



Etec Conselheiro Antonio Prado - ETECAP

**ESCOLA TÉCNICA ESTADUAL CONSELHEIRO ANTONIO PRADO
ENSINO TÉCNICO**

**NATURAIS CULTIVOS – PRODUÇÃO DE MEIO DE CULTURA NATURAL COM A
SUBSTITUIÇÃO DO ÁGAR PELO BIOPOLÍMERO CMC**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**ANTÔNIO AMSTALDEN RODRIGUES
JÉSSICA GARCIA TAVARES
MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA AMARO SANTOS**

CAMPINAS

2023



Etec Conselheiro Antonio Prado - ETECAP

ANTÔNIO AMSTALDEN RODRIGUES
JÉSSICA GARCIA TAVARES
MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA AMARO SANTOS

**NATURAIS CULTIVOS – PRODUÇÃO DE MEIO DE CULTURA NATURAL COM A
SUBSTITUIÇÃO DO ÁGAR PELO BIOPOLÍMERO CMC**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito para a aprovação no componente curricular Planejamento de Trabalho de Conclusão de Curso e requisito parcial para a obtenção do título técnico em biotecnologia.

Orientador: Prof.: Daniel Scabello Lourenco

Campinas

2023



Etec Conselheiro Antonio Prado - ETECAP

NATURAIS CULTIVOS – PRODUÇÃO DE MEIO DE CULTURA NATURAL COM A SUBSTITUIÇÃO DO ÁGAR PELO BIOPOLÍMERO CMC

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito para a aprovação no componente curricular Planejamento de Trabalho de Conclusão de Curso e requisito parcial para a obtenção do título técnico em biotecnologia.

Orientador: Prof.: Daniel Scabello Lourenco

Área de Concentração: Estudo da microbiologia

Dissertação deferida e aprovada em: 00/00/0000

Banca examinadora:



Etec Conselheiro Antonio Prado - ETECAP

“Lança o teu pão sobre as águas, porque,
depois de muitos dias, o acharás”

-Eclesiastes 11:1, Bíblia Sagrada



Etec Conselheiro Antonio Prado - ETECAP

Dedicamos com imensa alegria este trabalho a nossos familiares que nos apoiaram e incentivaram nessa caminhada de aprendizagem, a professora Josélia Cristina de Oliveira Moreira que despertou em nós a paixão pela microbiologia e as Professoras Daniela Maria Ribeiro e Daniele Velasques Carreira que nos ensinaram a amar a natureza.



Etec Conselheiro Antonio Prado - ETECAP

AGRADECIMENTOS

Agradecemos primeiramente aos nossos pais e familiares, por todo apoio que concederam a nós, nos auxiliando no dia a dia do curso e nunca cessando de nos incentivar.

Agrademos a todos nossos docentes pela paciência e dedicação para nos ensinar, em especial a prof. ^a Josélia Cristina de Oliveira Moreira que despertou em nós a paixão pela microbiologia, as prof.as Daniela Maria Ribeiro e Daniele Velasques Carreira que nos ensinaram a amar e apreciar a natureza, ao prof. ^o Jeferson de Oliveira por nos passar seu conhecimento com clareza e empenho.

Agradecemos a Deus por sua infinita bondade e misericórdia, nos concedendo forças e inspirações que possibilitou a realização desse trabalho.



Etec Conselheiro Antonio Prado - ETECAP

RESUMO

Para o presente estudo, considerou-se a importância do ensino da microbiologia na formação das pessoas e os impactos causados pelo descarte irregular dos meios de cultura utilizados durante as práticas de microbiologia, para a resolução dos dois problemas é proposto a produção de um meio de cultura natural com a substituição do ágar que, compões cerca de 65% do valor final do meio de cultura e é o componente que mais causa impacto no meio ambiente tanto com a sua extração e seu descarte. Considerou-se para essa substituição utilizar um biopolímero de celulose, CMC, com obtenção sustentável e descarte regular sem resíduos, diminuindo os custos e impactos do meio de cultura chegando o mais próximo possível do meio de cultura industrial PCA.

Palavras-chaves: Microbiologia. Meio de cultura. Sustentável. Natural



Etec Conselheiro Antonio Prado - ETECAP

ABSTRACTI

For this study, we considered the importance of teaching microbiology in the formation of people and the impacts caused by the irregular disposal of culture media used during the practices of microbiology, to solve the two problems we propose the production of a natural culture medium with the replacement of agar that makes up about 65% of the final value of the culture medium and is the component that most causes impact on the environment both with its extraction and its disposal. It was considered for this replacement to use a cellulose biopolymer, CMC, with sustainable obtaining and regular disposal without waste, reducing the costs and impacts of the culture medium reaching as close as possible to the PCA industrial culture medium.

