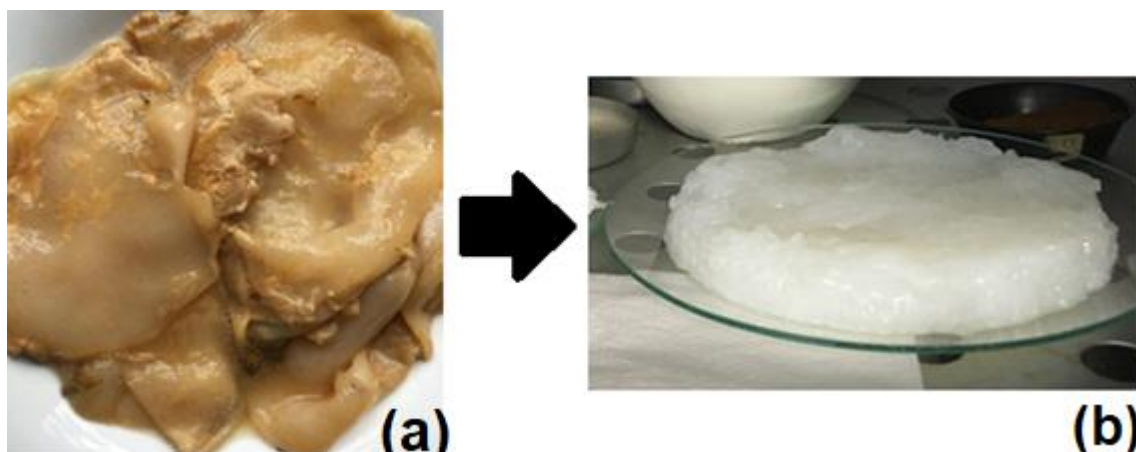
5.1 Caracterização do SCOPY e das Nanofibras Obtidas

5.1.1 Composição Centesimal do SCOPY

Existem diversas metodologias utilizadas para a purificação e aproveitamento de celulose, tais como tratamento alcalino, ácido, com solventes específicos, entre outros. O tratamento com hidróxido de sódio aquoso é o método mais utilizado para purificação de celulose e hemicelulose em celulose de fontes vegetais (RHIM; NG; RHIM, 2007). Da mesma forma, este tratamento alcalino auxilia na remoção de taninos e polifenóis, bem como células de leveduras, proteínas e açúcares que podem estar presentes no SCOBY e são consideradas impurezas para utilização posterior da sua celulose bacteriana (AMARASEKARA; WANG; GRADY, 2020).

O SCOBY, em sua forma original, adquire uma coloração marrom devido às melanoidinas presentes na kombucha, resultado da reação não enzimática entre aminoácidos e açúcares redutores provenientes dos insumos utilizados no processo fermentativo (DIMA et al., 2017). Esta coloração pode ser visualizada na Figura 7, que apresenta o SCOBY antes e após a etapa de purificação.

Figura 7 - SCOBY íntegro (a) e após etapa de purificação e pré-secagem em estufa (b).



Amarasekara et al. (2020) avaliaram 4 diferentes metodologias de purificação do SCOBY, porém em todas elas foi utilizado NaOH 1N em sua primeira etapa para remoção de impurezas modificando sua temperatura (23 °C e 90 °C). As etapas posteriores também avaliadas foram de adição de NaOCl e H₂O₂, para ação de branqueamento do SCOBY. Quando comparadas

as temperaturas de banho de NaOH 1N, a eficiência de remoção de impurezas e maior índice de brancura foi alcançado no banho de 90 °C por 1 hora, sendo estas condições selecionadas e utilizadas no presente trabalho. O SCOBY purificado (Figura 7b) foi obtido após banho com NaOH 1N e 92 °C e lavagens com água destilada até neutralização de seu pH.

Os resultados da composição centesimal do SCOBY antes e depois do processo de purificação são importantes para a validação do método de purificação e estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição Centesimal do SCOBY íntegro e purificado

	SCOBY íntegro	SCOBY purificado
Cinzas (b.s)	1,04 ± 0,00 ^a	1,05 ± 0,00 ^a
Proteína (b.s)	5,07 ± 0,07 ^a	0,56 ± 0,04 ^b
Lipídios Totais (b.s)	3,36 ± 0,55 ^a	0,51 ± 0,11 ^b
Carboidratos (b.s)	19,56	0,55
Fibras Alimentar Total (b.s)	70,97 ± 0,21 ^a	97,33 ± 1,65 ^b
Umidade	97,92 ± 0,05 ^a	98,91 ± 0,05 ^b

Os valores representam a média (g/100g) ± desvio padrão, das análises realizadas em triplicata.

(b.s) = valores estabelecidos em base seca.

Na literatura as caracterizações existentes da composição do SCOBY são, em grande parte, da sua composição microbiana (COTON et al., 2017), do impacto de diferentes substratos fermentativos (YIM; SONG; KIM, 2017), ou de formas de otimizar sua produtividade (AL-KALIFAWI; HASSAN, 2014). A caracterização de composição centesimal não é comum devido ao interesse em suas propriedades tecnológicas referentes à celulose bacteriana e, apenas recentemente, seu interesse como possível ingrediente alimentício tem sido relatado.

O estudo da composição do SCOBY, como um possível ingrediente alimentício, foi realizado por Jayabalan et al. (2010), onde avaliaram suas propriedades bioquímicas com intuito de utilizá-lo para enriquecimento

nutricional de ração animal. Foram estudados e quantificados os perfis de aminoácidos, além da composição de proteína bruta (23,1 %), fibra bruta (14,79 %), lipídio bruto (5,4 %) e cinzas (3,9 %) no 21º dia de fermentação. Os valores de fibra bruta encontrados neste estudo são apenas uma porção das fibras analisadas, visto que foram também quantificados valores de fibra de detergente ácido (32,9 %) e fibras de detergente neutro (38,9 %). Na Tabela 1 pode-se observar que o SCOBY apresentou 70,97 % de fibras totais em sua composição, valor obtido através do método enzimático de fibra dietética, sendo o principal macronutriente em sua estrutura. A metodologia para obtenção de fibra dietética se difere da utilizada por Jayabalan et al. (2010), visto que a fibra dietética compreende o somatório do material vegetal na dieta que é resistente à digestão enzimática. Este material inclui celulose, polissacarídeos não celulósicos, como hemicelulose, substâncias pécticas, gomas, mucilagens e um componente não carboidrato, a lignina (DHINGRA et al., 2012).

Já para o SCOBY purificado foi obtido o valor de 97,33 % de fibras totais. Estes valores estão de acordo com a literatura e comprovam que a celulose bacteriana é formada por milhares de fibras e cadeias de celulose (CHAWLA et al., 2009) e que a celulose é uma fibra insolúvel (DHINGRA et al., 2012). Contudo, outros valores de fibras totais dietéticas (analisadas pelo método enzimático) do SCOBY (com ou sem purificação), sem adição de outros componentes em sua estrutura, não foram encontrados na literatura. A celulose bacteriana é considerada uma fibra dietética “GRAS” – geralmente reconhecido como seguro – pela *Food and Drug Administration* (FDA) desde 1992 (ULLAH; SANTOS; KHAN, 2016).

A composição centesimal apresentou uma remoção de 94,22 % de impurezas (somatório de lipídios, proteínas e carboidratos) do SCOBY após o processo de purificação. O hidróxido de sódio não age sobre a remoção das cinzas do SCOBY, sendo o único dos componentes que não obteve diferença significativa entre seus resultados pré e pós purificação. Os valores de cinzas obtido no SCOBY íntegro foi de 1,5 %, valor inferior ao encontrado por Jayabalan et al. (2010) de 3,9 % no 21º dia de fermentação. Contudo, o conteúdo de cinzas relatado no mesmo estudo para 7 e 14 dias de fermentação foi de 0,83 % e 2,9 % respectivamente. Estes valores estão de acordo com os

tempos de processo fermentativo mais utilizados para kombucha que são relatados entre 7 e 10 dias (VILLARREAL-SOTO et al., 2018). Enquanto para a celulose bacteriana Mitrofanov et al. (2010) obtiveram 1,0 % de cinzas em sua amostra, valor próximo ao encontrado no SCOBY purificado (1,05 %) do presente trabalho (MITROFANOV; BUDAEVA; SAKOVICH, 2010).

A aplicação mais conhecida em alimentos da celulose bacteriana é o consumo de sua forma integral como sobremesa indígena das Filipinas, chamada nata de coco. Ela é preparada pela fermentação da água de coco com a bactéria *Acetobacter xylinus*, a mesma presente primordialmente na cultura microbiana da kombucha, até que se forme uma camada de celulose bacteriana de 1 cm de altura e são servidos em quadrados de 1 cm x 1 cm com uma calda de açúcar, xarope ou geléia (NUGROHO; AJI, 2015; SHI et al., 2014). A Nata de coco é considerada uma fibra alimentar (MESOMYA et al., 2006) devido ao seu teor de fibra referente à celulose presente em sua estrutura. Um estudo avaliando diferentes fontes de nitrogênio na produção da nata de coco mostrou uma concentração de 2,99 % a 4,71 % de fibra bruta (pelo método detergente) em sua estrutura (SURYA et al., 2020) sendo um valor inferior ao encontrado de fibra bruta (14,79 %) por Jayabalan et al. (2010) devido ao processo de Nata de coco ser adicionado de calda de açúcar em sua composição.

Okiyama et al. (1992) avaliaram as propriedades físicas da celulose bacteriana e encontraram valores de 99,1 % de umidade – sendo 98,8 % água livre - e 0,9 % de celulose em sua estrutura, analisados a partir de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (OKIYAMA; MOTOKI; YAMA, 1992). Pela análise de composição centesimal, os valores de umidade obtidos, no presente trabalho, para o SCOBY íntegro e purificado foram de 97,92 % e 98,91 %, respectivamente. Quando avaliado o impacto do processo de purificação por NaOH nas amostras, Amarasekara et al. (2018) observaram um maior ganho de peso úmido após as lavagens, o que pode ser devido à abertura de poros da estrutura da celulose fazendo com que se absorvesse mais água e os próprios íons de sódio (AMARASEKARA; WANG; GRADY, 2020).

Os estudos comumente realizados de caracterização da celulose bacteriana são referentes às suas propriedades tecnológicas, mecânicas, grau de pureza e cristalinidade. Quanto à sua composição centesimal de valores de

proteína pelo método de Kjeldahl não há estudos suficientes para comparação direta, embora estudos relatem a presença de aminoácidos e proteínas extracelulares na celulose bacteriana referente ao processo de formação da celulose bacteriana (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Os valores obtidos no presente trabalho foram de 5,07 % \pm 0,07 para o SCOBY íntegro e de 0,56 % \pm 0,04 para o SCOBY após processo de purificação, uma redução de 89 % no teor de proteínas o que confirma o elevado grau de pureza do SCOBY. Análises de propriedades tecnológicas para aplicações posteriores em alimentos não foram realizadas no presente trabalho devido ao menor prazo de atividades ocasionado pela pandemia do COVID 19.

Entretanto, valores de composição centesimal são interessantes para caracterização do SCOBY visto que sua composição é formada majoritariamente por fibras alimentares que podem ser aproveitadas tanto em sua forma úmida para preparações culinárias (TORÁN-PEREG et al., 2021), como em sua forma seca para aumentar os teores de fibra de uma formulação.

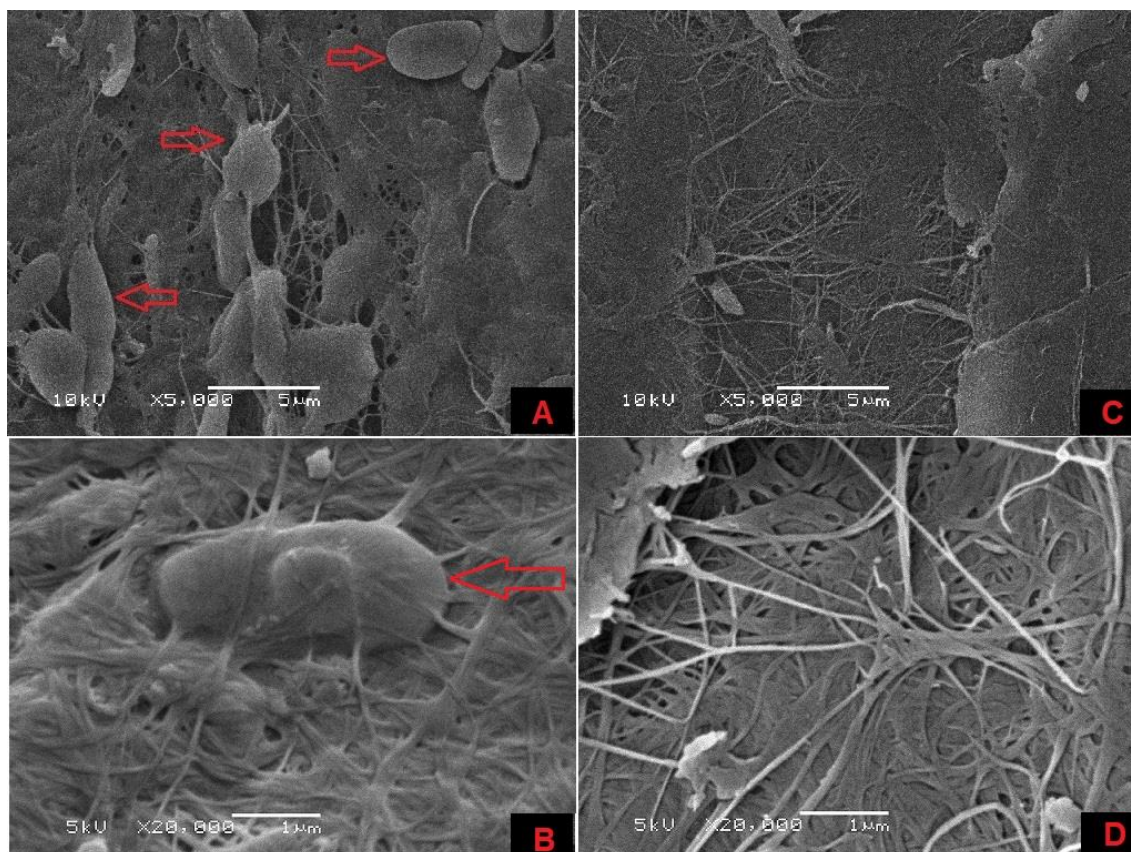
5.1.2 Características Morfológicas

A análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) oferece informações visuais importantes quanto à morfologia das redes de celulose e as modificações causadas em sua matriz após algum tratamento ou adição de componentes. O SCOBY obtido através da fermentação da kombucha atua como uma fonte de nutrientes tais como proteínas, enzimas extracelulares, leveduras entre outros (FLEMMING; WINGENDER, 2010; JAYABALAN et al., 2010). Esses componentes representam uma importante fonte de energia durante o processo fermentativo da kombucha; no entanto, eles são considerados impurezas, uma vez que permanecem aderidos à estrutura da película como vistos na Figura 8.

As imagens da Figura 8 apresentam magnificação de 5.000x e 20.000x dos SCOBYs liofilizados antes e após o processo de purificação. Nela pode-se observar a eficácia do processo de purificação onde os componentes considerados impurezas (leveduras, açúcares, proteínas) foram removidos da superfície da película e estão representados pelas flechas vermelhas. Além das

impurezas, nota-se a estrutura da celulose bacteriana com seus emaranhados de microfibrilas de diâmetro menor do que 100 nm como já observados em outros estudos, sendo um diferencial quando comparado a estruturas de celulose vegetal (DIMA et al., 2017; GOH et al., 2012).

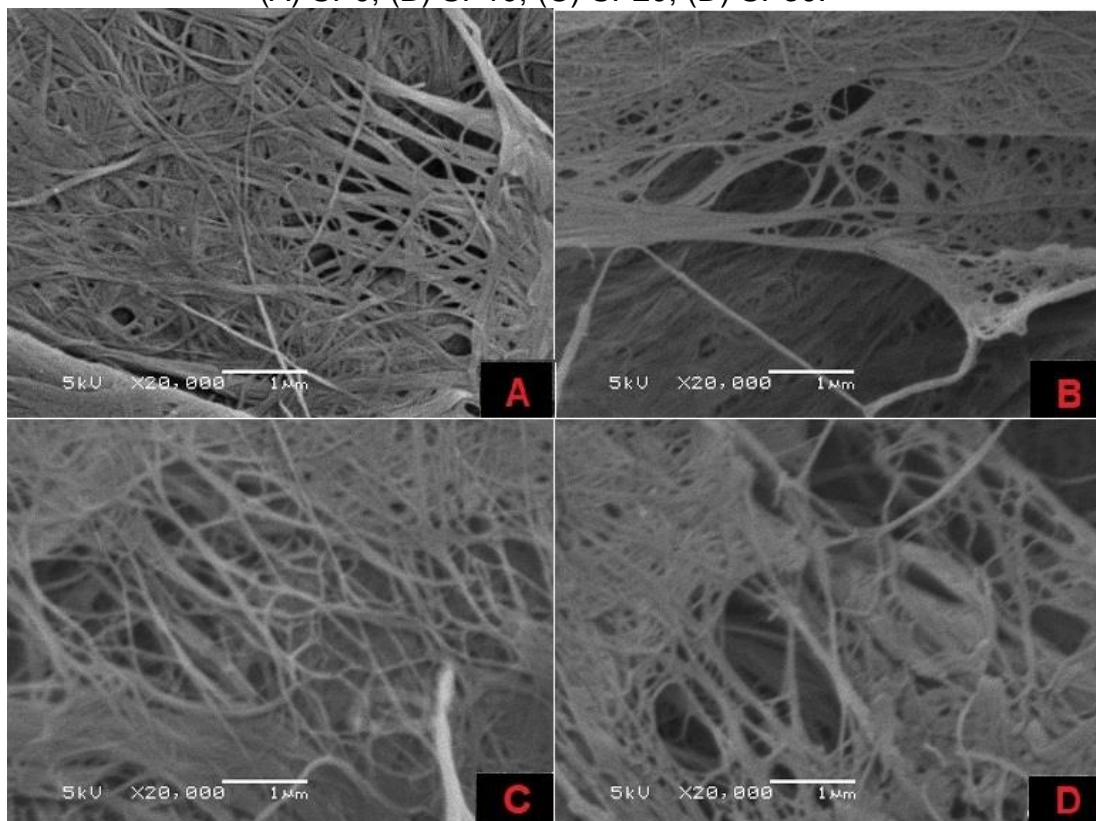
Figura 8 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura. SCOBY Íntegro A: 5.000x e B: 20.000x; SCOBY Purificado C: 5.000x e D: 20.000x.



