



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIENCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

BIOTECNOLOGIA

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
NANOCELULOSE EM FRUTAS TROPICAIS EM DECOMPOSIÇÃO NO
OESTE DO PARANÁ, BRASIL**

ÁGATHA VICTÓRIA MENDES DE VASA

Foz do Iguaçu
2023

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE NANOCELULOSE EM FRUTAS
TROPICAIS EM DECOMPOSIÇÃO NO OESTE DO PARANÁ, BRASIL**

ÁGATHA VICTÓRIA MENDES DEVASA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Caroline da Costa Silva Gonçalves

Foz do Iguaçu
2023

ÁGATHA VICTÓRIA MENDES DEVASA

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE NANOCELULOSE
EM FRUTAS TROPICAIS EM DECOMPOSIÇÃO NO OESTE DO PARANÁ,
BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. (Titulação) (Nome do orientador)
UNILA

Prof. (Titulação) (Nome do Professor)
(Sigla da Instituição)

Prof. (Titulação) (Nome do Professor)
(Sigla da Instituição)

Foz do Iguaçu, ____ de _____ de ____.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Ágatha Victória Mendes Devasa

Curso: Biotecnologia

	Tipo de Documento
(.....) graduação	(.....) artigo
(.....) especialização	(X) trabalho de conclusão de curso
(.....) mestrado	(.....) monografia
(.....) doutorado	(.....) dissertação
	(.....) tese
	(.....) CD/DVD – obras audiovisuais
	(.....) _____

Título do trabalho acadêmico: Bioprospecção de bactérias produtoras de nanocelulose em frutas tropicais em decomposição no Oeste do Paraná, Brasil.

Nome do orientador(a): Caroline da Costa Silva Gonçalves

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons* **Licença 3.0 Unported**.

Foz do Iguaçu, ____ de _____ de _____.

Assinatura do Responsável

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as forças do universo que me conduziram até o presente momento, sempre me surpreendendo com novos aprendizados, me proporcionando experiências de vida incríveis, da qual tenho muito prazer de carregar e levar como bagagem.

Agradeço aos meus pais pela confiança que tiveram em mim e por todo investimento ao longo da minha educação. Quanto a minha mãe, agradeço pelo colo, pelas palavras de apoio, pela força que, como uma mulher independente e resiliente, me ensinou a lutar de cabeça erguida e não desistir dos meus objetivos. Agradeço por todo o amor, por nunca ter me deixado faltar nada e pelo orgulho que expressa por mim. Ao meu pai, sou grata pelas palavras de apoio, pelas orientações, conversas que me trouxeram maturidade e diferentes perspectivas. Sou grata também pelo acolhimento e por se fazer presente, foi essencial pra construir o que sou hoje.

Faltam-me palavras para expressar a gratidão a Universidade Federal da Integração Latino Americana, onde amadureci, deixei minhas melhores risadas (até agora), aflorei minha responsabilidade, disciplina e aprendi muito mais do que ensinado em sala de aula. Vivi anos maravilhosos ao lado de pessoas maravilhosas, da qual jamais esquecerei. Aos professores que sempre nos apoiaram, acreditaram na nossa capacidade de desenvolver projetos que iram impactar gerações futuras e nos defenderam em momentos de injustiça ou que precisávamos de voz. A biotecnologia agradeço por ter me ensinado a persistência de quando acreditamos em algo e nos movemos juntos, sempre alcançamos.

Agradeço a todos meus colegas de curso, todos foram especiais e carrego em meu coração memória com histórias polemicas ou épicas de cada um, a final, o que mais gostamos em biotecnologia é de fofoca nos banquinhos do lab no dia seguinte, sentirei falta. Aos meus queridos amigos Nédice, Andrés e Gustavo, vocês foram muito mais que meus parceiros de seminário, vocês foram minha família. Obrigada por tanto. Pelos momentos apocalípticos, pelas risadas até doer a barriga, por escolherem estar comigo e me apoiar desde o primeiro dia de aula, por todos os cafés da tarde e fofocas que sentirei falta, por me fazer pertencer. Vocês confiaram em me apresentar o melhor e o pior lado, o que me fez amar vocês ainda mais. Obrigada pela confiança, segredos e por me acompanharem nessa jornada.

E claro, agradeço a orientação da professora Caroline, quem acolheu minhas ideias e proporcionou esse projeto, qual tenho muito orgulho e apreço. Agradeço pela confiança, por caçar frutas na cidade por mim e pela autonomia que me deu no laboratório, me proporcionou grandes aprendizados e perspectivas.