Keywords: Microbiology. Culture medium. Sustainable. Natural.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	X
1.1 Ensino da microbiologia	X
1.2 Meio de Cultura	X
1.3 Ágar PCA	XI
1.4 Componente Ágar	XII
1.5 Biopolímero CMC	XIII
2. OBJETIVOS	XIII
2.1 Objetivo Geral	XIII
2.2 Objetivo Específico	XIII
3. CRONOGRAMA	XIV
4. METODOLOGIA	XV
4.1 Materiais	XV
4.2 Preparo do Meio de Cultura	XV
4.3 Testes Comparativos	XV
4.5 Teste Microbiológicos	XVI
5. RESULTADOS	XVI
5.1 Preparo	XVI
5.2 Comparativo	XVII
5.3 Testes microbiológicos	XVIII
6. CONCLUSÃO	XIX
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:	XX

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ensino da microbiologia

A microbiologia é uma disciplina fascinante que estuda os microrganismos, seres vivos invisíveis a olho nu, como bactérias, vírus, fungos e protozoários. O ensino da microbiologia desempenha um papel fundamental na educação das pessoas, oferecendo uma compreensão essencial dos microrganismos e seu impacto em diversos aspectos da vida. Ao conhecer os micróbios, suas características e seu comportamento, os estudantes podem adquirir habilidades de pensamento crítico, tomar decisões informadas e desenvolver uma consciência mais ampla sobre questões de saúde, ambiente e biotecnologia, podendo auxiliar até mesmo em questões de saúde pública como campanhas de vacinação e combate contra infecções. (PRESCOTT et al., 2015)

1.2 Meio de Cultura

O meio de cultura é um ambiente artificialmente preparado que fornece os nutrientes necessários para o crescimento e multiplicação de microrganismos em laboratório. Ele é composto por uma combinação de ingredientes como nutrientes, fontes de energia, sais minerais e fatores de crescimento, que permitem a sobrevivência e a reprodução dos micróbios. (PRESCOTT et al., 2017)

Existem diferentes tipos de meios de cultura, sendo os mais comuns o meio sólido, o meio líquido e o meio semi-sólido. O meio sólido é preparado adicionando-se um agente solidificante, geralmente a ágar-ágar, ao meio líquido. Isso permite o crescimento de microrganismos em colônias distintas, facilitando sua identificação e isolamento. Já o meio líquido não contém o agente solidificante, permitindo o crescimento dos microrganismos de forma dispersa. O meio semi-sólido possui uma consistência intermediária entre o sólido e o líquido. (ATLAS., 2010)

Os meios de cultura podem ser classificados de acordo com sua composição e função. Por exemplo, existem meios de cultura gerais, que são utilizados para o crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, e meios seletivos, que

contêm componentes que inibem o crescimento de certos microrganismos, permitindo o crescimento seletivo de outros. Além disso, há meios diferenciais, que contêm indicadores químicos ou corantes que ajudam a distinguir diferentes tipos de microrganismos com base em características específicas, como a produção de determinadas enzimas ou a fermentação de certos açúcares. (CAPPUCINO et al., 2019)

A escolha do meio de cultura adequado depende do tipo de microrganismo a ser cultivado e dos objetivos do estudo. O pH, a temperatura e outros parâmetros de cultivo também devem ser controlados para garantir o sucesso do crescimento dos microrganismos. (TORTORA et al., 2017)

1.3 Ágar PCA

O meio de cultura PCA (Plate Count Agar) é um meio sólido amplamente utilizado na microbiologia para a contagem de microrganismos viáveis presentes em diferentes tipos de amostras. O PCA é composto por nutrientes como peptona, extrato de carne, ágar e outros componentes que fornecem os elementos essenciais para o crescimento e desenvolvimento de uma ampla variedade de microrganismos. (APHA., 2017)

No meio de cultura PCA, uma variedade de bactérias pode ser cultivada. As bactérias mais comumente utilizadas são organismos aeróbios ou facultativos, que podem crescer na presença de oxigênio atmosférico. Exemplos de bactérias comumente cultivadas em PCA incluem *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras. (BERGEY'S MANUAL., 2005)