O processo de purificação é relevante para as propriedades da celulose bacteriana do SCOBY, visto que uma maior presença de células microbianas pode diminuir o contato entre as fibrilas dentro de sua rede, reduzindo o número de ligações de hidrogênio e, portanto, a resistência das nanofibras de sua estrutura (VILLARREAL-SOTO et al., 2020). Shehata et al. (2007) também avaliaram a partir de MEV a modificação da estrutura do SCOBY após tratamento com NaOH 1N a 90 °C em que as impurezas foram removidas e isso pode ser visualizado na Figura 8 (SHEHATA; ALI, 2007).

A Figura 9 ilustra as amostras de SCOBY Purificado que passaram por tratamento mecânico somente de ultraturrax – SP0; além disso, ilustra as amostras que passaram pelo homogeneizador de alta pressão 10x, 20x e 30x (posteriormente ao ultra turrax), sendo codificadas como SP10, SP20 e SP30, respectivamente. As imagens foram realizadas com aceleração de 5 kV e aproximação de 20.000x, para uma comparação visual e dimensionamento da estrutura e nanofibras de celulose presentes. Componentes considerados impurezas na estrutura como leveduras e aminoácidos visualizados na amostra do SCOBY íntegro, não são visualizadas nas amostras da Figura 8, corroborando com a eficácia da purificação e de disposição das nanofibras.

Figura 9 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura das nanofibras obtidas com aceleração de 5 kV e 20.000x de aproximação. (A) SP0; (B) SP10; (C) SP20; (D) SP30.



Dima et al., (2017) avaliaram a morfologia do SCOBY antes e após purificação com NaOH 4N, bem como após tratamentos mecânicos leves de liquidificador, moinho coloidal e, com homogeneizador de alta pressão a 1300 bar com passagens de 1, 10 e 25 vezes. Nas membranas de SCOBY íntegro

foram visualizadas melanoidinas que cobriam partes da membrana e se intercalam com a rede de celulose. Quando observado o efeito da lavagem com NaOH 1N, ainda se visualizaram microcristais que não foram removidos, contudo não foi aplicada alta temperatura neste estudo em conjunto com a lavagem de NaOH, o que pode ter limitado o efeito da purificação. As dimensões das fibras causadas no SCOBY após os tratamentos mecânicos com liquidificador e moinho coloidal foram de comprimentos variando entre 0,5-2 mm e 50-500 μm , respectivamente. Quando avaliada a dimensão, a partir das imagens de MEV, após passagens no homogeneizador a 1300 bar, foram encontrados comprimentos de 100-500 μm para 1 passagem, 60-100 μm para 10 passagens e após 25 passagens no homogeneizador não foram encontradas microestruturas de fibrilas de celulose com tamanho maior que 10 μm (DIMA et al., 2017).

Okiyama et al. (1993) utilizaram homogeneizador de alta pressão variando de 100 a 550 bar na suspensão de celulose bacteriana para avaliação de suas propriedades tecnológicas. A análise morfológica identificou microfibrilas de 20-100 nm de diâmetro com comprimento de >50 μm após a desintegração da suspensão na passagem pelo homogeneizador 30 vezes (OKIYARNA; MOTOKI; I, 1993)

A celulose obtida a partir de processos microbianos já são, muitas vezes, denominadas nanoceluloses devido às nanodimensões de suas fibras, determinadas principalmente pelo seu diâmetro inferior a 1 μm , o que já o define como escala nano (LEE et al., 2014; TORRES; ARROYO; TRONCOSO, 2019). O homogeneizador de alta pressão é uma alternativa para diminuir a dimensão das fibras e deixa-las mais homogêneas, alcançando a escala nanométrica em maior parte de seus filamentos e arranjos.

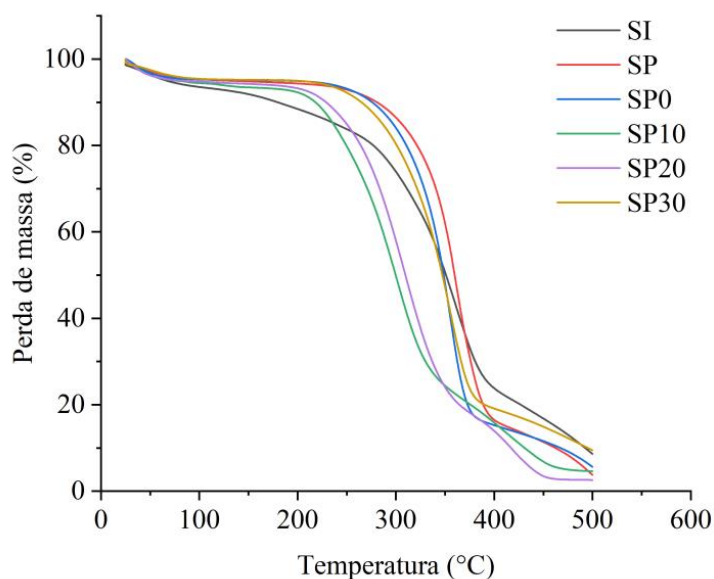
As imagens obtidas de MEV (Figura 8 e 9) ilustram a disposição aleatória das nanofibras e com comprimentos na escala micrométrica ao longo de seus filamentos. Não foi possível isolar uma fibra para aproximações que pudessem dimensionar o tamanho dela no presente trabalho; no entanto a Figura 9 apresenta uma maior dispersão das fibras de celulose, com aumento de sua área superficial ao longo de maior número de passagens dos tratamentos mecânicos aplicados. Essa dispersão não é visualizada nas amostras do SCOBYs íntegro (SI) e purificado (SP) da Figura 8, os quais não

foram submetidos a tratamentos mecânicos e se apresentam de forma compactada nas imagens obtidas.

5.1.3 Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) é uma análise de estabilidade térmica que se baseia na variação de massa de uma amostra, resultante de uma transformação física ou química em função da temperatura. Em uma curva TGA, observam-se inflexões devido ao processo de degradação térmica do material, que depende de sua natureza química (CAMPOS, 2014). No presente trabalho, análises termogravimétricas foram realizadas para avaliar as diferentes temperaturas de decomposição das 6 amostras de celulose bacteriana: SI, SP, SP0, SP10, SP20 e SP30. Os resultados da análise estão dispostos na Figura 10.

Figura 10 – Análise Termogravimétrica das seguintes amostras: SI, SP, SP0, SP10, SP20 e SP30.



SI: SCOBY Íntegro
SP: SCOBY Purificado
SP0: SCOBY Purificado somente passagem ultraturrax
SP10: SCOBY Purificado 10x passagem homogeneizador
SP20: SCOBY Purificado 20x passagem homogeneizador
SP30: SCOBY Purificado 30x passagem homogeneizador

Durante o tratamento térmico inicial, todas as amostras apresentaram uma pequena perda de peso a partir da temperatura ambiente até 150 °C devido à perda de água, como pode ser visto na Figura 10 que apresenta a perda de massa (%) com o aumento da temperatura. Houve uma diferença de perda de massa entre as amostras do SCOBY íntegro (SI) e do SCOBY purificado (SP), de 8,13 % para SI e 5,18 % para o SP de degradação de sua massa entre 0 e 150 °C. O maior valor de perda de água e de componentes voláteis para o SI, comparado não só com o SP como com o restante das amostras, sugere uma maior retenção de água em sua estrutura como também presença de compostos sensíveis termicamente como as melanoidinas (DIMA et al., 2017).

As amostras de SCOBY purificado com 10 e 20 passagens (SP10 e SP20) tiveram o início de sua maior degradação em uma menor faixa de temperatura, dentro de 220 °C a 350 °C. Amarasekara et al. (2020) que compararam SCOBYs com diferentes metodologias de purificação, obtiveram amostras com rápida decomposição e maiores perdas de peso na faixa de 270 °C a 280 °C. Já as amostras purificadas SP, SP0 e SP30 tiveram início de sua maior etapa de degradação entre 360 °C e 390 °C, resultando em uma perda de peso significativa ao final, entre 86-90 %, não apresentando diferença significativa entre elas. Estes valores de degradação nesta faixa de temperatura estão condizentes com as amostras de celulose bacteriana provenientes de uma cepa de *Gluconacetobacter xylinus* apresentados por Mohammadkazemi et al. (2015), e, podem estar associados a uma degradação da celulose, incluindo despolimerização, desidratação e decomposição de unidades de glicose, seguida pela formação de um resíduo de carbono (VAZQUEZ et al., 2013).

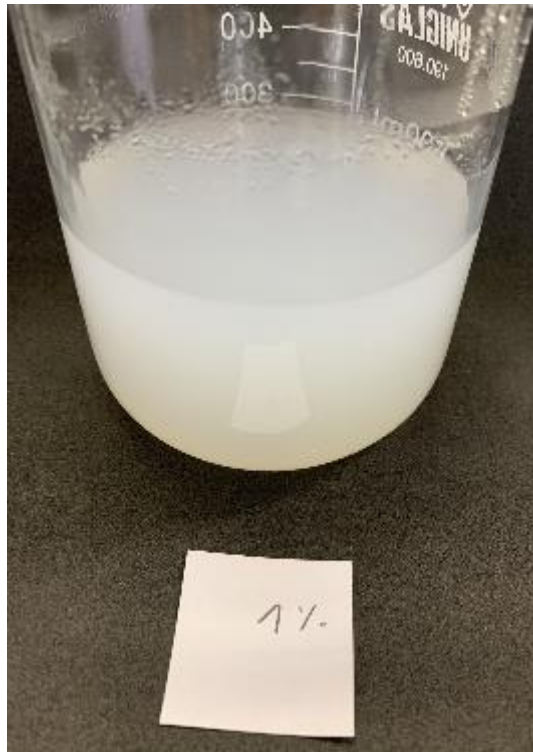
Dima et al. (2017) que avaliou o impacto de 1, 10 e 25 passagens em um microfluidizador (1300 bar) na estabilidade térmica do SCOBY íntegro não encontrou diferença entre as amostras, provavelmente devido à presença de

produtos não celulósicos. Quando comparado o mesmo número de passagens para a celulose microcristalina, o maior número de passes através do microfluidizador levou a um aumento gradual da estabilidade térmica. O presente trabalho apresentou mesma inclinação e comportamento para as amostras purificadas do SCOPY, não havendo uma diferença considerável nos tratamentos recebidos entre elas.

5.2 Elaboração dos filmes biodegradáveis com adição de nanofibras de celulose

As soluções de nanofibras foram diluídas a partir das soluções em concentração SCOPY 1: 2 Água que passaram no homogeneizador de alta pressão, como mostra a Figura 11. Para a avaliação do efeito da adição de celulose bacteriana aos filmes de amido, foi escolhida a solução de 30 passagens no homogeneizador de alta pressão (SP30) pela mesma ter recebido maior pressão em suas fibras e ter apresentado maior área superficial nas imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Figura 11 – Solução de nanofibras após homogeneizador de alta pressão na concentração de 1% CB.



A Figura 12 ilustra uma amostra do filme obtido na concentração de 3 % de nanofibras de celulose bacteriana com 30 passagens pelo homogeneizador de alta pressão.

Figura 12 – Frente e verso do filme obtido com 3% de nanofibras de celulose bacteriana.



5.3 Caracterização dos Filmes contendo Nanofibras

5.3.1 Espessura e Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes são características determinantes para sua utilização como material de embalagem. Espera-se que estes materiais sejam resistentes à ruptura e abrasão de forma que permita que o alimento mantenha sua integridade e proteção durante transporte e manuseio, bem como seja possível se adaptar a eventuais deformações que possam ocorrer sem danos mecânicos (SENGUPTA e HAN, 2014).

Os resultados referentes à espessura e às propriedades mecânicas dos filmes estão relatados na Tabela 2. Quanto aos valores de espessura, o menor valor encontrado foi de 0,054 mm da amostra com 1 % de adição de CB, enquanto o maior valor, com diferença significativa entre eles, foi de 0,100 mm para o filme com maior adição de CB (5 %) e tratamento apenas com turrax. As amostras não seguiram um aumento ou decréscimo linear dos valores de espessura quando adicionados de CB com tratamento no HAP, visto que os resultados para a amostra controle foram similares às amostras com adição de 1 e 3 % de CB com passagem no HAP (sem diferença estatística com 95% de significância). Este comportamento não linear também foi observado no estudo de Xie et al. (2020) que não apresentou diferença estatística entre as espessuras de suas amostras controle com adição de 5 % e 10 % de CB. Apenas o filme com adição de 15 % de CB apresentou maior valor quando comparado ao filme controle.

No entanto, os filmes que tiveram apenas o tratamento mecânico no turrax apresentaram valores estatisticamente maiores de espessura, tanto comparados ao controle como aos com passagem no HAP. Estes valores não se diferiram estatisticamente entre as concentrações de CB adicionadas. Esse maior valor de espessura e diferença entre o restante das amostras, pode ter sido ocasionada pela má dispersão da solução de CB no filme de amido, corroborado pelo maior desvio padrão destes filmes.

Tabela 2 – Valores de Espessura e Propriedades Mecânicas – Resistência à Tração (RT) e Elongação na Ruptura (ER) dos filmes controle, apenas

passagem no turrax e de 30 passagens no homogeneizador com adição de 1, 3 e 5% de nanofibras de celulose bacteriana

Filmes	Espessura (mm)	Resistência à Tração (MPa)	Elongação na Ruptura (%)
Controle	0,062 ± 0,003 ^{cd}	34,97 ± 1,47 ^b	1,80 ± 0,23 ^c
T 1% CB	0,091 ± 0,010 ^{ab}	19,80 ± 2,68 ^c	2,77 ± 0,15 ^a
T 3% CB	0,099 ± 0,013 ^a	21,10 ± 2,44 ^c	2,29 ± 0,22 ^b
T 5% CB	0,100 ± 0,005 ^a	19,69 ± 2,38 ^c	2,56 ± 0,32 ^{ab}
30x 1% CB	0,055 ± 0,003 ^d	43,34 ± 1,02 ^a	2,44 ± 0,25 ^{ab}
30x 3% CB	0,065 ± 0,005 ^{cd}	42,60 ± 2,51 ^a	2,29 ± 0,21 ^b
30x 5% CB	0,073 ± 0,006 ^{bc}	43,34 ± 1,01 ^a	2,20 ± 0,11 ^b

Valores médios ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

A resistência máxima à tração (RT), comumente expressa em MPa, é a resistência oferecida pelo material no ponto da ruptura. Os valores obtidos no presente trabalho referentes às propriedades mecânicas dos filmes estão dispostos na Tabela 2. Quanto aos filmes com 30 passagens no HAP, observou-se um aumento médio de 20% nos valores de RT, independente da concentração de CB adicionada comparados com o filme controle. Enquanto os filmes com CB tratadas mecanicamente apenas no turrax apresentaram valores inferiores tanto ao controle quanto ao com CB que recebeu tratamento no HAP. Estes valores inferiores dos filmes com adição de CB, pode ter ocorrido devido à má dispersão da celulose na matriz de amido, fazendo com que fortes ligações de hidrogênio comumente associadas à CB não tenham ocorrido e, diminuindo assim a RT dos filmes.

Quando avaliado o efeito da adição de celulose bacteriana aos filmes de amido, Chiulan et al. (2018) obtiveram aumento significativo em seus valores de RT, com 17,2 MPa para o filme controle de amido/PVA e 21,0, 25,3, 33,6 e 29,5 MPa para as respectivas adições de CB: 0,5, 1, 2 e 5 %. Liu et al. (2020) também obtiveram grande impacto nas propriedades mecânicas de seus filmes à base de um polissacarídeo chamado gluconomano konjak (GMK), com o aumento da concentração de CB. Esta CB foi preparada a partir de lavagem com NaOH 0,1M 2 horas a 80 °C seguido de hidrólise ácida por 1 hora a 70 °C

com agitação magnética. Quando o teor de CB aumentou de 0 para 4 % a RT dos filmes aumentou de 46,43 MPa para 82,01 MPa, concluindo que este comportamento pode ter ocorrido devido a um aumento de ligações de hidrogênio entre o GMK e a CB, sugerindo que houve melhora da rigidez interna dos filmes.

Fabra et al. (2016) não observaram diferença significativa quando adicionaram nanocelulose bacteriana –obtida a partir de hidrólise ácida- aos filmes de amido nas concentrações de 2 % a 10 % comparados com filme controle (11,2 MPa). Entretanto as concentrações de 15 % e 20 % apresentaram aumento significativo de sua RT com valores de 18,9 MPa e 20 MPa respectivamente. Já o presente trabalho obteve valores maiores que o controle, porém similares entre si. Esses resultados foram semelhantes ao estudo de Chiulan et al. (2018) que definiu concentração de 2 % de adição de CB (33,6 MPa de RT) como o filme escolhido pelo grupo como o mais promissor para aplicações em embalagens de alimentos.

Também foi avaliado o parâmetro de percentual de alongamento na ruptura (ER) que é um índice da flexibilidade ou ductilidade dos filmes em que, na maioria dos casos, seu valor muda inversamente comparado aos valores de RT (MARVIZADEH et al., 2017). Os resultados obtidos no presente trabalho foram de 1,80 % para o filme controle de amido e observou-se um leve aumento, independente da concentração de CB adicionada para os filmes e do processo aplicado (turrax + HAP ou somente turrax).

Liu et al. (2020) apresentaram aumento nos valores de ER com o aumento da concentração de CB (0 a 2 %) de 6,34 % para 9,44 %. Esse percentual diminuiu quando maiores concentrações de CB (2 % a 4 %) foram avaliadas, apresentando valores de ER de 5,7 % para a maior concentração de 4 % de CB. Esse fato explicado pela possibilidade do alto conteúdo de CB com seu grande número de ligações de hidrogênio impedirem o movimento das moléculas dos polímeros nos filmes tornando-os mais rígidos. Xie et al. (2020) apresentaram redução de ER com o aumento da concentração de CB nos filmes com 5 % de casca de pele de batata, enquanto os filmes com 3 % de casca de batata não apresentaram diferença estatística de ER de seu filme controle e com adições de CB.

No geral, a incorporação de celulose bacteriana nos filmes de amido melhorou as propriedades mecânicas dos filmes desenvolvidos. As análises realizadas apresentaram diferença significativa nos valores de resistência à tração e percentual de alongação na ruptura dos filmes com adição de CB quando comparados ao filme controle de amido, independente da concentração de CB adicionada. Uma maior concentração de nanocelulose bacteriana em filmes de amido ocasionou uma fraca dispersão das mesmas na matriz de amido, diminuindo a resistência dos filmes como foi observado por Grey et al. (2018). A utilização de pressão superior a 1000 bar no HAP pode trazer melhorias nas propriedades mecânicas e, também, uma possível maior interação das nanofibras com a matriz de amido.