“Qual é a maior lição que uma mulher pode aprender? Que desde o primeiro dia, ela sempre teve tudo o que precisa dentro de si mesma.”

(Rupi Kaur)

RESUMO

O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de celulose de *Eucalyptus* spp. e *Pinus* spp., com aproximadamente 20 milhões de toneladas por ano. A produção convencional de celulose gera grandes quantidades de resíduos poluentes e consome volumes significativos de água, causando impactos ambientais negativos. Portanto, há a necessidade de encontrar métodos mais sustentáveis para a produção desse material. Essa matéria prima é amplamente utilizada na produção de papel e tem uso nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. A celulose bacteriana é uma alternativa à celulose vegetal, pois é 100% pura e não contém lignina e hemicelulose. A pesquisa envolveu a coleta de amostras de frutas tropicais em estado de decomposição na cidade de Foz do Iguaçu - Pr, seguida do isolamento dos micro-organismos presentes nessas frutas. Dentre os meios inoculados, apenas pitaya e laranja Bahia tiveram uma produção significativa de nanocelulose bacteriana no intervalo de 7 a 14 dias de cultivo. A nanocelulose bacteriana isolada da pitaya demonstrou alta organização com estrutura de dimensões nanométricas. Já a celulose produzida pelo isolado de laranja Bahia, apesar de também ter estruturas nanométricas foram avaliadas como partículas maiores, desordenadas, suspensas e com espessura nanométrica. Ambas as estruturas oferecem grande promessa, proporcionando uma composição pura em um curto espaço de tempo e com estruturas nanométricas. Contudo, é importante ressaltar que esses isolados não produziram biofilme de nanocelulose, resultando em uma suspensão de celulose que sedimenta no fundo com o mínimo de agitação na vidraria.

Palavras-chave: celulose bacteriana, microorganismos, bioprospecção, frutas tropicais, membrana celulósica.

RESUMEN

Brasil es el segundo productor y exportador mundial de celulosa de *Eucalyptus* spp. y *Pinus* spp., con aproximadamente 20 millones de toneladas al año. La producción de celulosa convencional genera grandes cantidades de residuos contaminantes y consume importantes volúmenes de agua, provocando impactos ambientales negativos. Por tanto, es necesario encontrar métodos más sostenibles para producir este material. Esta materia prima es muy utilizada en la producción de papel y se utiliza en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética. La celulosa bacteriana es una alternativa a la celulosa vegetal ya que es 100% pura y no contiene lignina ni hemicelulosa. La investigación implicó la recolección de muestras de frutas tropicales en descomposición en la ciudad de Foz do Iguaçu - PR, seguida del aislamiento de microorganismos presentes en esas frutas. Entre los medios inoculados, sólo la pitaya y la naranja de Bahía tuvieron una producción significativa de nanocelulosa bacteriana dentro de los 7 a 14 días posteriores al cultivo. La nanocelulosa bacteriana aislada de pitaya demostró una alta organización con una estructura de tamaño nanométrico. La celulosa producida por el aislado de naranja de Bahía, a pesar de tener también estructuras nanométricas, fue evaluada como partículas suspendidas, desordenadas y de mayor tamaño, con espesor nanométrico. Ambas estructuras son muy prometedoras, ya que proporcionan una composición pura en poco tiempo y con estructuras nanométricas. Sin embargo, es importante resaltar que estos aislados no produjeron una biopelícula de nanocelulosa, lo que resultó en una suspensión de celulosa que se deposita en el fondo con una mínima agitación en la cristalería.

Palabras clave: celulosa bacteriana, microorganismos, bioprospección, frutas tropicales, membrana celulósica.

ABSTRACT

Brazil is the world's second largest producer and exporter of *Eucalyptus* spp cellulose. and *Pinus* spp., with approximately 20 million tons per year. Conventional cellulose production generates large amounts of polluting waste and consumes significant volumes of water, causing negative environmental impacts. Therefore, there is a need to find more sustainable methods for producing this material. This raw material is widely used in paper production and is used in the food, pharmaceutical and cosmetic industries. Bacterial cellulose is an alternative to vegetable cellulose as it is 100% pure and does not contain lignin and hemicellulose. The research involved collecting samples of decomposing tropical fruits in the city of Foz do Iguaçu - PR, followed by the isolation of microorganisms present in these fruits. Among the inoculated media, only pitaya and Bahia orange had a significant production of bacterial nanocellulose within 7 to 14 days of cultivation. Bacterial nanocellulose isolated from pitaya demonstrated high organization with a nanometer-sized structure. The cellulose produced by the Bahia orange isolate, despite also having nanometric structures, was evaluated as larger, disordered, suspended particles with nanometric thickness. Both structures offer great promise, providing a pure composition in a short time and with nanosized structures. However, it is important to highlight that these isolates did not produce a nanocellulose biofilm, resulting in a cellulose suspension that settles to the bottom with minimal agitation in the glassware.