A contagem de microrganismos no meio de cultura PCA fornece informações importantes sobre a quantidade de micróbios viáveis presentes em uma amostra. Essas informações são essenciais para avaliar a qualidade e segurança de alimentos, água, produtos farmacêuticos e outras amostras biológicas. A contagem de microrganismos também é útil para monitorar o crescimento bacteriano em culturas puras ou em estudos de viabilidade. (TORTORA et al., 2017)

O meio de cultura PCA é altamente versátil e amplamente utilizado em laboratórios de microbiologia devido à sua eficácia e simplicidade de preparo. Ele fornece um ambiente nutritivo e adequado para o crescimento de uma ampla gama de bactérias, permitindo a contagem e o estudo desses microrganismos em condições controladas. (CAPPUCCINO et al., 2019)

1.4 Componente Ágar

O ágar é um polissacarídeo derivado de algas marinhas vermelhas e é amplamente utilizado na microbiologia como meio de cultura sólido. Ele desempenha um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento de microrganismos em laboratórios e indústrias. No entanto, o uso e descarte adequados do ágar podem ter impactos significativos no meio ambiente. (GARCÍA et al., 2017)

A extração do ágar das algas marinhas requer um processo de colheita e processamento que pode ter impactos ambientais. A coleta excessiva de algas pode levar à diminuição das populações de algas e impactar negativamente os ecossistemas marinhos. Portanto, é importante que a extração do ágar seja feita de maneira sustentável, levando em consideração a conservação e o manejo adequado dos recursos naturais. (GARCÍA et al., 2017)

Além disso, o descarte do ágar após o uso em laboratórios e indústrias também requer atenção especial. O ágar utilizado nos meios de cultura pode conter microrganismos patogênicos ou organismos geneticamente modificados, o que pode representar riscos para o meio ambiente se não for tratado adequadamente. O descarte incorreto do ágar contaminado pode levar à contaminação de corpos d'água ou solos, afetando negativamente a biodiversidade e a saúde dos ecossistemas. (GARCÍA et al., 2017)

Para minimizar os impactos ambientais relacionados ao ágar, é importante adotar práticas sustentáveis na produção, utilizar métodos de extração que reduzam o impacto sobre as algas e implementar políticas de descarte adequado, como a esterilização e a destruição adequada do ágar usado, seguindo as regulamentações ambientais locais. (GARCÍA et al., 2017)

1.5 Biopolímero CMC

O biopolímero CMC (carboximetilcelulose) é um polímero derivado da celulose, amplamente utilizado em diversas aplicações industriais e comerciais. Ele é obtido por meio da modificação química da celulose, na qual grupos carboximetil são adicionados à sua estrutura molecular. O CMC é conhecido por suas propriedades de espessamento, estabilização e retenção de água, o que o torna um aditivo versátil em muitos produtos. Ele é amplamente utilizado em indústrias alimentícias, farmacêuticas, cosméticas, de papel e celulose, entre outras. Sua aplicação mais comum é como estabilizante e espessante em alimentos e bebidas, como sorvetes, molhos, produtos lácteos e produtos de panificação. Além disso, o CMC também é utilizado em formulações farmacêuticas, cremes e loções cosméticas, adesivos, tintas e revestimentos, devido às suas propriedades de viscosidade e retenção de água. O CMC é considerado um biopolímero de baixo impacto ambiental, pois é obtido a partir de fontes renováveis, como a celulose de plantas. Sua biodegradabilidade e baixa toxicidade também são vantagens em relação a outros polímeros sintéticos. No entanto, é importante considerar o descarte adequado do CMC e seus produtos, a fim de minimizar qualquer impacto potencial ao meio ambiente. (KUMAR et al., 2011)

2. OBJETIVOS.

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo a produção de um meio de cultura natural a partir da substituição do ágar pelo biopolímero CMC.

2.2 Objetivo Específico

- Reduzir os impactos do descarte irregular no meio ambiente;
- Diminuir o custo elevado do meio de cultura;
- Torna-los acessível para as redes de ensino público;

- Produzi-los o mais fielmente possível ao meio PCA;
- Gerar um bom rendimento de crescimento microbiano.

3. CRONOGRAMA.

O cronograma de desenvolvimento teórico-prática desse trabalho está de acordo com a tabela de planejamento a seguir.

Durante os primeiros meses foram realizadas as fases de pesquisa e desenvolvimento teórico.