5.3.2 Propriedades Ópticas

O estudo da propriedade óptica dos filmes é relevante para a apresentação de produtos alimentícios e para sua proteção contra iluminação direta. As características de cor dos filmes desenvolvidos estão dispostas na Tabela 3. O filme controle exibiu o maior valor de luminosidade (L^*) (39,55), diferindo-se significativamente ($p < 0,05$) do restante dos filmes, sugerindo que os filmes de amido puros são os mais claros e transparentes em comparação com os filmes adicionados de celulose bacteriana. Os filmes com adição de CB apenas tratados com turrax não apresentaram diferença significativa entre as concentrações de CB adicionadas. Enquanto os filmes com 30 passagens no HAP apresentou menor luminosidade nas maiores concentrações de CB adicionadas (3 e 5 %) quando comparados ao filme de menor concentração de CB (1 %).

Os valores encontrados de vermelho (a^*) e amarelo (b^*) aumentaram, visto que os valores foram positivos, indicando que os filmes se apresentam levemente amarelados após a adição de celulose. Estes parâmetros tiveram diferença significativa entre o controle e os filmes adicionados de CB, independente do tratamento mecânico aplicado.

A diferença total de cor (ΔE) dos filmes que passaram apenas pelo turrax com diferentes conteúdos de celulose bacteriana quando comparados com o somente de amido aumentaram significativamente de 0,66 (1 % CB) para 1,38 (3 % CB), não diferindo estatisticamente o filme de 5 % CB. No entanto esses valores, bem como as diferenças entre estes filmes, não são perceptíveis a olho nu. Enquanto os filmes com 30 passagens no HAP obtiveram diferença estatística entre a menor concentração de CB adicionada, 1,01 para 1 % CB até 2,09 para 5 % CB. Estas diferenças significativas indicam que há diferença de cor entre as amostras e que a transparência dos filmes de amido é menor do que os filmes à base de amido quando substâncias não dispersíveis como a CB são adicionadas, corroborando com os resultados encontrados por Wang et al. (2021a).

Tabela 3 – Cor e Opacidade dos filmes controle, com passagem apenas no turrax e com 30 passagens no homogeneizador e adição de 1, 3 e 5% de nanofibras de celulose bacteriana

Filmes	Parâmetros de cor				Opacidade (A.mm ⁻¹)	
	<i>L</i> [*]	<i>a</i> [*]	<i>b</i> [*]	ΔE	210 nm	600 nm
Controle	39,55 ± 0,57 ^a	0,36 ± 0,04 ^c	1,18 ± 0,1 ^c	-	14,53 ± 0,07 ^b	6,58 ± 0,71 ^c
T 1% CB	38,89 ± 0,37 ^b	0,46 ± 0,02 ^b	1,31 ± 0,02 ^b	0,66 ± 0,3 ^d	12,62 ± 1,02 ^b	8,54 ± 1,39 ^c
T 3% CB	37,68 ± 0,21 ^{bcd}	0,49 ± 0,02 ^{ab}	1,47 ± 0,04 ^a	1,38 ± 0,06 ^{bc}	12,42 ± 0,87 ^b	6,76 ± 0,07 ^c
T 5% CB	37,89 ± 0,44 ^{bc}	0,43 ± 0,03 ^{bc}	1,25 ± 0,03 ^b	1,31 ± 0,4 ^{bc}	14,66 ± 1,55 ^b	9,22 ± 0,88 ^c
30x 1% CB	38,04 ± 0,26 ^b	0,49 ± 0,06 ^{ab}	1,32 ± 0,05 ^b	1,01 ± 0,3 ^{cd}	22,85 ± 0,22 ^a	14,39 ± 0,24 ^b
30x 3% CB	37,27 ± 0,55 ^{cd}	0,46 ± 0,08 ^b	1,46 ± 0,1 ^a	1,78 ± 0,08 ^{ab}	23,51 ± 1,35 ^a	17,03 ± 0,8 ^{ab}
30x 5% CB	36,96 ± 0,72 ^d	0,55 ± 0,04 ^a	1,46 ± 0,14 ^a	2,09 ± 0,01 ^a	24,7 ± 1,06 ^a	18,88 ± 0,68 ^a

Valores médios \pm desvio padrão (n=3). Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Como relatado anteriormente, a adição de CB reduziu a luminosidade transmitida pelos filmes e conseqüentemente aumentou sua opacidade, se tornando menos transparentes com o aumento das concentrações de CB, indicando uma maior barreira de passagem de luz como foi observado também no estudo de Xie et al. (2020).

Na Tabela 3 encontram-se os valores de opacidade para dois comprimentos de onda, 210 nm e 600 nm. A adição de CB (com passagens no HAP) levou a uma melhoria no bloqueio de UV e luz visível. Na região de luz visível (600 nm), a absorbância aumentou significativamente após adição de CB, apresentando valores de $6,58 \text{ A}\cdot\text{mm}^{-1}$ para o filme padrão de amido e de até $18,88 \text{ A}\cdot\text{mm}^{-1}$ para o filme com adição de 5 % CB com 30 passagens no HAP. Liu et al. (2020) desenvolveram filmes com gluconomano konjak e avaliaram adições de 1 a 4 % de nanofibras de celulose bacteriana e observaram aumento dos valores de absorbância a 600 nm com o aumento das concentrações de CB. Já os filmes que passaram apenas pelo turrax não apresentaram diferença estatística quando comparados ao filme controle, não podendo relacionar a uma proteção física do filme neste comprimento de onda.

Quando avaliada a absorbância na região do UV (210 nm), os filmes com passagem apenas pelo turrax, assim como na região de luz visível, não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) quando comparados ao filme controle. Enquanto os valores do filme com adição de CB com 30 passagens no HAP foram maiores quando comparados ao do filme de amido controle (14,53), obtendo valores de absorbância de 22,85 (1 % CB), 23,51 (3 % CB) e 24,7 (5 % CB). Com isso, verificou-se que a adição de CB à filmes de amido aumentam a capacidade de barreira de luz, o que pode ajudar a proteger alimentos embalados contra possíveis deteriorações induzidas pelo contato com a luz como oxidações de proteínas e lipídios, entre outros (WANG et al., 2019).

5.3.3 Propriedades de Barreira e Solubilidade em Água

Análises como solubilidade e permeabilidade ao vapor de água (PVA) são essenciais para definição de posterior aplicação do filme obtido. Em geral, quanto menor os valores destes parâmetros, menor a transferência de umidade do meio externo para o alimento, sendo um comportamento positivo para preservação da qualidade e integridade do alimento embalado.

A solubilidade em água foi medida para estimar a resistência dos filmes à água. A Tabela 4 mostra que houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da solubilidade do filme controle que apresentou valor de 37,36 % para os filmes com adição de celulose bacteriana que variaram de 22,52 % para o filme com adição de 1 % de CB e tratamento somente com turrax, até 7,69 % para o filme com adição de 5 % de CB com passagem no HAP. Essa diminuição pode estar associada à interação entre as matrizes, referentes às ligações de hidrogênio formadas entre os grupos hidroxilas do amido e da celulose bacteriana, levando à formação de redes tridimensionais de celulose. Estas redes restringem o movimento de polímeros de baixa massa molar e outros compostos em direção à água, limitando a solubilidade dos filmes (NOSHIRVANI et al., 2018). Estes resultados corroboram com a estrutura insolúvel em água da celulose, o que tende a diminuir a solubilidade do filme com o aumento da concentração de celulose (WANG et al., 2021).

Quanto à solubilidade do filme padrão de amido de mandioca, o valor obtido foi semelhante ao encontrado por Pagno et al. (2016) de 40,18 %. Enquanto outros estudos obtiveram valores menores de 17,88 % (ASSIS et al., 2018), 22,75 % e 21,25 % para diferentes variedades de amido de mandioca (YAO DÉsirÉ et al., 2021) em que apenas a concentração de glicerol adicionada variou entre os filmes.

Xie et al. (2020) avaliaram o impacto da adição de 5, 10 e 15 % de celulose bacteriana em filmes de casca de batata. A solubilidade dos filmes diminuiu gradativamente com o aumento da concentração de celulose bacteriana, passando de 33,5 % para o controle até 30,2 % para filme com adição de 15 % de CB. Bem como outro estudo que também observou a diminuição de solubilidade dos filmes de 21,39 % (controle) para 18,55 % com adição de 10 % de celulose bacteriana após 24 h de imersão (WANG et al., 2017).

Shih et al. (2021) obtiveram 19,7 % e 16,45 % de solubilidade para filmes de amido de mandioca adicionados de 5 e 10 % de nanofibras de celulose, respectivamente. Este resultado foi atribuído à formação da rede de nanofibras que dificultou a difusão da água através da matriz de amido (SHIH; ZHAO, 2021). Embora todos os filmes com adição de CB tenham apresentado redução significativa de solubilidade quando comparados ao filme controle, os filmes que receberam tratamento apenas com turrax apresentaram uma menor redução com o aumento da concentração de CB adicionada. Indicando que o efeito do HAP nas fibras de celulose apresentou uma melhor dispersão no amido e conseqüentemente uma menor solubilidade destes filmes.

Esta redução da solubilidade dos filmes é desejada para fornecer uma resistência à água e proteger a integridade do produto alimentício a ser acondicionado. Uma maior solubilidade pode ser desejada em produtos os quais serão consumidos juntamente com o alimento em sua cocção ou preparo; no entanto quando o alimento é líquido ou aquoso, filmes com elevada solubilidade não são indicados.

Tabela 4 – Permeabilidade ao vapor de água (PVA) e solubilidade em água dos filmes controle, com passagem apenas no turrax e com 30 passagens no homogeneizador com adição de 1, 3 e 5% de nanofibras de celulose bacteriana.

Filmes	PVA (g.mm/m ² .h .kPa)	Solubilidade (%)
Controle	0,175 ± 0,005 ^c	37,36 ± 1,9 ^a
T 1% CB	0,211 ± 0,021 ^{ab}	22,53 ± 1,4 ^b
T 3% CB	0,224 ± 0,007 ^a	21,80 ± 0,6 ^b
T 5% CB	0,202 ± 0,006 ^b	18,58 ± 1,3 ^c
30x 1% CB	0,168 ± 0,003 ^c	15,38 ± 2,2 ^d
30x 3% CB	0,165 ± 0,006 ^c	12,68 ± 1,2 ^d
30x 5% CB	0,163 ± 0,002 ^c	7,69 ± 1,2 ^e

Valores médios \pm desvio padrão (n=3). Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) obtido para o filme controle, apresentado na Tabela 4, apresentou valor inferior ao encontrado por Pagno et al. (2016) de 0,202 g mm/ h m² kPa para filme de amido de mandioca. Como mostrado na Tabela 4, todos os filmes apresentaram valores semelhantes ($p < 0,05$) para PVA. O resultado de PVA obtido por Xie et al. (2020) para o filme controle de 3 % casca de batata foi de 0,170 g mm/h m² kPa e apenas o filme com adição de 10 % de CB apresentou um decréscimo em sua permeabilidade, com valor de 0,110 g mm/ h m² kPa, enquanto os filmes com adição de 5 % e 15 % não apresentaram diferença estatística quando comparados ao filme controle.

A redução de valores de PVA quando adicionado de celulose bacteriana foram observados em estudos anteriores com adição de 2 a 20 % de CB em filmes de amido de milho termoplástico com valores de PVA de 0,155 g mm/ h m² kPa para controle e 0,064 g mm/ h m² kPa quando adicionados de 15 % de CB (FABRA et al., 2016). Bem como quando as nanofibras de CB foram adicionados a filmes de álcool polivinílico/amido. Em que os valores de PVA foram de 0,219 g mm/ h m² kPa para controle e reduzido até 0,147 g mm/ h m² kPa com adição de 5% de CB (CHIULAN et al., 2018).

Coelho et al. (2020) avaliaram o efeito da adição de nanocristais de celulose (NCC) obtidos a partir de bagaço de uva em filmes de amido. O filme controle de amido apresentou $7,5 \times 10^{-7}$ g x h.m.Pa⁻¹ de PVA e após adição de 1 % e 2 % de NCC os valores de PVA diminuíram ($4,25$ e $4,55 \times 10^{-7}$ g x h.m.Pa⁻¹, respectivamente). No entanto, quando a concentração de NCC aumentou nos filmes (5%, 10% e 15%), a PVA aumentou significativamente ($p < 0,05$). Os autores sugerem que nessas concentrações (1 % e 2 % NCCs), as NCCs se dispersaram bem na matriz de amido, proporcionando um aumento no caminho das moléculas de água na matriz polimérica, diminuindo assim sua PVA.

Em outro estudo a incorporação de nanofibras de celulose (NFC) apresentou redução da PVA até adição de 3 % de NFC, devido à boa dispersão destas nanofibras na matriz de amido, o que impediu a entrada das

moléculas de água nos filmes. Já na concentração de 4 % de NFC a PVA dos filmes aumentou, possivelmente pela aglomeração das nanoestruturas nos filmes levando a uma difusão mais rápida do vapor de água através do filme (BALAKRISHNAN et al., 2017).

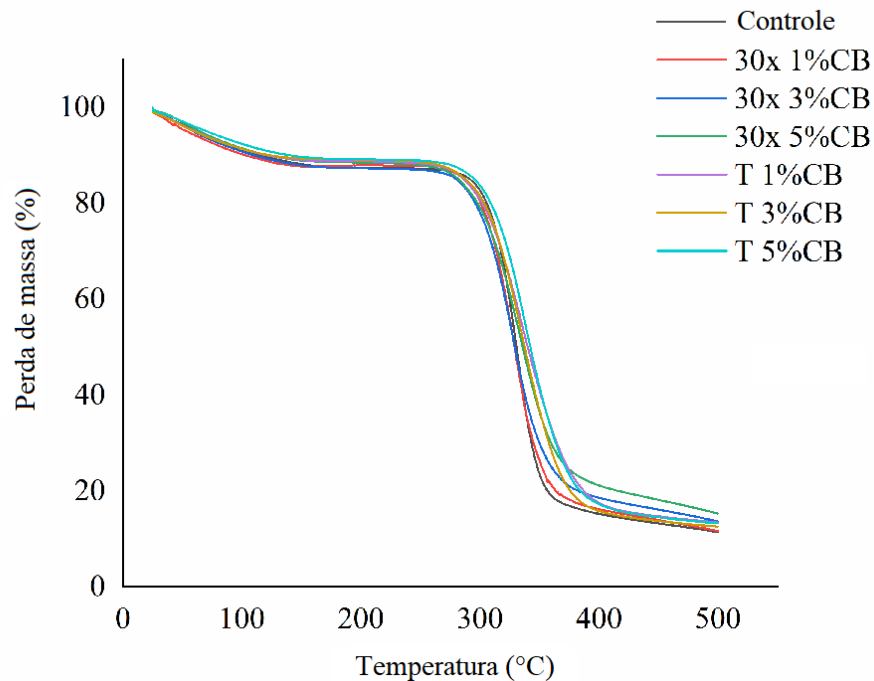
No presente trabalho os filmes com adição de CB com tratamento mecânicos apenas no turrax apresentaram um maior valor de PVA comparados ao controle e com tratamento no HAP. Este aumento sugere uma má dispersão da CB ao filme do amido, corroborando com os resultados de Coelho et al. (2020) em concentrações de 5 % CB e valores superiores. Resultando em filmes com uma maior permeabilidade ao vapor d'água, limitando sua aplicação em alimentos com maior teor de umidade quando comparados ao filme controle e com passagens pelo HAP.

A diminuição dos valores de PVA depende de muitos fatores, como a hidrofobicidade/hidrofiliabilidade de sua matriz, da dimensão de suas partículas, da interação de seus componentes, entre outros fatores. Neste caso, a ausência de efeito nos valores de PVA dos filmes com CB tratadas no HAP deve ter sido ocasionada pela falta de interação da celulose bacteriana com a matriz de amido na concentração adicionada, impedindo um efeito de barreira no mesmo.

5.3.4 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica dos filmes foi avaliada a partir da análise termogravimétrica (TGA), A perda de massa (%) e a temperatura para degradação máxima de decomposição dos filmes são mostradas na Figura 13.

Figura 13 – Análise Termogravimétrica dos filmes controle, 30x 1% CB, 30x 3% CB, 30x 5% CB, T 1% CB, T 3% CB e T 5% CB.



30x 1 % CB: Filme de amido com adição de 1 % de celulose bacteriana com 30 passagens no homogeneizador de alta pressão
 30x 3 % CB: Filme de amido com adição de 3 % de celulose bacteriana com 30 passagens no homogeneizador de alta pressão
 30x 5 % CB: Filme de amido com adição de 5 % de celulose bacteriana com 30 passagens no homogeneizador de alta pressão
 T 1 % CB: Filme de amido com adição de 1 % de celulose bacteriana com apenas etapa de homogeneização no turrax
 T 3 % CB: Filme de amido com adição de 3 % de celulose bacteriana com apenas etapa de homogeneização no turrax
 T 5 % CB: Filme de amido com adição de 5 % de celulose bacteriana com apenas etapa de homogeneização no turrax

A primeira inflexão no gráfico, referente ao primeiro ponto de degradação dos filmes, foi identificada até a temperatura de 150 °C, em que a percentual de peso degradado foi em média de 12 % referentes à evaporação de água dos filmes, como já relatado em outros estudos (ASSIS et al., 2018; COLLAZO-BIGLIARDI; ORTEGA-TORO; CHIRALT, 2019). O segundo ponto de degradação dos filmes, que ocorre entre 150 °C e 260 °C e é caracterizado pela perda de peso atribuída à degradação do glicerol nos filmes (MEDINA JARAMILLO et al., 2016) não se mostrou visível no gráfico possivelmente pela baixa concentração de glicerol utilizada nos filmes (0,1 g/g de amido). A principal degradação dos filmes ocorreu entre 310 °C e 350 °C e está na inflexão mais íngreme apresentada na Figura 13. Esta inflexão mais intensa

está relacionada à degradação do amido e dos componentes de celulose presentes nos filmes.

Todos os filmes, tanto controle quanto com adição de diferentes concentrações e tratamentos da celulose bacteriana, mostraram comportamento térmico semelhante na faixa de temperatura de 150 a 300 °C. Isto é, a adição de CB não afetou as propriedades térmicas dos filmes. O mesmo comportamento foi encontrado no estudo de Xie et al. (2020) com adições de até 15 % de CB à filmes de casca de batata, os quais relacionaram que houve interações físicas entre a CB e o biopolímero da matriz do filme. Wang et al. (2019) também relataram que a adição de celulose (nanocristais) à filmes de ácido polilático não alteraram o perfil de degradação térmica dos filmes de acordo com a análise de DTG.

Contudo, Liu et al. (2020) obtiveram aumento da estabilidade térmica dos filmes quando adicionados de nanofibras de celulose bacteriana (NFCB). Os filmes com conteúdos de 0, 1%, 2% e 3% de NFCB obtiveram seus picos principais de degradação entre 280 °C e 330 °C, enquanto o filme com adição de 4% de NFCB apresentou sua maior degradação entre 370 °C e 440 °C, sugerindo que os filmes com maior concentração de NFCB apresentaram maior estabilidade térmica.