Key words: bacterial cellulose, microorganisms, bioprospecting, tropical fruits, cellulosic membrane.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura da celulose; β -D-glicopiranosose unida por ligação glicosídica.....	5
Figura 2 – Arranjo das microfibrilas de celulose na parede celular vegetal do Eucalipto.....	7
Figura 3 – Estrutura de micrografia de celulose vegetal (A) e celulose bacteriana (B).....	10
Figura 4 – Rota simplificada de biossíntese da celulose bacteriana.....	11
Figura 5 – Estrutura da fibra de celulose.....	12
Figura 6 – Placas de Petri contendo colônias bacterianas isoladas a partir de suco de (A) Pitaya, (B) Laranja Bahia e (C) Jabuticaba.....	19
Figura 7 – Estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas	20
Figura 8 - Estrutura da parede celular de bactérias Gram negativas	21
Figura 9 - Resultado da coloração de gram dos isolados. Resultado da (A) Pitaya (gram positiva), (B) Laranja Bahia (gram negativa) e (C) Jabuticaba (gram positiva)	22
Figura 10 – Resultado do catalase dos isolados. (A) Pitaya (positiva), (B) Laranja Bahia (positiva) e (C) Jabuticaba (positiva)	23
Figura 11 – Resultado teste de rugai e lugol de (A) Pitaya, (B) Laranja Bahia e (C) Jabuticaba	25
Figura 12 - Análise de Semelhança entre Isolado de Laranja Bahia e Enterobactérias: Resultados do Software	26
Figura 13 – Avaliação da nanocelulose produzida pelo isolado de pitaya no MEV	27
Figura 14 – Avaliação da nanocelulose produzida pelo isolado de Laranja Bahia no MEV	28
Figura 15 - Difração de Raios X das amostras de nanocelulose bacteriana.....	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 GERAIS:	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	14
3 REVISÃO DA LITERATURA:	15
3.1 CELULOSE:.....	15
3.2 EXTRAÇÃO DA CELULOSE A PARTIR DA BIOMASSA VEGETAL:.....	16
3.3 A NANOCELULOSE BACTERIANA:.....	18
4 METODOLOGIA:.....	23
4.1 COLETA DE FRUTAS:	23
4.2 PREPARO DO EXTRATO DE FRUTAS:.....	23
3.3 MEIO DE CULTIVO:	24
3.4 ISOLAMENTO BACTERIANO:	24
3.5 CULTIVO E PRESERVAÇÃO:	24
3.6 COLORAÇÃO DE GRAM:.....	25
3.7. MEIO DE RUGAI COM LISINA:	25
3.8. ENSAIO DE CATALASE:	25
3.9. PURIFICAÇÃO DA NANOCELULOSE:	26
3.10. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV):.....	26
3.11 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX):.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO:.....	27
4.1. ISOLAMENTO DAS CEPAS BACTERIANAS DO SUCO DE FRUTA:	27
4.2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS:	29
4.2.1. Coloração de gram:	30
4.2.2. Teste catalase:	32
4.2.3. Teste rugai com lisina:.....	34
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA NANOCELULOSE:.....	37
4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV):.....	37
4.3.2 Difração de Raio-X (DRX):	39

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS:..... 40

7 REFERÊNCIAS: 41

1 INTRODUÇÃO

A celulose é o polímero mais abundante na natureza, a estimativa de sua larga produção é de aproximadamente 1,5 trilhões de toneladas por ano, mostrando sua importância na economia mundial (Moyinoluwa *et al.*, 2022). O Brasil é um dos grandes pilares dessa indústria, de acordo com dados da Associação Brasileira de Celulose e Papel (Bracelpa), desde 2016, é segundo o maior produtor e exportador mundial de celulose de *Eucalyptus* spp. e *Pinus* spp., com uma produção de cerca de 20 milhões de toneladas por ano (Iba, 2023).