Após o período de recesso em agosto se iniciação a realização prática inicialmente com o preparo do meio, após o desenvolvimento do meio de cultura se iniciarão as fases de testes microbiológicos onde será comparado com o meio de cultura industrial PCA referente ao desempenho de crescimento, textura, odor e descarte.

CRONOGRAMA 2023	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV
Pesquisa	X	X								
Planejamento			X	X						
Realização teórica					X					
Recesso						X				
Realização Prática							X	X		
Testes									X	
Finalização									X	
Banca Final										X

4. METODOLOGIA.

4.1 Materiais

Os reagentes e equipamentos necessários para a realização desse trabalho estão de acordo com a tabela a seguir.

Reagentes	Equipamentos
1% de íons de Magnésio	Autoclave
Água estéril	Béquer 1 L
CMC	Balança analítica
Extrato de Levedura	Bico de Bunsen
Glicose em pó	Erlenmeyer 250 mL
Meio ágar PCA	Estufa de crescimento microbiológico
Triptona	Agulha de platina
Água oxigenada	Frasco para armazenamento
	Placa de petri
	Tubo de ensaio

4.2 Preparo do Meio de Cultura

Para o preparo do meio de cultura sustentável foi desenvolvida uma metodologia própria, onde os componentes do meio são adicionados e misturados em proporções corretas formaram o pó para preparo dele, levando em consideração as concentrações originais do ágar PCA com adequação das concentrações do CMC para substituição do ágar.

- 5 g/L de Triptona;
- 1 g/L de Glicose;
- 2,5 g/L de Extrato de levedura;
- 60 g/L de CMC ----- 1% de ions de Magnésio.

4.3 Testes Comparativos

Para obter-se um parâmetro de funcionalidade utiliza-se o método de comparação entre os meios:

Preparar o meio PCA industrial de acordo com as informações do rótulo do fabricante e seguindo essas mesmas orientações utilizar o pó do meio de cultura natural para o preparo dele simultaneamente ao PCA.

Comparar os preparos e rapidez, suas propriedades físicas, consistência e resistência a temperatura a fim de obter-se meios mais semelhantes possíveis.

4.5 Teste Microbiológicos

A fim de analisar o desempenho de crescimento microbiológico do meio produzido realizar os seguintes testes:

- Análise de crescimento: Inocular a bactéria específica *Escherichia coli*, em meio PCA industrial e em meio CMC. Armazenar na estufa a 35° C por 24h, passado o período comparar o crescimento microbiano obtido;
- Motilidade: Inocular bactérias que se conhece a natureza de sua motilidade com o auxílio de uma agulha de transferência, armazenar na estufa a 35° C por 24h e comparar com meio SIM específico para leitura de motilidade;
- Idol: Inocular a bactéria *Escherichia coli* e após 24h adicional água oxigenada a fim de saber se produz/detecta Idol ou não.

5. RESULTADOS

5.1 Preparo

Após a pesagem e homogeneização do reagente foi possível notar que o meio absorve água devido a um de seus componentes, o extrato de levedura, não fica homogêneo no meio, mas sim repellido dos demais componentes. Foi notado que ele é inodoro diferentemente dos demais meios utilizados na área da microbiologia.



Figura 1, meio CMC após homogeneização dos componentes, arquivo pessoal

5.2 Comparativo

Durante o preparo do meio PCA juntamente com o meio CMC pode-se notar uma diferença significativa entre eles, o Meio CMC possui um melhor desempenho em seu preparo ficando pronto mais rapidamente e não apresenta odor desagradável ao ser manuseado. Ao ser autoclavado ele adquire a consistência de um meio semissólido não sendo adequado para a utilização em placa, mas sim em tubos para teste de motilidade e Idol.



Figura 2, meio CMC ao lado do meio PCA após seu preparo, arquivo pessoal



Figura 3, meio CMC após ser autoclavado e inoculado uma bactéria, arquivo pessoal

Seu estado semissólido se dá por conta do extrato de levedura reduzir o CMC, que é formado por celulose, para glicose. Em decorrência dessa quebra o CMC não consegue manter suas ligações e assim perde sua propriedade de gelatinizarão. Isso foi comprovado a partir da reação de Benedict onde o meio preparado com o extrato de levedura apresentou uma maior concentração de Glicose e o meio preparado sem o extrato (considerando que nele se adiciona glicose) apresentou uma menor quantidade de glicose.