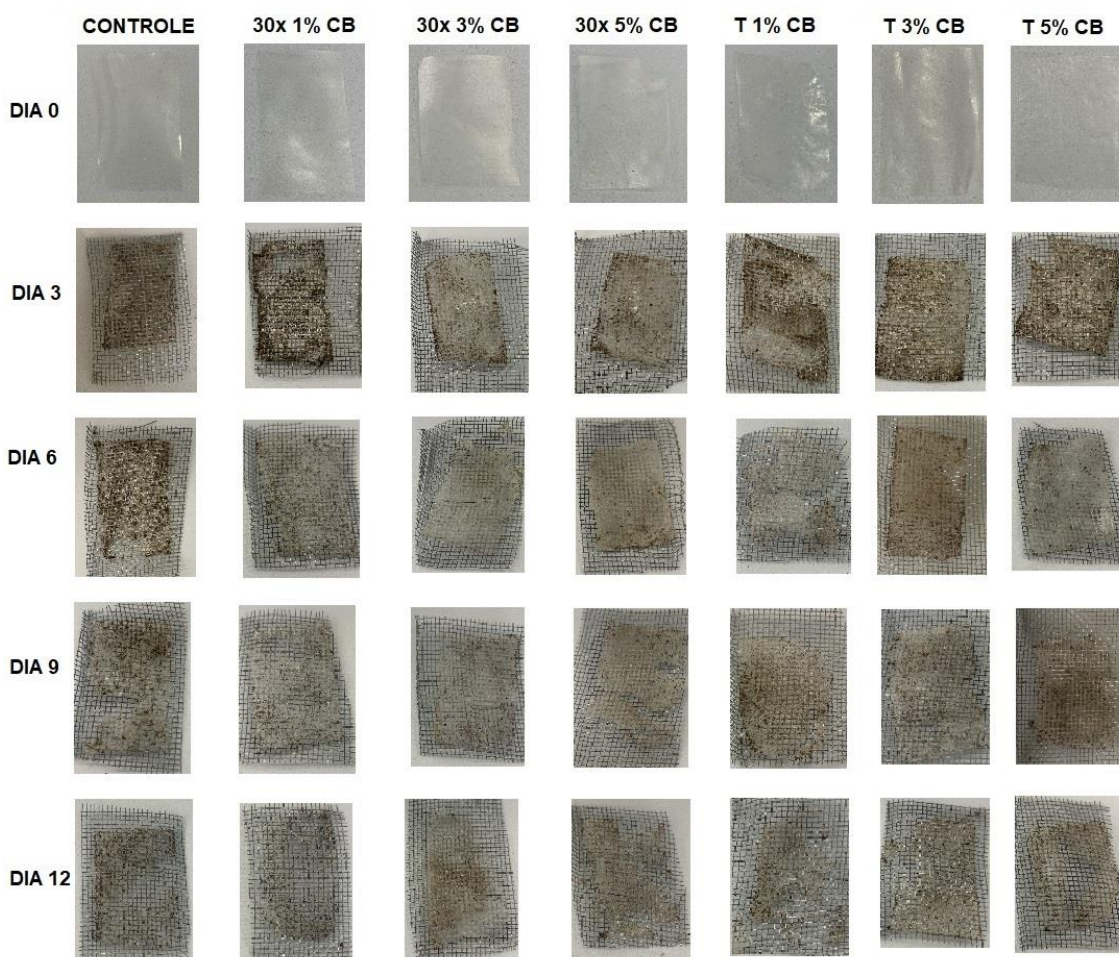
5.3.5 Biodegradabilidade

A biodegradação é um processo biológico em que substâncias orgânicas são fragmentadas por organismos vivos e convertidas em substâncias naturais como dióxido de carbono, metano, água e biomassa (SHAH et al., 2008). A análise de biodegradabilidade em um solo composto visa desempenhar um processo de degradação dos filmes desenvolvidos em ambientes naturais, onde o solo é geralmente composto por microflora onde estão presentes bactérias, fungos e protozoários que atuam em sinergia no processo de biodegradabilidade (MARTUCCI; RUSECKAITE, 2009b).

Os filmes foram submetidos à análise de biodegradabilidade onde a Figura 14 mostra a aparência dos filmes ao longo dos 12 dias de análise, os

quais foram retirados a cada 3 dias para avaliação visual e percentual de perda de massa de suas amostras.

Figura 14 – Aparência dos filmes desenvolvidos até 12 dias de biodegradabilidade.



Os filmes apresentaram rápida biodegradabilidade e aumento da taxa de biodegradação através da análise visual dos filmes. Quanto à perda de massa das amostras, elas variaram de 50 a 60 %, não apresentando diferença significativa entre os filmes com diferentes concentrações e tratamentos da CB. A biodegradabilidade em filmes à base de amido de mandioca também foi observado por Medina Jaramillo et al. (2016) o qual adicionaram extrato de erva-mate nos filmes e obtiveram uma rápida biodegradabilidade do material em 12 dias.

Filmes biodegradáveis obtidos a partir de amido e glicerol podem apresentar elevada perda de massa durante o processo de biodegradação devido ao aumento da absorção de água, visto que ambos possuem caráter hidrofílico. Este aumento de absorção de água promove o crescimento de microrganismos naturalmente presentes no solo que atuam na fonte de carboidratos, resultando em uma maior e mais rápida degradação destes materiais (MARAN et al., 2014). Seligra et al. (2016) também avaliou a degradação de filmes de amido que apresentaram uma rápida perda de massa nos primeiros 15 dias, porém após os 30 dias de análise os filmes demonstraram uma degradação significativa.

A avaliação da biodegradabilidade de filmes de carboximetil celulose (CMC) com diferentes concentrações de glicerol foi estudada por Hidayati et al. (2021). A CMC foi obtida a partir da alga *Eucheuma cottonii* e o teste de degradação dos filmes obtidos apresentou decomposição em 14 dias de análise. Demonstrando a biodegradabilidade da celulose e importância do desenvolvimento de embalagens em substituição aos polímeros obtidos de polímeros não biodegradáveis, auxiliando em um menor impacto ambiental.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o crescimento mundial do mercado de kombucha, estudos sobre a bebida e sobre um possível reaproveitamento do seu resíduo industrial, o SCOBY, vêm aumentando na literatura. A caracterização físico-química do SCOBY tanto em sua forma íntegra quanto purificada é relevante por ser uma fonte alternativa de obtenção de celulose bacteriana, um produto com alto

potencial de mercado, porém, com sua produção ainda limitada pelo alto custo e baixa produtividade do processo fermentativo.

A obtenção das nanofibras a partir do resíduo de kombucha foi observada no presente trabalho a partir da análise das imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), a qual também evidenciou a eficácia da purificação utilizada. Além disso, a caracterização da composição centesimal do SCOBY íntegro e purificado confirmou a eficiência do processo de purificação. O SCOBY íntegro apresentou teores de proteínas e carboidratos além de fibras alimentares em sua composição centesimal, enquanto o SCOBY purificado apresentou teor de 97,33 % de fibras alimentares finais, sendo ingrediente promissor para uso em formulações com maior teor de fibras. Pode-se observar também estrutura e comportamento semelhante aos referentes à celulose bacteriana proveniente apenas de *Gluconacetobacter Xylinus* em sua morfologia e estabilidade térmica.

A aplicação da celulose bacteriana após ação mecânica pela passagem em homogeneizador de alta pressão foi avaliada em filmes biodegradáveis à base de amido. Análises referentes aos parâmetros mecânicos, propriedades ópticas e de solubilidade em água dos filmes apresentaram uma melhoria com a adição de celulose bacteriana quando comparados aos filmes controles (somente de amido). Podendo considerar a efetividade do tratamento em HAP da celulose bacteriana proveniente do SCOBY e sua aplicação como material de reforço em filmes biodegradáveis como uma alternativa de menor impacto ambiental. Abrindo possibilidades para diferentes aplicações deste subproduto de valor agregado e que está em crescimento atualmente.

7. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- ADURI, P. et al. Study of Biodegradable Packaging Material Produced From Scoby. **Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 389–404, 2019. Disponível em: <www.rjlbpcs.com>
- AHMED, R. F.; HIKAL, M. S.; ABOU-TALEB, K. A. Biological, chemical and antioxidant activities of different types Kombucha. **Annals of Agricultural Sciences**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 35–41, 2020.
- AL-KALIFAWI, E. J.; HASSAN, I. A. Factors Influence on the yield of Bacterial Cellulose of Kombucha (Khubdat Humza) Abstract : Introduction : Materials and Methods : [s. l.], v. 11, n. 3, 2014.
- ALKHALIFAWI, I.; HASSAN, I. Factors Influence on the yield of Bacterial Cellulose of Kombucha (Khubdat Humza). **Baghdad Science Journal**, [s. l.], v. 11, p. 1420–1428, 2014.
- AMARASEKARA, A.; WANG, D.; GRADY, T. A comparison of kombucha SCOBY bacterial cellulose purification methods. **SN Applied Sciences**, [s. l.], v. 2, 2020.
- ARVANITOYANNIS, I.; BILIADERIS, C. G. Physical properties of polyol-plasticized edible blends made of methyl cellulose and soluble starch. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 47–58, 1999.
- ASSIS, R. Q. et al. Synthesis of biodegradable films based on cassava starch containing free and nanoencapsulated β - carotene. [s. l.], n. December 2017, p. 8–10, 2018.
- AZEREDO, H. M. C. et al. Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, [s. l.], v. 3, p. 7, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fsufs.2019.00007>>
- BALAKRISHNAN, P. et al. Morphology, transport characteristics and viscoelastic polymer chain confinement in nanocomposites based on thermoplastic potato starch and cellulose nanofibers from pineapple leaf. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 169, p. 176–188, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861717303909>>
- BANDYOPADHYAY, S. et al. Bacterial cellulose based greener packaging material: a bioadhesive polymeric film. **Materials Research Express**, [s. l.], v.

5, n. 11, p. 115405, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1088/2053-1591/aadb01>>

BARUD, H. S. et al. **Bacterial Cellulose**, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/9781119126218.ch21>>

BATTIKH, H. et al. Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. **Journal of Food Biochemistry**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 231–236, 2013.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.

BORZANI, W.; SOUZA, S. J. De. Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid media. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 17, p. 1271–1272, 2004.

CAZÓN, P.; VELÁZQUEZ, G.; VÁZQUEZ, M. Characterization of bacterial cellulose films combined with chitosan and polyvinyl alcohol: Evaluation of mechanical and barrier properties. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 216, p. 72–85, 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861719303650>>

CHAKRAVORTY, S. et al. International Journal of Food Microbiology Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 220, p. 63–72, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>>

CHAKRAVORTY, S. et al. **Kombucha: A Promising Functional Beverage Prepared From Tea**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815270-6.00010-4>>

CHAWLA, P. R. et al. Microbial cellulose: Fermentative production and applications. **Food Technology and Biotechnology**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 107–124, 2009.

CHEN, C.; LIU, B. Y. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. [s. l.], p. 834–839, 2000.

CHEN, W. et al. Individualization of cellulose nanofibers from wood using high-intensity ultrasonication combined with chemical pretreatments. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 83, n. 4, p. 1804–1811, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.040>>

CHIULAN, I. et al. Surface properties, thermal, and mechanical characteristics of poly(vinyl alcohol)–starch-bacterial cellulose composite films. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 135, n. 6, p. 45800, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/app.45800>>

COLLAZO-BIGLIARDI, S.; ORTEGA-TORO, R.; CHIRALT, A. Improving properties of thermoplastic starch films by incorporating active extracts and cellulose fibres isolated from rice or coffee husk. **Food Packaging and Shelf Life**, [s. l.], v. 22, p. 100383, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214289418304666>>

COTON, M. et al. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. **FEMS microbiology ecology**, England, v. 93, n. 5, 2017.

CZAJA, W. K. et al. The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications. [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–12, 2007.

CZAJA, W.; ROMANOVICZ, D.; BROWN, R. malcolm. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. **Cellulose**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 403–411, 2004.

DE MORAES, J. O. et al. Scale-up of the production of cassava starch based films using tape-casting. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 119, n. 4, p. 800–808, 2013.

DHINGRA, D. et al. Dietary fibre in foods: a review. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 255–266, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13197-011-0365-5>>

DICK, M. et al. Edible films based on chia flour: Development and characterization. [s. l.], v. 42455, p. 1–9, 2015.

DIMA, S.-O. et al. Bacterial Nanocellulose from Side-Streams of Kombucha Beverages Production: Preparation and Physical-Chemical Properties. **Polymers**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 374, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2073-4360/9/8/374>>. Acesso em: 3 set. 2020.

DOURADO, F.; GAMA, M.; RODRIGUES, A. C. A Review on the toxicology and dietetic role of bacterial cellulose. **Toxicology Reports**, [s. l.], v. 4, n. September, p. 543–553, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.09.005>>

DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. Tea , Kombucha , and health : a review. [s.

l.], v. 33, 2000.

ESA, F.; TASIRIN, S. M.; RAHMAN, N. A. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. **Italian Oral Surgery**, [s. l.], v. 2, p. 113–119, 2014.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.017>>

FABRA, M. J. et al. Improving the barrier properties of thermoplastic corn starch-based films containing bacterial cellulose nanowhiskers by means of PHA electrospun coatings of interest in food packaging. **Food Hydrocolloids**. **Volume 61, December 2016, Pages 261-268**, [s. l.], v. 61, p. 261–268, 2016.

FERNANDES, S. C. M. et al. Novel transparent nanocomposite films based on chitosan and bacterial cellulose. [s. l.], p. 2023–2029, 2009.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>>

FONTANA, J. D. et al. Nature of Plant Stimulators in the Production of *Acetobacter xylinum* ("Tea Fungus") Biofilm Used in Skin Therapy. [s. l.], v. 28, n. 1, 1991.

GAGGIÀ, F. et al. Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity. **Nutrients**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–22, 2019.

GOH, W. N. et al. Microstructure and physical properties of microbial cellulose produced during fermentation of black tea broth (kombucha). II. **International Food Research Journal**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 153–158, 2012.

GREENWALT, C. J.; LEDFORD, R. A.; STEINKRAUS, K. H. Determination and Characterization of the Antimicrobial Activity of the Fermented Tea Kombucha. [s. l.], v. 296, p. 291–296, 1998.

HABIBI, Y.; LUCIA, L. A.; ROJAS, O. J. Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications. [s. l.], v. d, p. 3479–3500, 2010.

HIDAYATI, S. et al. Effect of glycerol concentration and carboxy methyl cellulose on biodegradable film characteristics of seaweed waste. **Heliyon**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. e07799, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844021019022>>

HOPEWELL, J.; DVORAK, R.; KOSIOR, E. Plastics recycling: challenges and opportunities. [s. l.], v. 2007, p. 2115–2126, 2009.

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose---a

masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 261–270, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1023/A:1004775229149>>

ILLA, M. P.; SHARMA, C. S.; KHANDELWAL, M. Tuning the physiochemical properties of bacterial cellulose: effect of drying conditions. **Journal of Materials Science**, [s. l.], v. 54, n. 18, p. 12024–12035, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10853-019-03737-9>>

JAKUBCZYK, K. et al. Chemical profile and antioxidant activity of the kombucha beverage derived from white, green, black and red tea. **Antioxidants**, [s. l.], v. 9, n. 5, 2020.

JAYABALAN, R. et al. Biochemical Characteristics of Tea Fungus Produced During Kombucha Fermentation. [s. l.], n. June 2014, 2010.

JAYABALAN, R. et al. A Review on Kombucha Tea — Microbiology , Composition , Fermentation , Beneficial Effects , Toxicity , and Tea Fungus. [s. l.], v. 13, 2014.

JAYABALAN, R.; MARIMUTHU, S.; SWAMINATHAN, K. Food Chemistry Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. [s. l.], v. 102, p. 392–398, 2007.

JOZALA, A. F. et al. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. **Applied microbiology and biotechnology**, Germany, v. 100, n. 5, p. 2063–2072, 2016.

KALAIAPPAN, K. et al. Kombucha scoby-based carbon as a green scaffold for high-capacity cathode in lithium–sulfur batteries. **Ionics**, [s. l.], v. 25, n. 10, p. 4637–4650, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11581-019-03018-0>>

KAMIŃSKI, K. et al. Hydrogel bacterial cellulose: a path to improved materials for new eco-friendly textiles. **Cellulose**, [s. l.], 2020.

KIM, H.; SONG, J. E.; KIM, H. R. Comparative study on the physical entrapment of soy and mushroom proteins on the durability of bacterial cellulose bio-leather. **Cellulose**, [s. l.], 2021.

KLEMM, D. et al. Reviews Nanocelluloses : A New Family of Nature-Based Materials Angewandte. [s. l.], p. 5438–5466, 2011.

LAAVANYA, D.; SHIRKOLE, S.; BALASUBRAMANIAN, P. Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 295, p. 126454, 2021.

LEE, K. et al. More Than Meets the Eye in Bacterial Cellulose : Biosynthesis , Bioprocessing , and Applications in Advanced Fiber Composites a. [s. l.], p. 10–32, 2014.

LENG, A.; HEARD, G.; COX, J. Yeast ecology of Kombucha fermentation. [s. l.], v. 95, p. 119–126, 2004.

LI, J. et al. Homogeneous isolation of nanocellulose from sugarcane bagasse by high pressure homogenization. **Carbohydrate polymers**, England, v. 90, n. 4, p. 1609–1613, 2012.

LIU, C. et al. The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage , Haipao , and their interactions during Haipao fermentation. [s. l.], p. 407–415, 1996.

LIU, Z. et al. Characterizations of bacterial cellulose nanofibers reinforced edible films based on konjac glucomannan. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 145, p. 634–645, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813019355370>>

MARAN, J. P. et al. Degradation behavior of biocomposites based on cassava starch buried under indoor soil conditions. **Carbohydrate polymers**, England, v. 101, p. 20–28, 2014.

MARSH, A. J. et al. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 38, p. 171–178, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>>

MARTUCCI, J. F.; RUSECKAITE, R. A. Biodegradation of three-layer laminate films based on gelatin under indoor soil conditions. **Polymer Degradation and Stability**, [s. l.], v. 94, n. 8, p. 1307–1313, 2009. a. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391009000755>>

MARTUCCI, J. F.; RUSECKAITE, R. A. Tensile properties, barrier properties, and biodegradation in soil of compression—Molded gelatin-dialdehyde starch films. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 112, n. 4, p. 2166–2178, 2009. b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/app.29695>>

MARVIZADEH, M. M. et al. Preparation and characterization of bionanocomposite film based on tapioca starch/bovine gelatin/nanorod zinc oxide. **International journal of biological macromolecules**, Netherlands, v. 99, p. 1–7, 2017.

MASMOUDI, F. et al. Biodegradable packaging materials conception based on starch and polylactic acid (PLA) reinforced with cellulose. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], p. 20904–20914, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7276-y>>

MEDINA JARAMILLO, C. et al. Biodegradability and plasticizing effect of yerba mate extract on cassava starch edible films. **Carbohydrate polymers**, England, v. 151, p. 150–159, 2016.