Na exploração do Eucalipto, a obtenção de celulose envolve processos de polpa mecânica, térmica, química ou metais residuais. Esses processos liberam as fibras da madeira, com destaque para a polpação química que dissolve a lignina, permitindo a liberação das fibras. No entanto, esses processos tradicionais são conhecidos pelo seu alto consumo de água e pela geração de resíduos poluentes. Apenas cerca de 45% de celulose é obtida após essas etapas (Melchior *et al.*, 2018).

À medida que cresce a busca por alternativas sustentáveis, a investigação de novas fontes de celulose torna-se uma prioridade, proporcionando redução do impacto ambiental e fornecendo matérias-primas mais puras.

Estudos para alternativas sustentáveis, com diminuição de tempo e de custos, são, atualmente, grande foco para produções em larga escala. A bioprospecção de novas fontes produtoras de celulose é uma das principais áreas de novas pesquisas para desenvolvimento da matéria prima, diminuindo a geração de resíduos poluentes e fornecendo matéria prima com maior grau de pureza (Donini *et al.*, 2010; Melchior *et al.*, 2018).

A utilização da celulose bacteriana apresenta um potencial promissor em uma ampla gama de campos, incluindo medicina, meio ambiente, alimentos e cosméticos. Destaca-se especialmente em setores que exigem elevados padrões de pureza na matéria-prima, como é o caso de sua utilização como emulsificante, agente dispersante e agente gelificante nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas (Donini *et al.*, 2010).

A nanocelulose bacteriana (NCB) é produzida por bactérias do vinagre, esses microrganismos são promissores frente a inovação e produção de celulose convencional pois são capazes de produzir membranas com alto grau de pureza, em pouco tempo comparado ao tempo de crescimento do *Eucalyptus* spp., sem gerar resíduos poluentes pois não necessitam passar por processos químicos de extração e purificação pelo seu elevado nível de pureza, e podem ser encontradas e cultivadas com resíduos, como por exemplo, frutas (Oliveira *et al.*, 2022).

Nesse contexto, a nanocelulose bacteriana é um material promissor para a indústria de materiais, alinhado com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) das Nações Unidas, especificamente como metas 9.5, 9.b e 12.5. A meta 9.5 foca no fortalecimento da pesquisa científica e tecnológica, onde a pesquisa em NCB contribui para a inovação e o desenvolvimento de capacidades nos setores industriais, especialmente em países em desenvolvimento. A meta 9.b destaca o apoio à pesquisa e inovação, onde a pesquisa sobre nanocelulose pode diversificar indústrias e agregar valor às commodities, beneficiando países em desenvolvimento, como o Brasil. Por fim, a meta 12.5 promove a redução de resíduos, e as características e biodegradabilidade da NCB a tornam uma alternativa promissora para a redução de resíduos em várias indústrias.

Assim, considerando o descrito acima, este estudo tem como objetivo realizar a bioprospecção de bactérias produtoras de celulose a partir de frutas tropicais em decomposição coletadas na cidade de Foz do Iguaçu no Oeste do Paraná.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS:

Realizar bioprospecção de bactérias produtoras de nanocelulose a partir de frutas tropicais em decomposição.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Realizar a bioprospecção de bactérias produtoras de nanocelulose a partir de sucos de laranja (*Citrus sinensis*), pitaya branca (*Hylocereus undatus*) e jaboticaba (*Plinia cauliflora*);
- Isolar essas bactérias com potencial de produzir nanocelulose;
- Avaliar o potencial enzimático dessas cepas microbianas;
- Purificar e caracterizar a nanocelulose produzida por meio dessas culturas.

3 REVISÃO DA LITERATURA:

3.1 CELULOSE:

Industrialmente, na exploração de Eucalipto, a celulose é exportada e manipulada, principalmente para produção de papel. Além disso, este polímero é utilizado como emulsificador, agente dispersante e agente gelificante nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (Donini *et al.*, 2010).

A celulose pode ser encontrada com grande biodisponibilidade na parede celular de plantas, de onde são geralmente extraídas pelas indústrias do setor, mas essa produção tradicional carrega, além da morosidade, uma grande geração de resíduos e o desmatamento. Além disso, a celulose pode ser sintetizada, através da fermentação, por bactérias, denominada celulose bacteriana (CB) (Vasconcelos, 2020).

A celulose é um biopolímero linear constituído por unidades de β -D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) (Figura 1), cujas cadeias paralelas são unidas de forma intra e intermolecular por ligações de hidrogênio, formando microfibrilas de aproximadamente 4 nm de largura. (Tureck, 2027; Lima, *et al.*, 2015).