Na reação é possível notar que o primeiro tubo que contém somente o pó para o preparo do meio apresentou meia redução de glicose por conta de ela já ser adicionada ao pó enquanto o segundo tubo apresenta uma redução total do meio já preparado e autoclavado, o terceiro tubo uma mínima redução da glicose por ser o meio preparado sem o extrato de levedura mas com a adição da glicose.



Figura 4, Reação de Benedict, arquivo pessoal

5.3 Testes microbiológicos

Para os testes microbiológicos foram utilizados diversos microrganismos de motilidade conhecida como o *Cloacae aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*, assim como os de foco principal do trabalho (*Escherichia coli* e *Salmonella*).

O crescimento das bactérias de foco principal foi obtido com êxito, o meio apresentou bom desempenho para o crescimento e desenvolvimento dessas bactérias dando a possibilidade de ser usada como um meio de enriquecimento e manutenção.

Para a motilidade apresentou um desempenho maior ainda sendo visível facilmente a motilidade ou não da bactéria, apresentando assim um desempenho e visibilidade da motilidade até mesmo melhor que o meio SIM específico para motilidade.

A motilidade do meio CMC demonstrou maior eficácia ainda quando utilizada com a bactéria *Escherichia coli* que no meio convencional não apresenta bons resultados, podendo esse meio natural ser até mesmo utilizado para testar a produção de Idol da bactéria.



Figura 6, motilidade da cloacae no meio CMC e SIM, arquivos pessoais

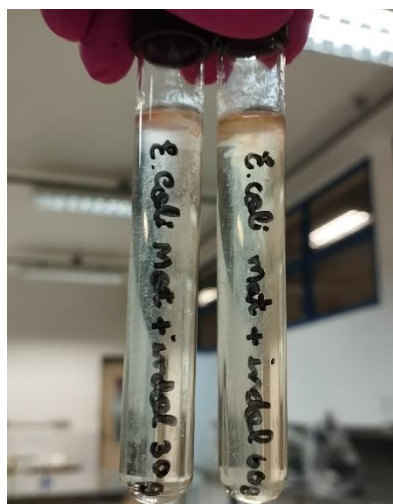


Figura 5, teste de motilidade e idol da e.coli, arquivos pessoal

6. CONCLUSÃO

Se concluiu que o meio CMC possui várias vantagens em relação aos meios convencionais, dentre elas estão: ele ser sustentável e natural, não agredir o meio ambiente caso for descartado de forma irregular, ser inodoro e apresentar um ótimo desempenho para crescimento bacteriano, visualização de motilidade e teste de idol.

Podendo assim ser classificado como um meio semi-sólido de boa qualidade, ótimo rendimento e desempenho.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. 23RD ED. WASHINGTON, D.C.: APHA, 2017.

ATLAS, R. M. HANDBOOK OF MICROBIOLOGICAL MEDIA. 3RD ED. BOCA RATON, FL: CRC PRESS, 2010.

BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. 2ª ED. NOVA YORK: SPRINGER, 2005.

CAPPUCCINO, J. G.; SHERMAN, N. MICROBIOLOGIA: A LABORATORY MANUAL. 11ª ED. SÃO PAULO: PEARSON, 2019.

CAPPUCCINO, JAMES G.; SHERMAN, NATALIE. MICROBIOLOGIA: UM ENFOQUE EM MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS. 10ª ED. PORTO ALEGRE: ARTMED, 2017.

GARCÍA-VAQUERO, M.; HAYES, M. RED SEAWEEDS AS A SOURCE OF NUTRITIONAL COMPOUNDS. FOODS, V. 6, N. 4, P. 33, 2017.

KUMAR, S.; GUPTA, S. CARBOXYMETHYL CELLULOSE: PROPERTIES AND APPLICATIONS. IN: PANDEY, J. K. ET AL. (EDS.). BIOPOLYMERS: APPLICATIONS AND TRENDS. BERLIN, GERMANY: SPRINGER-VERLAG, P. 183-203. 2011.

PRESCOTT, L. M., HARLEY, J. P., & KLEIN, D. A. MICROBIOLOGY. MCGRAW-HILL EDUCATION. 2017.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. MICROBIOLOGIA. SÃO PAULO: MCGRAW-HILL EDUCATION, 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. MICROBIOLOGIA: UMA INTRODUÇÃO. 12ª ED. SÃO PAULO: PEARSON, 2017.

TORTORA, GERARD J.; FUNKE, BERDELL R.; CASE, CHRISTINE L. MICROBIOLOGIA: UMA INTRODUÇÃO. 12ª ED. SÃO PAULO: ARTMED, 2017.