MESOMYA, W. et al. Effects of health food from cereal and nata de coco on serum lipids in human. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, [s. l.], v. 28, 2006.

METZ, T. O. **No Title**. 2020. Disponível em: <https://unsplash.com/@to_metz?utm_source=unsplash&utm_medium=referral&utm_content=creditCopyText>.

MITROFANOV, Y.; BUDAEVA, V.; SAKOVICH, G. Preparation and Properties of Bacterial Cellulose Gel Films. **Chem Sustain Dev**, [s. l.], v. 18, p. 503–508, 2010.

MOLINA-ROMERO, J. M. et al. Reduced tensile properties of bacterial cellulose membranes after an accelerated composite temperature/humidity cyclic assay. **Journal of Polymers and the Environment**, [s. l.], 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10924-020-02023-z>>

MORADIAN, S.; ALMASI, H.; MOINI, S. Development of bacterial cellulose-based active membranes containing herbal extracts for shelf life extension of button mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Journal of Food Processing and Preservation**, [s. l.], v. 42, p. e13537, 2017.

MOUSAVI, S. M. et al. Separation of Ni (II) from Industrial Wastewater by Kombucha Scoby as a Colony Consisted from Bacteria and Yeast: Kinetic and Equilibrium Studies. **Acta Chimica Slovenica**, [s. l.], v. 66, 2019.

NISHIYAMA, Y. et al. Looking at hydrogen bonds in cellulose. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, United States, v. 66, n. Pt 11, p. 1172–1177, 2010.

NOSHIRVANI, N. et al. Study of cellulose nanocrystal doped starch-polyvinyl alcohol bionanocomposite films. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 107, p. 2065–2074, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813017318317>>

NUGROHO, D. A.; AJI, P. Characterization of Nata de Coco Produced by Fermentation of Immobilized *Acetobacter xylinum*. **Italian Oral Surgery**, [s. l.], v. 3, p. 278–282, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aaspro.2015.01.053>>

OKIYAMA, A.; MOTOKI, M.; I, S. Y. Bacterial cellulose IV . Application to processed foods. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 503–511, 1993. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80074-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80074-X)>

OKIYAMA, A.; MOTOKI, M.; YAMA, S. Bacterial cellulose II . Processing of the gelatinous cellulose for food. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 479–487, 1992. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80033-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80033-7)>

OKIYARNA, A.; MOTOKI, M.; I, S. Y. Bacterial cellulose III . Development of a new form of cellulose. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 493–501, 1993. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80073-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80073-8)>

ORGÂNICO, R. **No Title**. 2021. Disponível em: <<https://ranchoorganico.com.br/site/2019/05/27/o-que-e-o-kombucha/>>.

PAGNO, C. H. et al. Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* W .) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity. **FOOD CHEMISTRY**, [s. l.], v. 173, p. 755–762, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.068>>

PELLISSARI, F. M.; MENEGALLI, F. C. Isolation and characterization of cellulose nanofibers from banana peels Isolation and characterization of cellulose nanofibers from banana peels. [s. l.], n. February, 2014.

PRADIPASENA, P.; CHOLLAKUP, R.; TANTRATIAN, S. Formation and characterization of BC and BC-paper pulp films for packaging application. **Journal of Thermoplastic Composite Materials**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 500–513, 2018.

QIU, K.; NETRAVALI, A. N. A Review of Fabrication and Applications of Bacterial Cellulose Based Nanocomposites A Review of Fabrication and Applications of Bacterial Cellulose Based Nanocomposites. [s. l.], v. 3724, 2014.

RAMÍREZ TAPIAS, Y. A. et al. Kombucha Tea By-product as Source of Novel Materials: Formulation and Characterization of Films. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11947-020-02471-4>>

RHIM, J.; NG, P. K. W.; RHIM, J. Natural Biopolymer-Based Nanocomposite Films for Packaging Applications Natural Biopolymer-Based Nanocomposite Films for Packaging. [s. l.], v. 8398, 2007.

ROTTA, J. et al. Parameters of color , transparency , water solubility , wettability and surface free energy of chitosan / hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. **Materials Science & Engineering C**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 619–623, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2008.10.032>>

ROZENBERGA, L. et al. Characterisation of films and nanopaper obtained from cellulose synthesised by acetic acid bacteria. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 144, p. 33–40, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.025>>

RUKA, D. R.; SIMON, G. P.; DEAN, K. M. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. **Carbohydrate polymers**, England, v. 89, n. 2, p. 613–622, 2012.

SALMON, S. et al. Crystal Morphology , Biosynthesis , and Physical Assembly of Cellulose , Chitin , and Chitosan Crystal Morphology . Biosynthesis . and Physical Assembly of Cellulose . Chitin . and Chitosan. [s. l.], v. 1797, 2006.

SEDERAVIČIŪTĒ, F.; BEKAMPIENĒ, P.; DOMSKIENĒ, J. Effect of pretreatment procedure on properties of Kombucha fermented bacterial cellulose membrane. **Polymer Testing**, [s. l.], v. 78, p. 105941, 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142941819303526>>

SEDERAVIČIŪTĒ, F.; DOMSKIENE, J.; BALTINA, I. Influence of Drying Temperature on Tensile and Bursting Strength of Bacterial Cellulose Biofilm. **Materials Science**, [s. l.], v. 25, 2019.

SEMJONOV, P. et al. Cellulose synthesis by *Komagataeibacter rhaeticus* strain P 1463 isolated from Kombucha. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], p. 1003–1012, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7761-8>>

SENGUPTA, T.; HAN, J. H. Chapter 4 - Surface Chemistry of Food, Packaging, and Biopolymer Materials. In: HAN, J. H. (Ed.). **Innovations in Food Packaging (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2014. p.51-86. ISBN 978-0-12-394601-0.

SHAH, A. A. et al. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. **Biotechnology advances**, England, v. 26, n. 3, p. 246–265, 2008.

SHAHMOHAMMADI JEBEL, F.; ALMASI, H. Morphological, physical, antimicrobial and release properties of ZnO nanoparticles-loaded bacterial cellulose films. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 149, p. 8–19, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861716304660>>

SHARMA, A. et al. Commercial application of cellulose nano-composites – A review. **Biotechnology Reports**, [s. l.], n. 2018, p. e00316, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00316>>

SHARMA, C.; BHARDWAJ, N. K. Biotransformation of fermented black tea into bacterial nanocellulose via symbiotic interplay of microorganisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 132, p. 166–177, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.202>>

SHARMA, C.; BHARDWAJ, N. K. Fabrication of natural-origin antibacterial nanocellulose films using bio-extracts for potential use in biomedical industry. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 145, p. 914–925, 2020.

SHARMA, C.; BHARDWAJ, N. K.; PATHAK, P. Static intermittent fed-batch production of bacterial nanocellulose from black tea and its modification using chitosan to develop antibacterial green packaging material. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], p. 123608, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123608>>

SHEHATA, S.; ALI, H. Production of microbial cellulose by tea Fungus 'kombucha'. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, [s. l.], v. 15, p. 41–47, 2007.

SHI, Z. et al. Food Hydrocolloids Utilization of bacterial cellulose in food. **Food hydrocolloids**, [s. l.], v. 35, p. 539–545, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.012>>

SHIH, Y.-T.; ZHAO, Y. Development, characterization and validation of starch based biocomposite films reinforced by cellulose nanofiber as edible muffin liner. **Food Packaging and Shelf Life**, [s. l.], v. 28, p. 100655, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214289421000235>>

SOHEIR S. ABD EL-SALAM. Bacterial Cellulose of Kombucha Mushroom Tea.

New York Science Journal, [s. l.], v. 5(4), p. 81–87, 2012.

STARK, N. Opportunities for Cellulose Nanomaterials in Packaging Films: A Review and Future Trends. **Journal of Renewable Materials**, [s. l.], v. 4, p. 313–326, 2016.

SURYA, E. et al. The utilization of peanut sprout extract as a green nitrogen source for the physicochemical and organoleptic properties of Nata de coco. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 29, p. 101781, 2020.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818120304539>

TIBOLLA, H.; MARIA, F.; CECILIA, F. LWT - Food Science and Technology Cellulose nano fibers produced from banana peel by chemical and enzymatic treatment. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 1311–1318, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.011>

TOME, L. C. et al. Preparation and characterization of bacterial cellulose membranes with tailored surface and barrier properties. **Cellulose**, [s. l.], p. 1203–1211, 2010.

TONGNUANCHAN, P. et al. Emulsion film based on fish skin gelatin and palm oil: Physical, structural and thermal properties. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 48, 2015.

TORÁN-PEREG, P. et al. Microbiological and sensory characterization of kombucha SCOBY for culinary applications. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, [s. l.], v. 23, p. 100314, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878450X21000135>

TORGBO, S.; SUKYAI, P. Bacterial cellulose-based scaffold materials for bone tissue engineering. **Applied Materials Today**, [s. l.], v. 11, p. 34–49, 2018.

TORRES, F. G.; ARROYO, J. J.; TRONCOSO, O. P. Materials Science & Engineering C Bacterial cellulose nanocomposites: An all-nano type of material. **Materials Science & Engineering C**, [s. l.], v. 98, n. January, p. 1277–1293, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.064>

TOYOSAKI, H. et al. Screening of Bacterial Cellulose-producing Acetobacter Strains Suitable for Agitated Culture. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [s. l.], v. 59, n. 8, p. 1498–1502, 1995.

TRAN, T. et al. Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. **Comprehensive**

Reviews in Food Science and Food Safety, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 2050–2070, 2020.

ULLAH, H.; SANTOS, H. A.; KHAN, T. Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery. **Cellulose**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 2291–2314, 2016.

VARANASI, S. et al. Producing nano fibres from carrots with a chemical-free process. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 184, n. November 2017, p. 307–314, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.056>>

VAZQUEZ, A. et al. Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by *Gluconacetobacter xylinus*. **Journal of Polymers and the Environment**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 545–554, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10924-012-0541-3>>

VIANA, R. M. et al. Nano fibrillated bacterial cellulose and pectin edible films added with fruit purees. [s. l.], v. 196, n. January, p. 27–32, 2018.

VILLARREAL-SOTO, S. A. et al. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Journal of food science**, United States, v. 83, n. 3, p. 580–588, 2018.

VILLARREAL-SOTO, S. A. et al. Physicochemical properties of bacterial cellulose obtained from different Kombucha fermentation conditions. **Journal of Vinyl and Additive Technology**, [s. l.], v. n/a, n. n/a, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/vnl.21795>>

WANG, M. et al. Water insoluble and flexible transparent film based on carboxymethyl cellulose. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 255, p. 117353, 2021. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861720315265>>

WANG, X. et al. Development and characterization of bacterial cellulose reinforced biocomposite films based on protein from buckwheat distiller's dried grains. **International journal of biological macromolecules**, Netherlands, v. 96, p. 353–360, 2017.

WANG, Z. et al. Improvement of polylactic acid film properties through the addition of cellulose nanocrystals isolated from waste cotton cloth. **International journal of biological macromolecules**, College of Materials and Technology, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 211100, China; School of Materials Engineering, Yancheng Institute of

Technology, Yancheng 224051, Jiangsu, China., v. 129, p. 878–886, 2019. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/30735776>>

WATAWANA, M. I. et al. Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. **Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 2015, 2015.

XIE, Y. et al. Active biodegradable films based on the whole potato peel incorporated with bacterial cellulose and curcumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 150, p. 480–491, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813019379085>>

YAMADA, Y. et al. Description of Komagataeibacter gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). **The Journal of general and applied microbiology**, Japan, v. 58, n. 5, p. 397–404, 2012.

YANG, Z. et al. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in high-cholesterol fed mice. [s. l.], n. September 2008, p. 150–156, 2009.

YANO, B. H. et al. Optically Transparent Composites Reinforced with Networks of Bacterial Nanofibers **. [s. l.], n. 2, p. 153–155, 2005.

YAO DÉSIÉ, A. et al. Starch-based edible films of improved cassava varieties Yavo and TMS reinforced with microcrystalline cellulose. **Heliyon**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. e06804, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844021009075>>

YIM, S. M.; SONG, J. E.; KIM, H. R. Production and characterization of bacterial cellulose fabrics by nitrogen sources of tea and carbon sources of sugar. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 59, p. 26–36, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511316302446>>

YOUNESI, M.; WU, X.; AKKUS, O. Controlled mercerization of bacterial cellulose provides tunability of modulus and ductility over two orders of magnitude. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, [s. l.], v. 90, p. 530–537, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1751616118305848>>

ZHANG, S. et al. Soy protein isolate-based films reinforced by surface modified cellulose nanocrystal. [s. l.], v. 80, p. 207–213, 2016.

ZHANG, W. et al. Isolation and identification of a bacterial cellulose synthesizing strain from kombucha in different conditions: Gluconacetobacter xylinus ZHCJ618. **Food Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 803–811, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10068-018-0303-7>>

ZHOU, Z. et al. Composition and functional properties of rice. **International Journal of Food Science and Technology - INT J FOOD SCI TECHNOL**, [s. l.], v. 37, p. 849–868, 2002.

Characterization and application of cellulose nanofibers from industrial kombucha waste in biodegradable starch film

Natália Paludo, Renato Queiroz Assis, Carlos Henrique Pagno, Simone Hickmann Flôres*

Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Agronomia, 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author

Simone Hickmann Flôres

E-mail: simone.flores@ufrgs.br

Abstract

Kombucha is a fermented beverage whose consumption has increased in the last few years. A bacterial cellulose (BC) film called SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast) is formed and discarded over time since it is considered industrial residual during the fermentation process. In this work, the use of a high-pressure homogenizer (HPH) was tested in the industrial kombucha waste for obtaining nanofibers and their use as reinforcement material in biodegradable films. The purification methodology reduced 94.22% of SCOBY's non-fibrous compounds and shows 97.33% of total dietary fiber on purified BC. BC application was evaluated on biodegradable starch films; 1%, 3%, and 5% BC additions were made with pre-treatment only in turrax and 30 passes in HPH. The films tensile strength with 1% CB with 30 passages in HPH increased 24% compared to the control film. The solubility in water decreased with a higher CB concentration, going from 37.36% at control film to 7.69% at 5% CB with 30 passages in HPH. BC from SCOBY presented structure and behavior similar to studies of BC obtained by traditional methods. It was shown to be a promising ingredient mainly due to its high content of dietary fiber and nanometric scale. The cellulose obtained from SCOBY with mechanical treatment at HPH can be used as reinforcement for biodegradable starch films, optimizing its mechanical, optical, and solubility parameters.

Keywords: SCOBY, Kombucha, Bacterial Cellulose, Nanocellulose, Industrial Waste, Biodegradable films

Abbreviations:

BC – Bacterial Cellulose

HPH - High Pressure Homogenizer

INTRODUCTION

Kombucha is a drink consumed for more than 2000 years made from sweetened *Camellia sinensis* tea and fermented due to a symbiotic association of bacteria (primarily acetic bacteria) and yeasts (C. Chen and Liu 2000). Because it has beliefs about its consumption bringing benefits to human health, the demand for kombucha has grown in the last few years, going from artisanal to industrial-scale worldwide. However, the increase in kombucha consumption causes more industrial residues, one of them being SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts), a material with high added value formed on the surface of the container at each fermentation.

SCOBY is a floating gel-like membrane, primarily composed of cellulose fibers and an excellent source of bacterial cellulose (BC). Some properties like structure and biosynthetic process followed by bacteria are like all the other single strain commercially produced BC. The bacteria present in SCOBY synthesize the cellulose network independent of the association of microorganisms present in your structure (Silvia Alejandra Villarreal-Soto et al. 2018). Cellulose is considered one of the most studied biopolymers due to its almost unlimited raw material source for the increasing demand for environmentally friendly and biocompatible products. Most commercial pulp comes from plant sources due to its availability, but its treatment involves considerable energy and environmental costs (Klemm et al., 2005). Therefore, CB is considered a less impactful alternative and greater industrial advantages because it has no impurities in its structure, such as hemicellulose and lignin, unlike plant cellulose (Goh et al., 2012).

The cellulose obtained through microbial processes is often called nanocellulose due to its crystallinity and the nano dimension of its fibers, which have diameters ranging from 25 to 100 nm and about 100 μm in length (Lee et al. 2014; Semjonovs et al. 2017). Nanocellulose shares the inherent chemical structure of cellulose with hydroxy groups, aldehyde groups, and carboxy groups. This nanostructure results in a significant specific surface area, active functionalization groups, crystallinity, and mechanical strength, which provides a broad spectrum of applications in different areas (Halib et al., 2017; Mondal 2018).

BC production itself is considered a methodology for obtaining cellulose nanofibers, in which its matrix structure is maintained. The most conventional methodology is Top-down, which starts from a larger macrostructure system to smaller subsystems of nanofibers (A. Sharma et al. 2019). Cellulose nanoparticles are commonly isolated by mechanical treatment or acid hydrolysis process. In mechanical treatment, the high shear, pressure, and cavitation processes and the forces applied in a high pressure homogenizer cause transverse cleavage along the cellulose structure's longitudinal axis, resulting in cellulose nanofibrils (Li et al. 2012). The use of nanocellulose as reinforcement material in polymeric matrices is promising (Azeredo et al. 2019) as well as combined with other biopolymers aiming to provide a more environmentally friendly alternative for the packaging area (Lee et al. 2014; Tibolla et al. 2014)

The production of BC has a high cost due to the time of the fermentation process and the large surface area needed (C. Sharma et al. 2020), so its reuse is relevant due to its technological differential. An alternative that aims to take advantage of this value-added by-product is the development of

biodegradable films with cellulose nanofibers. The development of new biodegradable films from polymers, such as starch, gelatin, and cellulose, are an alternative to petrochemical-based plastics, which cause serious environmental problems due to the accumulation of residues and is an unsustainable practice (Hopewell et al. 2009). Starch has been considered a promising matrix mainly because of an attractive combination of its wide availability and relatively low price (Sánchez-Ortega et al. 2016).

Cellulose nanofibers are widely studied and gain importance due to their unique characteristics, mainly related to their high surface area concerning volume and attractive mechanical properties such as flexibility and strength (Varanasi et al. 2018). Furthermore, studies optimize the obtainment of these nanofibers from industrial residues from plant sources (Pelissari and Menegalli 2014; Varanasi et al. 2018) of wood (W. Chen et al. 2011) and bacterial (Rozenberga et al. 2016), as is shown as an interesting application in biodegradable films as a reinforcement for its structure.

Studies that assess the feasibility of using waste generated on an industrial scale and proposals for possible applications that fit the needs of today's society are of paramount importance to add knowledge and reuse this waste. In the present work, bacterial cellulose nanofibers will be obtained from SCOBY, already formed and developed, from mechanical treatment of the high-pressure homogenizer and applied as a reinforcement of biodegradable starch films.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The bacterial cellulose (BC) industrial waste (SCOBY) was kindly provided by a local kombucha company (Porto Alegre, RS, Brazil) and was kept refrigerated at 4 °C until use. The SCOBY was synthesized from static fermentation of kombucha and the use of green tea, black tea, and crystal sugar as substrates. For the preparation of the films were used cassava starch (CS) (Yoki Alimentos, São Paulo, Brazil) and glycerol (Merk) was used as a plasticizer. All other chemicals and solvents were of analytical or pharmaceutical grade.