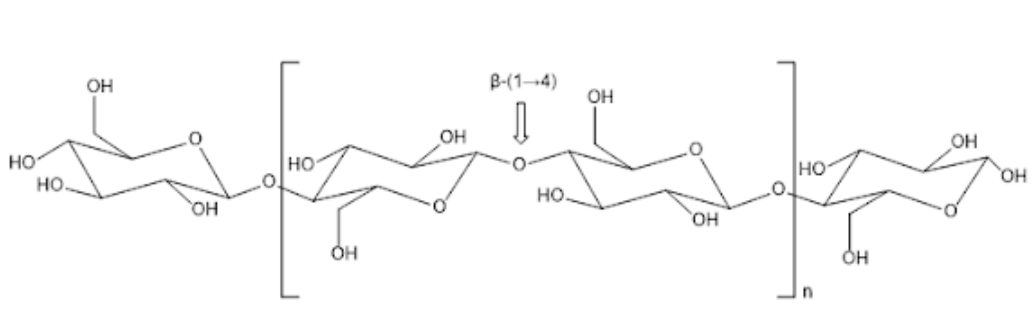


Figura 1: Estrutura da celulose; β -D-glicopirranose unida por ligação glicosídica.

Fonte: Autora, 2023.

A celulose pode ser dividida em dois grupos distintos: pura ou complexa. Dentre as puras, destaca-se a nanocelulose bacteriana, a qual não possui, lignina e hemicelulose na sua composição, sendo assim, 100% celulose, e, portanto, promissora como matéria prima para diversas indústrias. A CB apresenta a mesma fórmula química da celulose vegetal (CV), mas suas fibras possuem dimensões nanométricas de diâmetro

1/100 em relação ao da CV que confere vantagens estruturais, de alta cristalinidade e polimerização, diante do polímero de origem vegetal (Sutherland, 1998). Dentre as características mais relevantes, é possível destacar a elevada resistência mecânica e à tração, boa absorção e capacidade de reter água, a alta porosidade, boa biocompatibilidade, não ser tóxica e a possibilidade de incorporação de materiais para produção de compósitos (Oliveira *et al.*, 2022).

3.2 EXTRAÇÃO DA CELULOSE A PARTIR DA BIOMASSA VEGETAL:

De acordo com Donini (2010), a madeira do eucalipto tem sido uma das principais fontes industriais de CV sendo composta por celulose (40 a 45%), lignina (25 a 30%), hemicelulose (30%) e extrativos (até 4%) (Figura 2). Na produção de CV, a obtenção de fibras envolve processos de polpação mecânicos, térmicos, químicos ou ainda combinações destes. A polpação mecânica libera as fibras ao moer a madeira, enquanto a polpação química dissolve a lignina, liberando as fibras, que estão fortemente aderidas a ela. Nos processos termomecânicos (TMP), a madeira em forma de cavacos é aquecida com vapor para diminuir a rigidez da lignina, facilitando o desfibramento mecânico. Os processos quimio-termomecânicos (CTMP) também são utilizados e envolvem uma primeira etapa química branda para amolecer a lignina. Já o processo químico kraft, que é amplamente utilizado, trata a madeira em vasos de pressão com hidróxido de sódio e sulfeto de sódio para dissolver a lignina e preservar a resistência das fibras. Estes processos são responsáveis pelo gasto excessivo de água, ao final das etapas apenas 45% de celulose é obtida e, ainda, diversos resíduos poluentes são gerados (Melchior *et al.*, 2018).

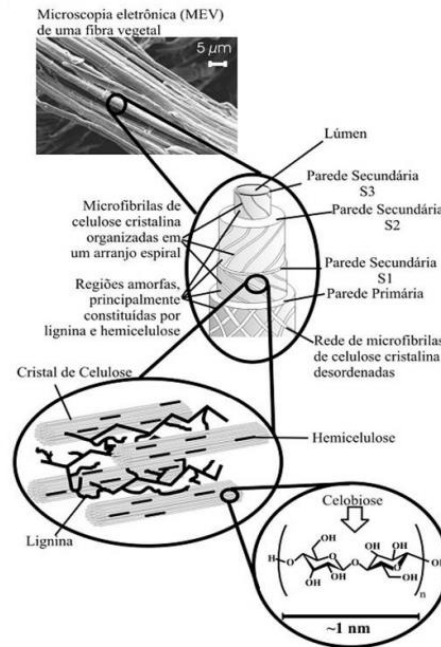


Figura 2: Arranjo das microfibrilas de celulose na parede celular vegetal do Eucalipto.