Preparation and purification of bacterial cellulose

The purification methodology was adapted from Rozenberga et al. 2016. SCOBY was intensive washing with filtered water and crushed in a processor to increase surface area. Ultrasound bathes (5 x 10 min) with distilled water were used to assist the removal of surface dirt. Afterwards, SCOBY has placed in NaOH 1N solution (SCOBY 1:2 NaOH) at 92 °C for 1 h. After the alkaline treatment, the ultrasound baths were repeated, and SCOBY was washed several times until neutral pH conditions were reached. The SCOBY samples before and after purification were later characterized and named as PS (Purified SCOBY) and IS (Intact SCOBY).

Obtainment of bacterial cellulose nanofibers

After purification, the bacterial cellulose was diluted in distilled water in the proportion 1: 2 and submitted to grinding with an Ultra-Turrax (Ika, T25, China) for 15 min at 15000 rpm for better dispersion of the bacterial cellulose before the homogenization stage. A high pressure homogenizer (HPH) was used (NS 1001 L - Panda 2K, GEA Niro Soavi Brasil). The equipment does not have a recirculation system, so 10, 20, and 30 passes of the sample were carried out in the homogenizer with a pressure of 600 bar to evaluate the best conditions and characterize the nanofiber (Dima et al. 2017; Okiyama et al. 1993). The samples were named PS0 (Purified SCOBY without HAP, turrax only), PS10 (Purified SCOBY with 10 HAP passes), PS20 (Purified SCOBY with 20 HAP passes), and PS30 (Purified SCOBY with 30 HAP passes).

Film Preparation

The films were produced by casting. The control films were obtained by solubilizing the cassava starch (4 g/100 g) in distilled water, under mechanical agitation for 30 minutes at 80 °C, and glycerol as plasticizer (0.1 g/g starch). Films with bacterial cellulose nanofibers were obtained from samples diluted in distilled water of PS0 (only turrax) and PS30 in concentrations of 1, 3, and 5% (g nanofibers/ g starch). This aqueous solution was added to the same volume of distilled water as the control film. The film-forming solutions were placed on acrylic plates (24 g/cm²) and dried in an oven with forced circulation (DeLeo, model B5AFD, Brazil) at 35 °C for 16 h.

Characterization of Bacterial Cellulose Nanofibers

Chemical analyses were performed to determine the proximate composition of the SCOBY before, and after purification (IS and PS) The total protein content was determined by the Kjeldahl method with a nitrogen-to-protein conversion factor of 6.25. The lipid content was determined by Bligh & Dyer method (Bligh and Dyer 1959). The ash content was measured in a muffle furnace (ElektroTherm Linn, 312.6 SO LM 1729, Germany) set to 550 °C. The moisture content (MC) was determined by desiccation of the sample in an oven at 105 °C (DeLeo, model TLK 48, Porto Alegre, Brazil). The total dietary fiber was determined by the enzymatic–gravimetric method. Finally, the carbohydrate content was determined by the difference from the other components. All analyses were performed in triplicate and the results are expressed as grams per 100 g of SCOBY in dry matter.

The samples IS, PS, PS0, PS10, PS20, and PS30 were lyophilized and ground for the following characterization analyses: SEM and TGA to correlate the size and aspect of the particles and the physical-chemical properties of bacterial cellulose with different conditions.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

The morphological properties of the bacterial cellulose were evaluated through a scanning electron microscope (JEOL, JSM 6060, Japan). The samples: IS, PS, PS0, PS10, PS20, and PS30 were lyophilized, and the selected films were cut into small pieces, and both were fixed with double-sided tape on aluminum stubs. All samples were metalized with a thin layer of gold; the surface and cross-section was observed with an acceleration voltage of 10 kV and a magnification of 5000x and 20000x.

Thermal Stability

The thermal stability of the bacterial cellulose was studied using thermogravimetric analysis. This was performed under argon flow on a Shimadzu Instrument, model TGA-502, with a heating rate of 10 °C min⁻¹ from room temperature up to 600 °C.

Characterization of biodegradable Films

The starch films containing bacterial nanocellulose were characterized by determining the water solubility, water vapor permeability, thermal (TGA), and optical (color, opacity) properties. The films were kept in desiccators under 58 % RH at 25 °C for 48 h before being characterized of mechanical properties (tensile strength and percent elongation at break). TGA analyzes was performed with the same methodology used for BC.

Water Solubility

To determine the water solubility of the films, the samples (2 cm diameter discs) were previously oven-dried (DeLeo, TLK48, Brazil) at 105 °C for 24 hours. Then, the remaining samples from the drying process were immersed in distilled water (30 mL) and shaken with shaking (25 °C/24 h) (Nova tecnica, NT145, Brazil). Finally, all samples were again subjected to drying (105 °C/24 h), where the material not solubilized was weighed to determine dry final weight resulting from the solubilization process (Gontard et al. 1992). The solubility was calculated using eq. (1).

$$S \% = 100 * [(w_i - w_f) / w_i] \quad (1)$$

Where w_i is the initial dry weight of the sample (g), and w_f is the final dry weight of the sample (g).

Water Vapor Permeability (WVP)

The method used to determine the WVP was ASTM E-96-95, as Pagno et al. (2015) described. The films samples were placed in permeation cells (inner diameter: 63 mm, height: 25 mm), filled with granular anhydrous calcium chloride, and hermetically sealed. The permeation cells were placed in a glass chamber with saturated sodium chloride solution, providing RH gradients of 0–75% at 25 °C. The mass gain was monitored for 24 h by weighing the permeation cell on an analytical balance (AY 220, Shimadzu). The water vapor permeability of the samples was determined in triplicate using

$$WVP = (w \cdot L) / (A \cdot t \cdot \Delta p) \quad (2)$$

Where w is the weight of water permeated through the film (g), L is the thickness of the film (mm), A is the permeation area (m²), t is the time of permeation (h), and Δp the water vapor pressure difference between the two sides of the film (KPa). The WVP was expressed as g mm h⁻¹ m⁻² kPa⁻¹ (Pagno et al., 2015).

Optical Properties (color, opacity)

Color analysis was performed using the Minolta model colorimeter (CR-300; Minolta Co, Ltd, Japan). The CIELab system was used to determine color parameters, where a^* indicates the region of red (+ a^*) to green (- a^*), b^* indicates the region of yellow (+ b^*) to blue (- b^*), and L^* is luminosity. Then, the color difference (ΔE^*) was calculated in relation to the CSF, according to the following equation:

$$\Delta E^* = \sqrt{[(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2]} \quad (3)$$

where L_0^* , a_0^* , and b_0^* are the color parameters of CSFs. The light transmission barrier of films was determined by measuring the film absorbance at 210 and 500 nm using a UV spectrophotometer (model UV-1800, Shimadzu, Japan). Films were cut into rectangles (3 × 1 cm) and positioned on the inner wall of the test cell. An empty quartz test cell was used as a control, and the analysis was performed in triplicate.

Thickness and Mechanical Properties

The thickness was obtained by reading at random points, and the result was expressed as the average of 10 points, using a digital micrometer (Digimes, IP40, Brazil). In addition, the tensile strength (TS) [MPa] and percent elongation at break (EB) [%] were evaluated using a tensile test performed on a texture analyzer (TA.XT2i e Stable Micro Systems, UK) with a load cell of 5 kg and using an A/TGT self-tightening roller grip fixture, according to ASTM D882-09 (2009).

Biodegradability of the Films

Natural organic soil (Vida Ecological Development Ltda, Brazil) was used to determine the biodegradation rate of the films, placed in plastic boxes (6 × 6 × 6.5 cm). The films were cut (2 × 3 cm) and dried at 60 °C for 24 hours (m_0) in an oven (model TLK48, DeLeo, Brazil). Films were packed in aluminum mesh pre-weighed and placed in contact with the organic soil, 4 cm from the surface of the plastic box. Every 3 days for 12 days, the films were removed from the soil, washed with distilled water to remove the soil particles, and dried at 60 °C for 24 hours (m_t). Water was added (5 mL) to maintain soil moisture (40 % RH). The rate of biodegradability of the films was determined by weight loss analysis according to the following equation (Martucci and Ruseckaite 2009):

$$WL (\%) = [(m_t - m_0) / (m_0)] \times 100 \quad (4)$$

Where m_0 is the initial dry weight of the sample (g), and w_f is the final dry weight of the sample (g) after 3, 6, 9, and 12 days.

Statistical Analysis

Statistica 12.0 (StatSoft, Inc, Tulsa, USA) was used for statistical analysis. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test was used to test to the significance of differences between the means at a p level of 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

Bacterial cellulose SCOBY characterization

The results of the proximate composition of BC before and after the purification process are important for the validation of the purification method and are described in Table 1.

Table 1 – Centesimal composition of Intact and Purified SCOBY.

	Intact SCOBY	Purify SCOBY
Ash (d.m)	1.04 ± 0.00 ^a	1.05 ± 0.00 ^a
Protein (d.m)	5.07 ± 0.07 ^a	0.56 ± 0.04 ^b
Total lipids (d.m)	3.36 ± 0.55 ^a	0.51 ± 0.11 ^b
Carbohydrate (d.m)	19.56	0.55
Total dietary fiber (d.m)	70.97 ± 0.21 ^a	97.33 ± 1.65 ^b
Moisture	97.92 ± 0.05 ^a	98.91 ± 0.05 ^b

Values are mean ± standard deviation; n=3 (d.m) = dry matter. Different letters indicate significant differences (p < 0.05) in the same column.

The results show that SCOBY presented 70.97% of total fiber in its composition, a value obtained through the dietary fiber's enzymatic method, the main macronutrient in its structure. This method comprises the sum of plant material in the diet that is resistant to enzymatic digestion; including

cellulose, non-cellulosic polysaccharides such as hemicellulose, pectic substances, gums, mucilages, and a non-carbohydrate component, lignin (Dhingra et al. 2012). The study of the composition of SCOBY, as a possible food ingredient, was carried out by Jayabalan et al. (2010), where they evaluated its biochemical properties in order to use it for nutritional enrichment of animal feed. The amino acid profiles were studied and quantified, as well as the composition of crude protein (23.1%), crude fiber (14.79%), crude lipid (5.4%), and ash (3.9%) at the 21st fermentation day. The crude fiber values found in this study are only a portion of the fibers analyzed, as values for acid detergent fiber (32.9%) and neutral detergent fiber (38.9%) were also quantified (Jayabalan et al. 2010).

After the purification process, 97.33% of total fibers were obtained in SCOBY. This value agrees with the literature proving that bacterial cellulose is composed of thousands of cellulose fibers and chains. (Chawla et al. 2009) and that cellulose is insoluble fiber (Dhingra et al., 2012). However, other values of total dietary fiber (analyzed by the enzymatic method) of SCOBY (with or without purification), without adding additional components in its structure, were not found in the literature. Bacterial cellulose has been considered a “GRAS” dietary fiber – generally recognized as safe – by the Food and Drug Administration (FDA) since 1992 (Ullah et al., 2016).

The proximate composition showed the removal of 94.22% of impurities (sum of lipids, proteins, and carbohydrates) from SCOBY after the purification process. Sodium hydroxide does not act on the removal of ash from SCOBY, being the only component that did not obtain a significant difference between its pre and post-purification results. The ash values obtained in the intact SCOBY was 1.5%, lower than that found by Jayabalan et al. (2010) of 3.9% on the 21st day of fermentation. However, the ash content reported in the same study for 7 and 14 days of fermentation was 0.83% and 2.9%, respectively. These values are in accordance with the most used fermentation times for kombucha, which are reported between 7 and 10 days (Silvia Alejandra Villarreal-Soto et al. 2018). While for bacterial cellulose, Mitrofanov et al. (2010) obtained 1.0% of ash in their sample, a value close to that found in the purified SCOBY (1.05%) of the present work.

By proximate composition analysis, the moisture values obtained in the present work for intact and purified SCOBY were 97.92% and 98.91%, respectively. When evaluating the impact of the NaOH purification process on the samples, Amarasekara et al. (2018) observed a greater wet weight gain after washing, which may be due to the opening of pores in the cellulose structure, causing it to absorb more water and the sodium ions themselves (Amarasekara et al. 2020).

The amount of protein obtained in the present work was $5.07\% \pm 0.07$ for intact SCOBY and $0.56\% \pm 0.04$ for SCOBY after the purification process, a reduction of 89% in protein content, which confirms the high degree of purity of SCOBY. The studies commonly carried out for the characterization of bacterial cellulose refer to its technological, mechanical, purity, and crystallinity properties. As for its proximate composition of protein values by the Kjeldahl method, there are not enough studies for direct comparison, although studies report the presence of amino acids and extracellular proteins in bacterial cellulose related to bacterial cellulose formation (Flemming and Wingender 2010).

However, proximate composition values are interesting for the characterization of SCOBY since its composition is mainly formed by dietary fibers that can be used in its wet form for culinary preparations (Torán-Pereg et al., 2021) and in its dry state to increase the fiber contents of a source.

Morphological Properties

BC obtained through kombucha fermentation acts as a source of nutrients such as proteins, extracellular enzymes, yeasts, among others (Flemming and Wingender 2010; Jayabalan et al. 2010). These components represent an important energy source during the fermentation process of kombucha; however, they are considered impurities as they remain adhered to the film structure, as seen in Fig. 1. The images in Fig. 1(1) show 5.000x and 20.000x magnifications of the lyophilized SCOBYs before and after the purification process. In it, the effectiveness of the purification process can be observed, where the components considered to be impurities (yeasts, sugars, proteins) were removed from the film surface and are represented by red arrows. In addition to impurities, the structure of bacterial cellulose is noted with its microfibril tangles with a diameter smaller than 100 nm, as observed in other studies, which is a differential when compared to vegetable cellulose structures (Dima et al. 2017; Goh et al. 2012).

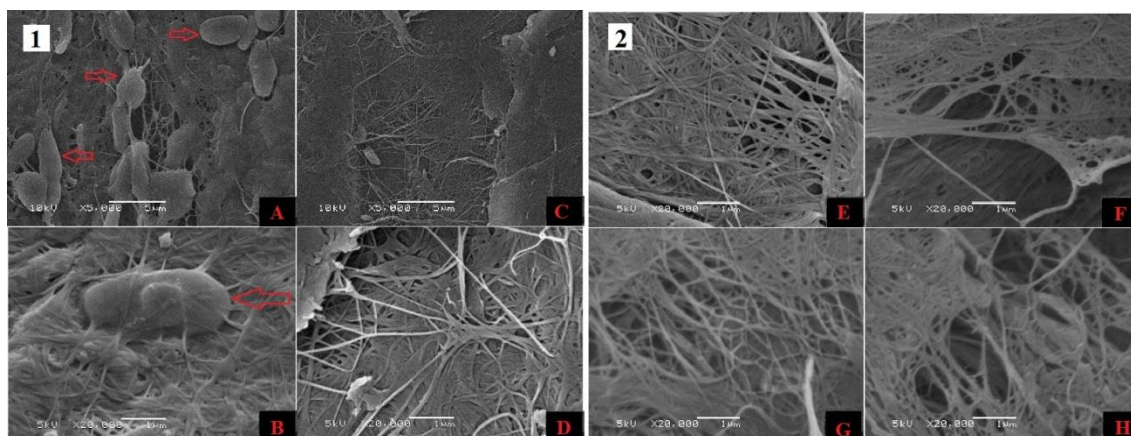


Fig. 1 – Scanning electron micrographies of (1):Intact SCOBY A: 5.000x e B: 20.000x; Purify SCOBY C: 5.000x and D: 20.000x. (2) E: PS0; F: PS10; G: PS20 and H: PS30 with 20.000x.

The purification process is relevant to the properties of SCOBY since a higher presence of microbial cells can reduce the contact between fibrils within its network, reducing the number of hydrogen bonds and, therefore, the strength of the nanofibers of its structure (Silvia A Villarreal-Soto et al. 2020). Fig. 1(2) illustrates the Purified SCOBY samples that underwent mechanical treatment only with turrax – PS0; the samples that passed through the HPH 10x, 20x, and 30x were coded as PS10, PS20, and PS30, respectively. The images were taken with 5 kV acceleration and 20.000x approximation for a visual and sizing comparison of the structure and cellulose nanofibers present. Components considered impurities in the structure, such as yeast and amino acids, visualized in the intact SCOBY sample, are not visualized in the samples in Fig. 1(2), confirming the efficiency of purification and disposal of the nanofibers.

Cellulose obtained from microbial processes are often called nanocelluloses due to the nanodimensions of their fibers, mainly determined by their diameter of less than 1 µm, which already defines it as the nanoscale (Lee et al. 2014; Torres et al. 2019). The HPH is an alternative to reduce the size of fibers and make them more homogeneous, reaching the nanometer scale in most of their filaments and arrangements. Dima et al. 2017 evaluated the high-pressure effect at 1300 bar on purified SCOBY and, from SEM analysis, reported fibers of lengths 100-500 µm and 60-100 µm for 1 and 25 passes in

HPH, respectively (Dima et al. 2017). However, another study using HPH was also carried out ranging from 100 to 550 bar applying pressure in BC suspension, in which the morphological analysis identified microfibrils of 20-100 nm in diameter with a length of >50 μm after the disintegration of the suspension when passing through the homogenizer 30 times (Okiyama et al. 1993).

The images obtained from SEM (Fig. X) illustrate the random arrangement of nanofibers with lengths in the micrometric scale along their filaments. Fig. 1(2) shows a greater dispersion of cellulose fibers, increasing their surface area over a greater number of passes of the applied mechanical treatments. This dispersion is not seen in the samples of intact (SI) and purified (SP) SCOBYs in Fig. 1(1), which were not subjected to mechanical treatments and are presented in a compacted form in the images obtained.

Thickness and Mechanical Properties

The results regarding the thickness and mechanical properties of the films are reported in Table 2. The lowest value found for thickness was 0.054 mm of the sample with 1% addition of BC. In contrast, with a significant difference between, the highest value was 0.100 mm for the film with the higher addition of BC (5%) and treatment only with turrax. The samples did not follow a linear increase or decrease in thickness values when added with BC with treatment in the HPH since the results for the control sample were similar to the samples with the addition of 1 and 3% of BC with the passage in the HPH (no difference with 95% significance). This nonlinear behavior was also observed in the study by Xie et al. (2020) that showed no statistical difference between the thicknesses of their control samples with the addition of 5% and 10% of BC. Only the film with the addition of 15% of BC showed a higher value when compared to the control film.

However, the films that had only the mechanical treatment in turrax showed statistically higher thickness values, both compared to the control and to those with passage through the HPH. These values did not differ statistically between the added BC concentrations. This greater value of thickness and difference between the rest of the samples may have been caused by the poor dispersion of the BC solution in the starch film, corroborated by the higher standard deviation of these films.

Table 2 – Thickness (mm), tensile strength (TS), and the elongation at break (EAB) of starch films with and without bacterial cellulose (BC) and different treatments.

Films	Thickness (mm)	Tensile strength (MPa)	Elongation at break (%)
Control	0.062 \pm 0.003 ^{cd}	34.97 \pm 1.47 ^b	1.80 \pm 0.23 ^c
T 1% BC	0.091 \pm 0.010 ^{ab}	19.80 \pm 2.68 ^c	2.77 \pm 0.15 ^a
T 3% BC	0.099 \pm 0.013 ^a	21.10 \pm 2.44 ^c	2.29 \pm 0.22 ^b
T 5% BC	0.100 \pm 0.005 ^a	19.69 \pm 2.38 ^c	2.56 \pm 0.32 ^{ab}
30x 1% BC	0.055 \pm 0.003 ^d	43.34 \pm 1.02 ^a	2.44 \pm 0.25 ^{ab}
30x 3% BC	0.065 \pm 0.005 ^{cd}	42.60 \pm 2.51 ^a	2.29 \pm 0.21 ^b
30x 5% BC	0.073 \pm 0.006 ^{bc}	43.34 \pm 1.01 ^a	2.20 \pm 0.11 ^b

Values are mean \pm standard deviation; n=3. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) in the same column.

The maximum tensile strength (TS), commonly expressed in MPa, is the strength offered by the material at the rupture point. The values obtained in the present work regarding the mechanical properties of the films are shown in Table 2. In the films with 30 passes in the HPH, an average increase of 20% in the TS values was observed, regardless of the concentration of CB added compared to the control film. While the films with BC mechanically treated only in turrax presented lower values than the control and the one with BC that received treatment in the HPH. These lower values of films with the addition of BC may have occurred due to poor dispersion of cellulose in the starch matrix, causing strong hydrogen bonds commonly associated with BC not to occur, thus decreasing the TS of the films.

When evaluating the effect of adding BC to starch films, Chiulan et al. (2018) obtained a significant increase in their TS values, with 17.2 MPa for the control film (starch/PVA) and 21.0, 25.3, 33.6, and 29.5 MPa for the respective additions of BC: 0.5, 1, 2 and 5%. Liu et al. (2020) also had a great impact on the mechanical properties of their films based on a polysaccharide called gluconomann konjak (GMK), with an increase in the concentration of BC; when the BC content increased from 0 to 4%, the TS of the films increased from 46.43 MPa to 82.01 MPa, concluding that this behavior may have occurred due to an increase in hydrogen bonds between GMK and BC, suggesting that there was an improvement in the internal rigidity of the films.

Fabra et al. (2016) found no significant difference when they added BC to starch films at concentrations of 2% (12.5 MPa) to 10% (11.3 MPa) compared to the control film (11.2 MPa). However, a significant increase in their TS with concentrations of 15% (18.9 MPa) and 20% (20 MPa). The present work, however, presented higher TS values (with statistical difference $p < 0.05$) than the control when added BC, not differing statistically between the different concentrations of added BC. These results were similarly obtained by Chiulan et al. (2018), which defined a 2% BC addition (TS = 33.6 Mpa compared with 17.2 MPA of control) as the film chosen as the most promising for food packaging applications.

The elongation at break (EAB) parameter was also evaluated, an index of the flexibility or ductility of films in which, in most cases, its value changes inversely compared to the TS values (Marvizadeh et al. 2017). The results obtained in the present work were 1.80% for the control film, and a slight increase was observed, regardless of the concentration of BC added to the films and the applied process (turrax + HPH or only turrax).

Liu et al. (2020) showed an increase in EAB values with increasing BC concentration (0 to 2%) from 6.34% to 9.44%. However, this percentage decreased when higher concentrations of BC were evaluated, showing EAB values of 5.7% for the highest concentration of 4% of BC. This fact is explained by the possibility that the high content of BC with its large number of hydrogen bonds prevents the movement of polymer molecules in the films, making them more rigid. Xie et al. (2020) showed EAB reduction with increasing BC concentration in films with 5% potato peel, while films with 3% potato peel did not show a statistical difference in EAB from their control film and with additions of BC.

In general, the incorporation of BC in starch films improved the mechanical properties of the developed films. The analyses performed showed a significant difference in the tensile strength values and percentage of elongation at break of films with BC addition compared to the starch control film, regardless of the concentration of BC added. A higher concentration of bacterial nanocellulose in starch films caused a weak dispersion in the starch matrix, decreasing the film strength as observed by Gray et

al. (2018). Using pressure over 1000 bar in the HPH can improve mechanical properties and possible greater interaction of nanofibers with the starch matrix.

Water Vapor Permeability (WVP) and Water Solubility (WS)

Water solubility was measured to estimate the water resistance of the films. Table 3 shows that was a significant decrease ($p < 0.05$) in the solubility of the control film (37.36%) compared with BC addition films, which varied from 22.52% for the film with the addition of 1% BC and treatment only with turrax, up to 7.69% for the film with the addition of 5% BC passing through the HPH. This decrease may be associated with the interaction between the matrices, referring to the hydrogen bonds formed between the hydroxyl groups of starch and BC, leading to the formation of three-dimensional cellulose networks. These networks restrict the movement of low molar mass polymers and other compounds towards the water, limiting the solubility of the films (Noshirvani et al., 2018). These results corroborate the water-insoluble structure of cellulose, which tends to decrease film solubility with increasing cellulose concentration (M. Wang et al., 2021).

Xie et al. (2020) evaluated the impact of adding 5, 10, and 15% bacterial cellulose to potato peel films. The solubility of the films gradually decreased with the increase of BC concentration, from 33.5% for the control to 30.2% for the film with the addition of 15% of BC. As well as another study using films based on protein from buckwheat distiller's dried grain reinforced with BC also observed a decrease in solubility of films from 21.39% (control) to 18.55% with the addition of 10% BC after 24 h of immersion (X. Wang et al. 2017). Shih and Zhao (2021) obtained 19.7% and 16.45% solubility for cassava starch films added 5 and 10% cellulose nanofibers, respectively. This result was attributed to a network formation of nanofibers that hindered the diffusion of water through the starch matrix (Shih and Zhao 2021). Although all the films with the addition of BC showed a significant reduction in solubility compared to the control film, The films that received treatment only with turrax showed a smaller reduction with the increase in the concentration of BC added, indicating that the effect of HPH on cellulose fibers showed a better dispersion in starch and consequently a lower solubility of these films.

This reduction in film solubility is desired to provide water resistance and protect the food product integrity to be packaged. Higher solubility may be expected in products that will be consumed along with the food in its cooking or preparation; however, when the food is liquid or aqueous, films with high solubility are not indicated.

Table 3 – Water vapor permeability (WVP) and water solubility (WS) of starch films with and without bacterial cellulose (BC) and different treatments.

Films	WVP (g.mm/m ² .h .kPa)	WS (%)
Control	0.175 ± 0.005 ^c	37.36 ± 1.9 ^a
T 1% BC	0.211 ± 0.021 ^{ab}	22.53 ± 1.4 ^b
T 3% BC	0.224 ± 0.007 ^a	21.80 ± 0.6 ^b
T 5% BC	0.202 ± 0.006 ^b	18.58 ± 1.3 ^c
30x 1% BC	0.168 ± 0.003 ^c	15.38 ± 2.2 ^d
30x 3% BC	0.165 ± 0.006 ^c	12.68 ± 1.2 ^d
30x 5% BC	0.163 ± 0.002 ^c	7.69 ± 1.2 ^e

Values are mean ± standard deviation; n=3
 Different letters indicate significant differences (p < 0.05) in the same column.

In the present work, the films with the addition of BC with mechanical treatment only in turrax presented a higher value of WVP compared to the control and with treatment in HPH. While the films passed in the HPH showed no statistical difference compared to the control film Control film presented WVP value of 0.175 g.mm/m².h .kPa and the highest value obtained was 0.224 g.mm/m².h .kPa for the film with the 3% BC addition and only passing through the turrax. This increase suggests a poor dispersion of BC in the starch film, corroborating the results of Coelho et al. (2016) at concentrations of >5% BC. Coelho et al. (2020) evaluated the effect of adding cellulose nanocrystals (CNC) obtained from grape pomace to starch films. The starch control film had 7.5×10^{-7} g. hm. Pa⁻¹ WVP and after adding 1% and 2% CNC, the WVP values decreased (4.25 and 4.55×10^{-7} g. hm.Pa⁻¹, respectively). However, when the concentration of CNC increased in the films (5%, 10%, and 15%), the WVP increased significantly (p<0.05). Suggesting that lower concentrations of CNC present better dispersion in the starch matrix, providing an increase in the path of water molecules in the polymer matrix, thus decreasing its WVP.

The reduction of WVP values was observed in previous studies with the addition of 2 to 20% of BC in thermoplastic corn starch films with WVP values of 0.155 g mm/h m² kPa for control and 0.064 g.mm/h.m².kPa when added with 15% of BC (Fabra et al. 2016) as well as when BC nanofibers were added to polyvinyl alcohol/starch films. The WVP values were 0.219 g mm/h m² kPa for control and reduced to 0.147 g mm/h m² kPa with the addition of 5% BC (Chiulan et al. 2018). The strong interactions between CB and starch and the tortuous pathway provided by the nanofiller were considered as the main reasons for this behavior.

In another study, the incorporation of cellulose nanofibers (CNF) showed a reduction in WVP up to 3% of CNF due to the good dispersion of these nanofibers in the starch matrix, which prevented the entry of water molecules into the films. However, at the 4% concentration of CNF, the WVP of the films increased, possibly due to the agglomeration of nanostructures in the films leading to faster diffusion of water vapor through the film (Balakrishnan et al. 2017). The permeability decrease by adding BC nanofibers can be explained by its nano-size and network formation (Anglès and Dufresne 2000) along with the good BC-starch interfaces, which reduce the chain mobility and thus, reduce chain mobility the water diffusivity.

Optical Properties (color, opacity)

The study of the optical properties of films is relevant for the presentation of food products and their protection against direct lighting. The color characteristics of the developed films are shown in Table 4. The control film shows the highest luminosity value (L^*) (39.55), differing significantly ($p < 0.05$) from the rest of the films, suggesting that pure starch films are the clearest and most transparent compared to the added BC films. The films with the addition of BC only treated with turrax showed no significant difference between the concentrations of BC added. However, the films with 30 passes in HPH showed lower brightness in the highest concentrations of added BC (3 and 5%) than the film with a lower concentration of BC (1%).

The values found for red (a^*) and yellow (b^*) increased since the values were positive, indicating that the films are slightly yellow after the addition of cellulose. These parameters had a significant difference between the control and the films added with BC, regardless of the applied mechanical treatment. The total color difference (ΔE) of films that passed only through turrax with different bacterial cellulose contents when compared to only starch films increased significantly from 0.66 (1% BC) to 1.38 (3% BC), not statistically differing the film from 5% BC. However, these values and the differences between these films are not noticeable to the naked eye. While films with 30 passes in the HPH obtained statistical difference between the lowest concentration of added BC, 1.01 for 1% BC up to 2.09 for 5% BC. These significant differences indicate a color difference between the samples and that the transparency of starch films is lower than that of starch-based films when non-dispersible substances such as BC are added, corroborating the results found by Wang et al. (2021).

Table 4 – Color parameters of starch films with and without bacterial cellulose (BC) and different treatments.

Films	Color parameters				Opacity ($A \cdot \text{mm}^{-1}$)	
	L^*	a^*	b^*	ΔE	210 nm	600 nm
Control	39.55 ± 0.57^a	0.36 ± 0.04^c	1.18 ± 0.1^c	-	14.53 ± 0.07^b	6.58 ± 0.71^c
T 1% CB	38.89 ± 0.37^b	0.46 ± 0.02^b	1.31 ± 0.02^b	0.66 ± 0.3^d	12.62 ± 1.02^b	8.54 ± 1.39^c
T 3% CB	37.68 ± 0.21^{bcd}	0.49 ± 0.02^{ab}	1.47 ± 0.04^a	1.38 ± 0.06^{bc}	12.42 ± 0.87^b	6.76 ± 0.07^c
T 5% CB	37.89 ± 0.44^{bc}	0.43 ± 0.03^{bc}	1.25 ± 0.03^b	1.31 ± 0.4^{bc}	14.66 ± 1.55^b	9.22 ± 0.88^c
30x 1% CB	38.04 ± 0.26^b	0.49 ± 0.06^{ab}	1.32 ± 0.05^b	1.01 ± 0.3^{cd}	22.85 ± 0.22^a	14.39 ± 0.24^b
30x 3% CB	37.27 ± 0.55^{cd}	0.46 ± 0.08^b	1.46 ± 0.1^a	1.78 ± 0.08^{ab}	23.51 ± 1.35^a	17.03 ± 0.8^{ab}
30x 5% CB	36.96 ± 0.72^d	0.55 ± 0.04^a	1.46 ± 0.14^a	2.09 ± 0.01^a	24.7 ± 1.06^a	18.88 ± 0.68^a
Values	are	mean	\pm	standard	deviation;	n=3

Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) in the same column.

As previously reported, the addition of BC reduced the luminosity transmitted by the films. Consequently, it increased their opacity, becoming less transparent with increasing BC concentrations, indicating a greater barrier to the light passage, as was observed in the study by Xie et al. (2020) in films of potato peel. Table 3 shows the opacity values for two wavelengths, 210 nm, and 600 nm. The addition of BC (with HPH passes) led to improved UV and visible light blocking. In the visible light region (600

nm), the absorbance increased significantly after the addition of BC, showing 6.58 A.mm⁻¹ for the standard starch film and up to 18.88 A.mm⁻¹ for the film with the addition of 5% BC with 30 passes in the HPH. Liu et al. (2020) developed films with konjak glucomannan, evaluated additions of 1 to 4% of BC nanofibers, and observed an increase in absorbance values at 600 nm with increasing concentrations of BC. On the other hand, films that only passed through the turrax did not show statistical difference compared to the control film, and cannot be related to a physical protection of the film at this wavelength.

When the absorbance was evaluated in the UV region (210 nm), the films passing only through the turrax, as well as in the visible light region, showed no statistical difference ($p>0.05$) when compared to the control film. While the values of the film with the addition of BC with 30 passes in the HPH were higher when compared to the control starch film (14.53), obtaining absorbance values of 22.85 (1% BC), 23.51 (3% BC), and 24.7 (5% BC). Thus, it was found that the addition of BC to starch films increases the light barrier capacity, which can help protect packaged foods against possible deterioration induced by contact with light, such as protein and lipid oxidations, among others (Z. Wang et al. 2019).

Thermal Stability

Thermal stability was tested using thermogravimetric analysis (TGA) to evaluate decomposition of BC and films. The results from intact and purified SCOBY with different treatments are shown in Fig. 2A. During the initial heat treatment, all samples showed a small weight loss from room temperature to 150 °C due to water loss, as shown in Fig. 2A, which shows the mass loss with increasing temperature. There was a difference in weight loss between samples of intact SCOBY (SI) and purified SCOBY (SP), of 8.13% for SI and 5.18% for SP, of their mass degradation between 0 and 150 °C. This higher weight loss is related to water and volatile components in the SI, compared to SP and the rest of the purified samples. This behavior suggests greater water retention in its structure and the presence of thermally sensitive compounds such as melanoidins (Dima et al., 2017).

Samples of purified SCOBY with 10 and 20 passages (SP10 and SP20) had the beginning of their higher degradation in a lower temperature range, within 220 °C to 350 °C. Amarasekara et al. (2020), who compared SCOBYs with different purification methodologies, obtained samples with fast decomposition and higher weight losses in the range of 270 °C to 280 °C. The purified samples SP, SP0, and SP30, started their highest degradation step between 360 °C and 390 °C, resulting in a significant weight loss at the end, between 86 and 90%, with no significant difference between them. These degradation values in this temperature range are consistent with BC samples from a strain of *Gluconacetobacter xylinus* presented by Mohammadkazemi et al. (2015). They may be associated with a degradation of cellulose, including depolymerization, dehydration, and decomposition of glucose units, followed by the formation of a carbon residue (Vazquez et al., 2013).

Dima et al. (2017), who evaluated the impact of 1, 10, and 25 passes in a microfluidizer (1300 bar) on the thermal stability of intact SCOBY, found no difference between the samples, probably due to the presence of non-cellulosic products. When comparing the same number of passes for microcrystalline cellulose, the higher number of passes through the microfluidizer led to a gradual increase in thermal

stability. The present work showed the same inclination and behavior for the purified samples from SCOBY, with no considerable difference in the treatments received between them.

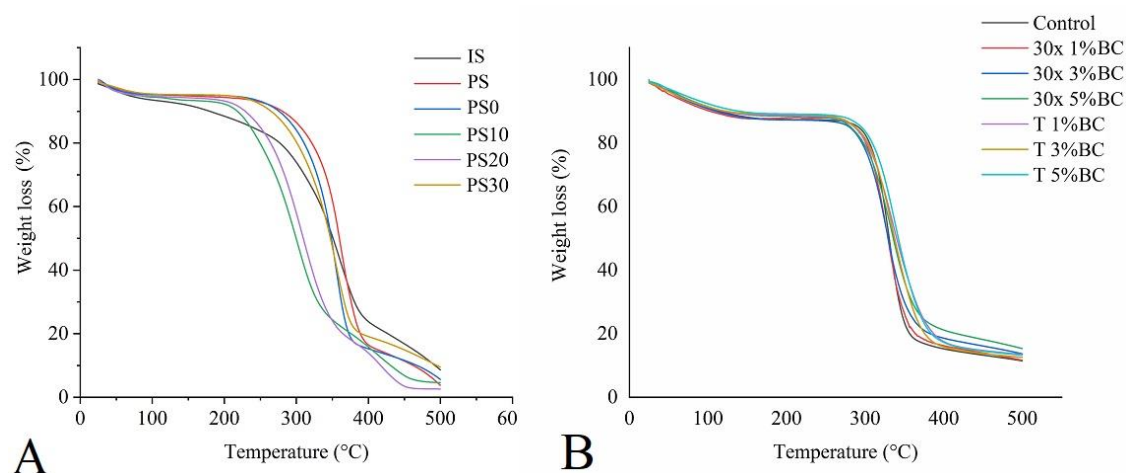


Fig. 2 - Thermogravimetry (TGA) curves of (A): Intact Scoby and Purify Scobys with different treatments. (B): starch films incorporated with and without bacterial cellulose (BC) with different concentrations.