Fonte: SILVA *et al.*, 2019

Nos processos industriais tradicionais de processamento da madeira, é comum gerar resíduos com alto teor de matéria orgânica residual que incluem casca, lama de cal, lodo biológico, resíduos celulósicos e cinza de caldeira proveniente da queima de biomassa. Esses subprodutos representam um desafio para as indústrias, uma vez que requerem tratamento adequado para minimizar impactos ambientais negativos e maximizar o aproveitamento de recursos (Francisco *et al.*, 1998).

A indústria de celulose ocupa o sexto lugar em termos de poluidores ambientais, atrás das indústrias de petróleo, couro, cimento, aço e têxteis (Melchior *et al.*, 2018). Em produção de resíduo, há uma relação de aproximadamente 48 toneladas para cada 100 toneladas de celulose produzida. Mudanças causadas pelo descarte indiscriminado destes resíduos no solo são mais evidentes nos primeiros 10 cm da camada superficial e afetam principalmente o pH e a quantidade de potássio e cálcio, o que tem um impacto direto na saturação de bases (V%) do solo (Francisco *et al.*, 1998). Além dos resíduos, outra questão ambiental da produção da celulose vegetal são os recursos hídricos, principalmente devido aos elevados volumes de água consumidos e descartados. Indústrias de celulose e papel consomem de 15 a 100 m³.T⁻¹ de água, e os efluentes gerados tem grande potencial de prejudicar o ambiente aquático receptor se não for tratado corretamente (Melchior *et al.*, 2018).

De acordo com Thais Santi, na revista O Papel (2017), a indústria de celulose precisará deixar de lado o conservadorismo e investir em inovação. Ainda na matéria, Fabrício José da Silva, gerente executivo industrial da Suzano Papel e Celulose, chama a atenção para a necessidade de maior integração dos

processos. Ele destacou que primeiro é necessário aprimorar certos aspectos nas seguintes áreas: eficiência ambiental, custo e competitividade, eficiência energética, nas tecnologias de processos – tanto florestal como industrial, e, em inovação. Essa abordagem, vindo de grandes nomes da indústria e imprensa de celulose, abre oportunidade para novas abordagens a fim de avançar pesquisas de inovações da área.

3.3 A NANOCELULOSE BACTERIANA:

Estudos para alternativas sustentáveis, com diminuição de tempo e de custos, são, atualmente, grande foco para produções em larga escala. A bioprospecção de novas fontes produtoras de celulose é uma das principais áreas de novas pesquisas para desenvolvimento da matéria prima, diminuindo a geração de resíduos poluentes e fornecendo matéria prima com maior grau de pureza (Melchiors *et al.*, 2018).

A utilização da celulose bacteriana apresenta um potencial promissor em uma ampla gama de campos, incluindo medicina, meio ambiente, alimentos e cosméticos (Quadro 1). Destaca-se especialmente em setores que exigem elevados padrões de pureza na matéria-prima, como é o caso de sua utilização como emulsificante, agente dispersante e agente gelificante nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas, conforme apontado por Donini (2010).

Quadro 1: Áreas de aplicação da celulose bacteriana

Área	Aplicações
Cosmético	Estabilizador de emulsões como cremes tônicos, condicionadores e polidores de unhas. Máscara de celulose bacteriana impregnada com vitamina C
Têxtil	Roupas para esportes, tendas e equipamentos de camping.
Alimentos	Celulose comestível (“nata de coco”) Filme para cobertura de alimentos, reduzindo a velocidade de amadurecimento e a possibilidade de crescimento de micro-organismos contaminantes Ação como crioprotetor para preservação de micro-organismos probióticos em alimentos

Saúde	Engenharia de tecidos – regeneração de órgão e tecido a partir de recrutamento do próprio paciente, em suporte polimérico de celulose, como regeneração de pele em feridas derivadas de perda tissular por queimaduras ou úlceras Constituição de próteses como implantes dentários Liberação controlada de antibióticos em sítio tissular
Laboratórios	Imobilização de proteínas e de células, constituição de suporte para cromatografia, meios para cultura de tecidos
Purificação de esgotos	Ultrafiltração de água para descontaminação
Tratamento de lixo	Reciclagem de minerais e óleos
	Fonte: Adaptado de Coimbra (2016); Donini (2010); Amorim (2019)

A NCB é produzida por bactérias do vinagre, esses microrganismos são promissores frente a inovação e produção de celulose convencional pois são capazes de produzir membranas com alto grau de pureza, em pouco tempo comparado ao tempo de crescimento do *Eucalyptus* spp., sem geração de subprodutos poluentes e podem ser isoladas e cultivadas a partir de resíduos, como por exemplo, de frutas podres (Al-Deresawi, 2018).