The thermal decomposition of the films is shown in Fig. 2B. The first inflection in the graph was identified up to a temperature of 150 °C. The films weight loss on this inflection was 12% in weight, referring to the evaporation of water from the films, as reported in other studies (Assis et al. 2018; Collazo-Bigliardi et al. 2019). The second point of films degradation occurs between 150 °C and 260 °C and is characterized by weight loss attributed to the degradation of glycerol in the films (Medina Jaramillo et al. 2016). This inflection was not visible in the graph, possibly due to the low glycerol concentration used in the films (0.1 g/g starch). Finally, the degradation of the main film occurred between 310 °C and 350 °C and is at the steepest inflection shown in Fig XB, which is related to the starch and cellulose degradation components present in the films.

All films showed similar thermal behavior in the temperature range of 150 to 300 °C. That is, the addition of BC did not affect the thermal properties of the films. The same behavior was found in the study by Xie et al. (2020) with additions of up to 15% of BC to potato skin films, which related physical interactions between CB and the biopolymer of the film matrix. Wang et al. (2019) also reported that the cellulose (nanocrystals) addition to polylactic acid films did not change the thermal degradation profile of the films according to DTG analysis. However, Liu et al. (2020) obtained an increase in the thermal stability of the films when added with bacterial cellulose nanofibers (BCNF). Films with 1%, 2%, and 3% of NFCB had their main degradation peaks between 280 °C and 330 °C. In comparison, the film with the addition of 4% of NFCB had its highest degradation between 370 °C and 440 °C, suggesting that films with a higher concentration of NFCB showed higher thermal stability.

Biodegradability of the films

The films were submitted to biodegradability analysis, where Fig. 3 shows the appearance of the films over the 12 days of analysis. The films showed rapid biodegradability and increased biodegradation rate through visual analysis. The loss of mass of the samples ranged from 50 to 60%, with no significant difference between films with different concentrations and treatments of BC. Biodegradability in cassava starch-based films was also observed by Medina Jaramillo et al. (2016), which added yerba mate extract to the films, and your decomposition occurred almost entirely on day 12 of the study, showing fast biodegradability.

Biodegradable films obtained from starch and glycerol can present a fast biodegradation process due to increased water absorption since both have a hydrophilic character. This increased water absorption promotes the growth of microorganisms naturally present in the soil that act as a source of carbohydrates, resulting in more significant, and faster degradation of these materials (Maran et al., 2014). Seligra et al. (2016) also evaluated the degradation of starch films that showed a rapid loss of mass in the first 15 days. Still, after 30 days of analysis, the films showed significant degradation.

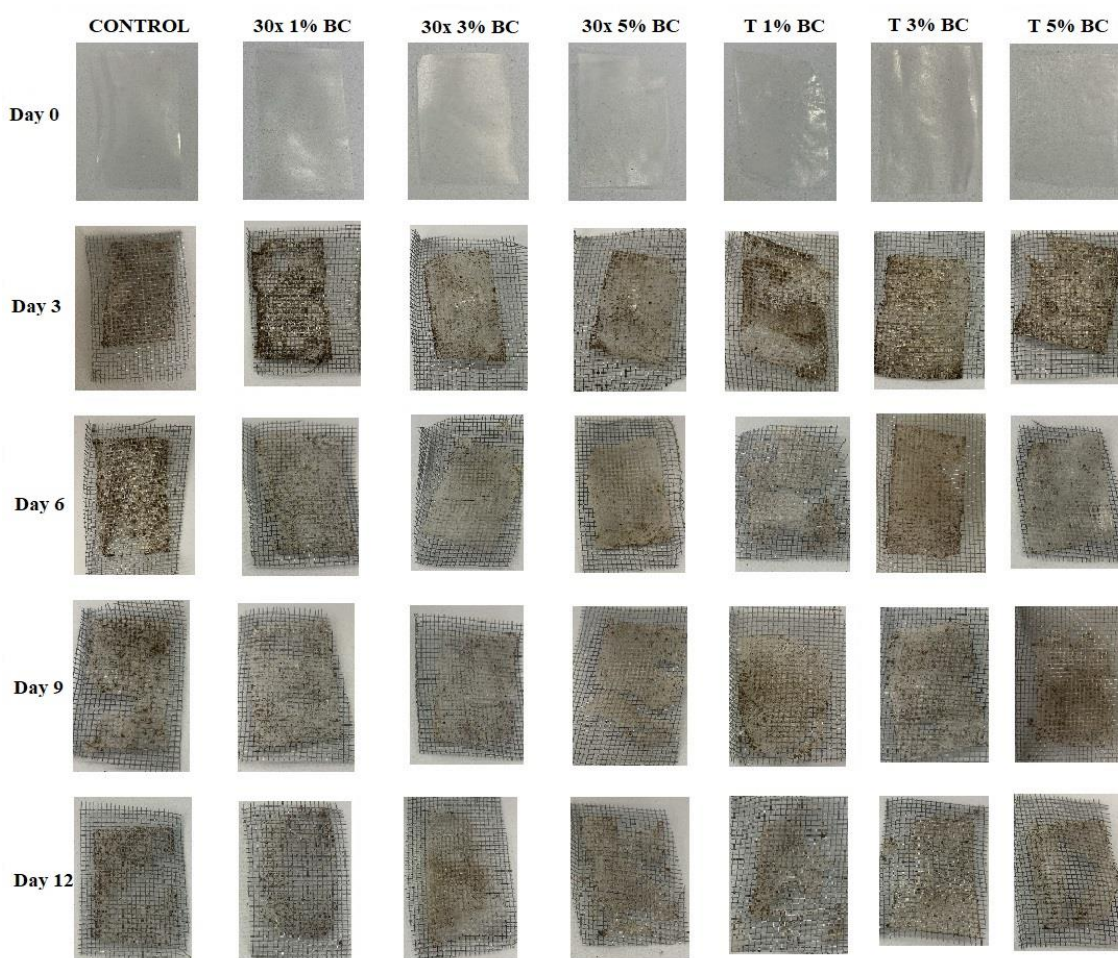


Fig. 3 – Appearance of the films over the 12 days of biodegradability analysis.

The evaluation of biodegradability of carboxymethyl cellulose (CMC) films with different concentrations of glycerol was studied by Hidayati et al. (2021); the CMC was obtained from the alga *Eucheuma cottonii*, and the degradation test of the obtained films showed decomposition in 14 days of analysis. Thus, demonstrating the biodegradability of cellulose and the importance of developing packaging to replace polymers obtained from non-biodegradable polymers, helping to reduce environmental impact.

CONCLUSIONS

Obtaining nanofibers from kombucha residue was observed in the present work from the analysis of Scanning Electron Microscopy (SEM) images, which also showed the effectiveness of the purification used. Furthermore, the characterization of the proximate composition of intact and purified SCOBY confirmed the efficiency of the purification process. The intact SCOBY had protein and carbohydrate contents and dietary fiber in its proximate composition. In contrast, the purified SCOBY had 97.33% of final dietary fiber content, a promising ingredient for use in formulations with higher fiber content. It can also be observed structure and behavior similar to those related to BC from *Gluconacetobacter Xylinus* in its morphology and thermal stability. The application of BC after mechanical treatment with a high-pressure homogenizer was evaluated on starch-based biodegradable films. Analyzes regarding the mechanical parameters, optical properties, and water solubility of the films showed an improvement with the addition of BC compared to control films (only starch). It was considered effective the treatment with HPH of bacterial cellulose from SCOBY and its application as a reinforcement material in biodegradable films as an alternative with less environmental impact. Thus, opening up possibilities for different applications of this value-added and currently growing by-product.

Acknowledgments - The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

References

- Amarasekara, A., Wang, D., & Grady, T. (2020). A comparison of kombucha SCOBY bacterial cellulose purification methods. *SN Applied Sciences*, 2. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-1982-2>
- Anglès, M. N., & Dufresne, A. (2000). Plasticized Starch/Tunicin Whiskers Nanocomposites. 1. Structural Analysis. *Macromolecules*, 33(22), 8344–8353. <https://doi.org/10.1021/ma0008701>
- Assis, R. Q., Hickmann, S., Pagno, C. H., Maria, T., & Costa, H. (2018). Synthesis of biodegradable films based on cassava starch containing free and nanoencapsulated β - carotene, (December 2017), 8–10. <https://doi.org/10.1002/pts.2364>
- Azeredo, H. M. C., Barud, H., Farinas, C. S., Vasconcellos, V. M., & Claro, A. M. (2019). Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, 7. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00007>
- Balakrishnan, P., Sreekala, M. S., Kunaver, M., Huskić, M., & Thomas, S. (2017). Morphology, transport characteristics and viscoelastic polymer chain confinement in nanocomposites based on thermoplastic potato starch and cellulose nanofibers from pineapple leaf. *Carbohydrate Polymers*, 169, 176–188. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.017>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A., & Singhal, R. S. (2009). Microbial cellulose: Fermentative production and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 47(2), 107–124.
- Chen, C., & Liu, B. Y. (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation, 834–839.
- Chen, W., Yu, H., Liu, Y., Chen, P., Zhang, M., & Hai, Y. (2011). Individualization of cellulose nanofibers from wood using high-intensity ultrasonication combined with chemical pretreatments. *Carbohydrate Polymers*, 83(4), 1804–1811. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.040>
- Chiulan, I., Frone, A. N., Panaitescu, D. M., Nicolae, C. A., & Trusca, R. (2018). Surface properties, thermal, and mechanical characteristics of poly(vinyl alcohol)–starch-bacterial cellulose composite films. *Journal of Applied Polymer Science*, 135(6), 45800. <https://doi.org/10.1002/app.45800>
- Collazo-Bigliardi, S., Ortega-Toro, R., & Chiralt, A. (2019). Improving properties of thermoplastic starch films by incorporating active extracts and cellulose fibres isolated from rice or coffee husk. *Food Packaging and Shelf Life*, 22, 100383. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100383>
- Dhingra, D., Michael, M., Rajput, H., & Patil, R. T. (2012). Dietary fibre in foods: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 49(3), 255–266. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0365-5>
- Dima, S.-O., Panaitescu, D.-M., Orban, C., Ghiurea, M., Doncea, S.-M., Fierascu, R., et al. (2017). Bacterial Nanocellulose from Side-Streams of Kombucha Beverages Production: Preparation and Physical-Chemical Properties. *Polymers*, 9(12), 374. <https://doi.org/10.3390/polym9080374>
- Fabra, M. J., Amparo, L.-R., Jesús, A.-M., & Lagaron, J. M. (2016). Improving the barrier properties of thermoplastic corn starch-based films containing bacterial cellulose nanowhiskers by means of PHA electrospun coatings of interest in food packaging. *Food Hydrocolloids*. Volume 61, December 2016, Pages 261-268, 61, 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.025>
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Goh, W. N., Rosma, A., Kaur, B., Fazilah, A., Karim, A. A., & Bhat, R. (2012). Microstructure and physical properties of microbial cellulose produced during fermentation of black tea broth (kombucha). II. *International Food Research Journal*, 19(1), 153–158.
- GONTARD, N., GUILBERT, S., & CUQ, J.-L. (1992). Edible Wheat Gluten Films: Influence of the Main Process Variables on Film Properties using Response Surface Methodology. *Journal of Food Science*, 57(1), 190–195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05453.x>
- Halib, N., Perrone, F., Cemazar, M., Dapas, B., Farra, R., Abrami, M., et al. (2017). Potential Applications of Nanocellulose-Containing Materials in the Biomedical Field. *Materials*. <https://doi.org/10.3390/ma10080977>
- Hopewell, J., Dvorak, R., & Kosior, E. (2009). Plastics recycling : challenges and opportunities, 2007, 2115–2126. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0311>
- Jayabalan, R., Malini, K., Sathishkumar, M., & Swaminathan, K. (2010). Biochemical Characteristics of Tea Fungus Produced During Kombucha Fermentation, (June 2014). <https://doi.org/10.1007/s10068-010-0119-6>
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P., & Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(22), 3358–3393. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
- Lee, K., Buldum, G., Mantalaris, A., & Bismarck, A. (2014). More Than Meets the Eye in Bacterial Cellulose : Biosynthesis , Bioprocessing , and Applications in Advanced Fiber Composites a, 10–

32. <https://doi.org/10.1002/mabi.201300298>
- Li, J., Wei, X., Wang, Q., Chen, J., Chang, G., Kong, L., et al. (2012). Homogeneous isolation of nanocellulose from sugarcane bagasse by high pressure homogenization. *Carbohydrate polymers*, *90*(4), 1609–1613. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.038>
- Maran, J. P., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., & Sridhar, R. (2014). Degradation behavior of biocomposites based on cassava starch buried under indoor soil conditions. *Carbohydrate polymers*, *101*, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.080>
- Martucci, J. F., & Ruseckaite, R. A. (2009). Tensile properties, barrier properties, and biodegradation in soil of compression—Molded gelatin-dialdehyde starch films. *Journal of Applied Polymer Science*, *112*(4), 2166–2178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/app.29695>
- Marvzadeh, M. M., Oladzadabbasabadi, N., Mohammadi Nafchi, A., & Jokar, M. (2017). Preparation and characterization of bionanocomposite film based on tapioca starch/bovine gelatin/nanorod zinc oxide. *International journal of biological macromolecules*, *99*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.067>
- Medina Jaramillo, C., Gutiérrez, T. J., Goyanes, S., Bernal, C., & Famá, L. (2016). Biodegradability and plasticizing effect of yerba mate extract on cassava starch edible films. *Carbohydrate polymers*, *151*, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.025>
- Mesomya, W., Varapat, P., Komindr, S., Leelahagul, P., Yaovadee, C., Duangchan, H., et al. (2006). Effects of health food from cereal and nata de coco on serum lipids in human. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, *28*.
- Mitrofanov, Y., Budaeva, V., & Sakovich, G. (2010). Preparation and Properties of Bacterial Cellulose Gel Films. *Chem Sustain Dev*, *18*, 503–508.
- Mondal, S. (2018). Review on Nanocellulose Polymer Nanocomposites. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, *57*(13), 1377–1391. <https://doi.org/10.1080/03602559.2017.1381253>
- Noshirvani, N., Hong, W., Ghanbarzadeh, B., Fasihi, H., & Montazami, R. (2018). Study of cellulose nanocrystal doped starch-polyvinyl alcohol bionanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, *107*, 2065–2074. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.083>
- Okiyarna, A., Motoki, M., & I, S. Y. (1993). Bacterial cellulose III . Development of a new form of cellulose. *Food Hydrocolloids*, *6*(6), 493–501. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80073-8](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80073-8)
- Pagno, C. H., Costa, T. M. H., de Menezes, E. W., Benvenuti, E. V., Hertz, P. F., Matte, C. R., et al. (2015). Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity. *Food Chemistry*, *173*, 755–762. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.068>
- Pelissari, F. M., & Menegalli, F. C. (2014). Isolation and characterization of cellulose nanofibers from banana peels Isolation and characterization of cellulose nanofibers from banana peels, (February). <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0138-6>
- Rozenberga, L., Skute, M., Belkova, L., Sable, I., Vikele, L., Semjonovs, P., et al. (2016). Characterisation of films and nanopaper obtained from cellulose synthesised by acetic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, *144*, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.025>
- Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B. E., Santos-López, E. M., Reyes-González, L. R., & Regalado, C. (2016). Characterization and antimicrobial effect of starch-based edible coating suspensions. *Food Hydrocolloids*, *52*(C), 906–913. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.09.004>
- Semjonovs, P., Ruklisha, M., Paegle, L., Saka, M., Sabovics, M., & Cleenwerck, I. (2017). Cellulose synthesis by *Komagataeibacter rhaeticus* strain P 1463 isolated from Kombucha. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1003–1012. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7761-8>
- Sharma, A., Thakur, M., Bhattacharya, M., & Mandal, T. (2019). Commercial application of cellulose nano-composites – A review. *Biotechnology Reports*, (2018), e00316. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00316>
- Sharma, C., Bhardwaj, N. K., & Pathak, P. (2020). Static intermittent fed-batch production of bacterial nanocellulose from black tea and its modification using chitosan to develop antibacterial green packaging material. *Journal of Cleaner Production*, 123608. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123608>
- Shih, Y.-T., & Zhao, Y. (2021). Development, characterization and validation of starch based biocomposite films reinforced by cellulose nanofiber as edible muffin liner. *Food Packaging and Shelf Life*, *28*, 100655. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100655>
- Surya, E., Fitriani, Ridhwan, M., Armi, Jailani, Rasool, A., et al. (2020). The utilization of peanut sprout extract as a green nitrogen source for the physicochemical and organoleptic properties of Nata de coco. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *29*, 101781. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101781>

- Tibolla, H., Maria, F., & Cecilia, F. (2014). LWT - Food Science and Technology Cellulose nano fibers produced from banana peel by chemical and enzymatic treatment. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 1311–1318. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.011>
- Torán-Pereg, P., del Noval, B., Valenzuela, S., Martínez, J., Prado, D., Perisé, R., & Arboleya, J. C. (2021). Microbiological and sensory characterization of kombucha SCOBY for culinary applications. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 23, 100314. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100314>
- Torres, F. G., Arroyo, J. J., & Troncoso, O. P. (2019). Materials Science & Engineering C Bacterial cellulose nanocomposites : An all-nano type of material. *Materials Science & Engineering C*, 98(January), 1277–1293. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.064>
- Ullah, H., Santos, H. A., & Khan, T. (2016). Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery. *Cellulose*, 23(4), 2291–2314. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-0986-y>
- Varanasi, S., Henzel, L., Sharman, S., Batchelor, W., & Garnier, G. (2018). Producing nano fibers from carrots with a chemical-free process. *Carbohydrate Polymers*, 184(November 2017), 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.056>
- Vazquez, A., Foresti, M. L., Cerrutti, P., & Galvagno, M. (2013). Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by *Gluconacetobacter xylinus*. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(2), 545–554. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0541-3>
- Villarreal-Soto, Silvia A, Bouajila, J., Beaufort, S., Bonneaud, D., Souchard, J.-P., & Taillandier, P. (2020). Physicochemical properties of bacterial cellulose obtained from different Kombucha fermentation conditions. *Journal of Vinyl and Additive Technology*, n/a(n/a). <https://doi.org/10.1002/vnl.21795>
- Villarreal-Soto, Silvia Alejandra, Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J.-P., & Taillandier, P. (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of food science*, 83(3), 580–588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
- Wang, M., Jia, X., Liu, W., & Lin, X. (2021). Water insoluble and flexible transparent film based on carboxymethyl cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 255, 117353. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117353>
- Wang, X., Ullah, N., Sun, X., Guo, Y., Chen, L., Li, Z., & Feng, X. (2017). Development and characterization of bacterial cellulose reinforced biocomposite films based on protein from buckwheat distiller's dried grains. *International journal of biological macromolecules*, 96, 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.106>
- Wang, Z., Yao, Z., Zhou, J., He, M., Jiang, Q., Li, A., et al. (2019). Improvement of polylactic acid film properties through the addition of cellulose nanocrystals isolated from waste cotton cloth. *International journal of biological macromolecules*, 129, 878–886. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.021>