A NCB é um biopolímero biodegradável e biocompatível, não tóxico e não alergênico, descrito por Louis Pasteur como “produto extracelular, um tipo de pele úmida, inchada, gelatinosa e escorregadia...”. A NCB possui uma estrutura nanométrica com elevado índice de cristalinidade (60 – 90%), ou seja, altamente ordenada, com elevado grau de polimerização, geralmente em torno de 2000 a 6000. As microfibras são ultrafinas com largura de 1 a 9 nm, formando uma estrutura reticulada densa estabilizada por várias ligações de hidrogênio (Lima *et al.*, 2015). Além disso, são produzidas sem geração de resíduos químicos poluentes, pois não necessitam passar por processos de extração e purificação (Oliveira *et al.*, 2022). A Figura 3 é possível observar um comparativo entre as estruturas da celulose bacteriana com a celulose vegetal.

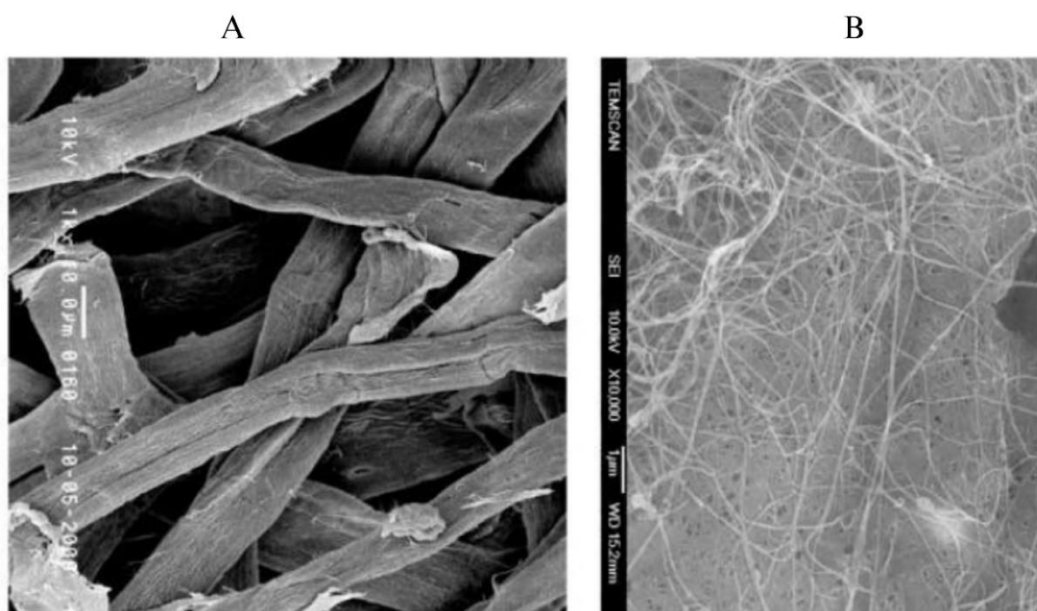


Figura 3: Estrutura de micrografia de celulose vegetal (A) e celulose bacteriana (B).
Fonte: DONINI, 2018.

Dentro da literatura, a NCB pode ser sintetizada pelos gêneros *Gluconacetobacter*, *Komagataeibacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Acetobacter* e *Sarcina* (Borro, 2021). Essas são bactérias em grande parte gram-negativas, possuem forma elipsoidal ou de bastonetes retos, podem ser encontradas em pares, isoladas ou em cadeias com dimensões variando de 0,5 – 1,0 μm por 2,0 – 10,0 μm , são estritamente aeróbicas, altamente tolerantes a condições ácidas, crescendo em pH menores que 5,0, mesófilas, crescem em temperaturas moderadas e não são patogênicas (Hommel, 2014). A nanocelulose é obtida pelo processo de fermentação submersa estática, pela metabolização de açúcares como glicose, como ilustra a Figura 4 (Barros, 2021).

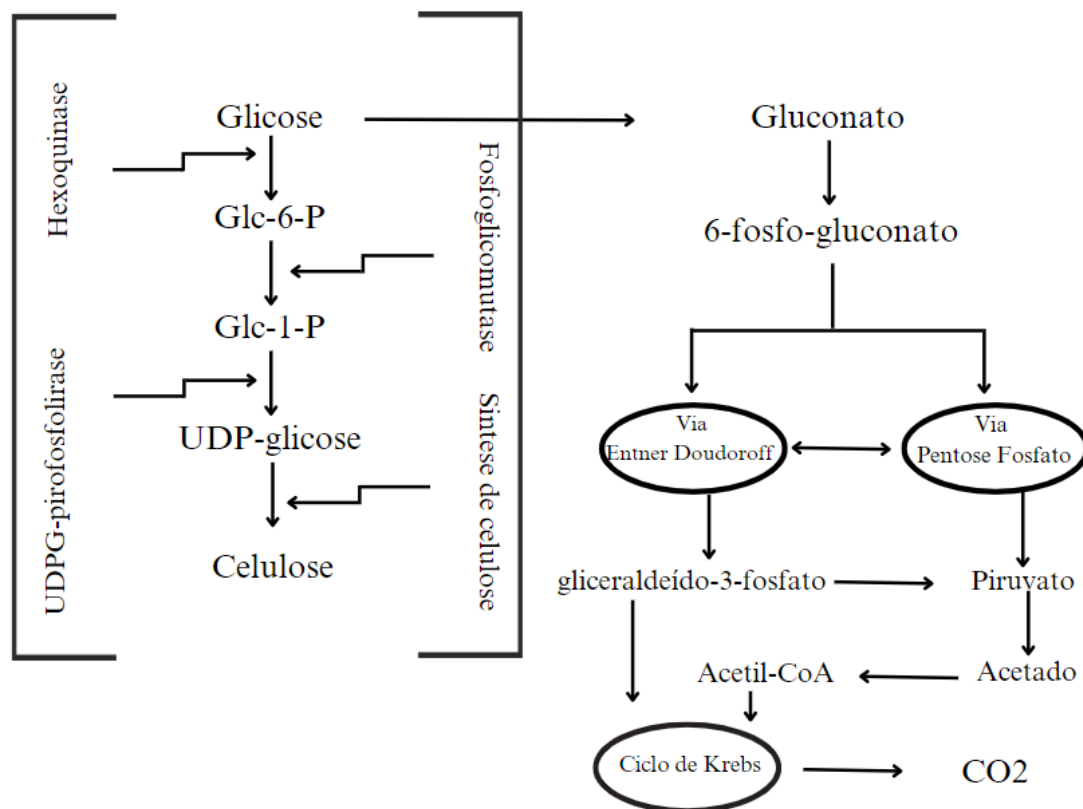


Figura 4: Rota simplificada de biossíntese da celulose bacteriana.

Fonte: BARROS, 2021. Adaptado.

Quando a glicose é utilizada como fonte de carbono, o metabolismo para produção de NCB segue quatro etapas cruciais: Na primeira etapa, a glicose é fosforilada pela enzima hexoquinase, resultando na formação de glicose-6-fosfato (Glc-6-P). Em seguida, ocorre a isomerização do Glc-6-P para glicose-1-fosfato (Glc-1-P) através da ação da fosfoglicomutase. A terceira etapa envolve a formação do uridina-difosfato-glicose (UDPGlic ou UDPG) por meio da ação da enzima UDPG-pirofosforilase (UGPase). Por fim, na quarta etapa, a síntese da celulose é concretizada.

O UDPGlic, que é amplamente presente em muitos microrganismos, desempenha um papel fundamental como precursor direto da celulose. Microrganismos produtores de celulose possuem cerca de cem vezes mais UDPGlic em comparação com microrganismos não produtores, evidenciando sua importância no processo de síntese da celulose (Barros, 2021).

O meio de cultura sintético mais comum para a produção de celulose bacteriana é o HS (Hestrin e Schramm), composto por glicose, peptona e extrato de levedura como fontes de carbono e nitrogênio e outros nutrientes para o crescimento celular. A água proveniente do processo de trituração do milho foi identificada como uma fonte alternativa eficaz de nitrogênio para o meio de cultura, quando adicionada em pequenas proporções, foi capaz de promover a produção de celulose bacteriana. Adicionalmente, foi

observado que adição de etanol ao meio de cultura pode contribuir para suprimir a mutação natural das bactérias, auxiliando na produção de celulose bacteriana (Generoso, 2021).

Após sua formação, as cadeias de glicose são liberadas por poros presentes na membrana plasmática e, em seguida, interagem umas com as outras por meio de ligações de hidrogênio. Essa interação resulta na formação de uma rede nanoestruturada de microfibrilas de celulose (Figura 5) (Barros, 2021).

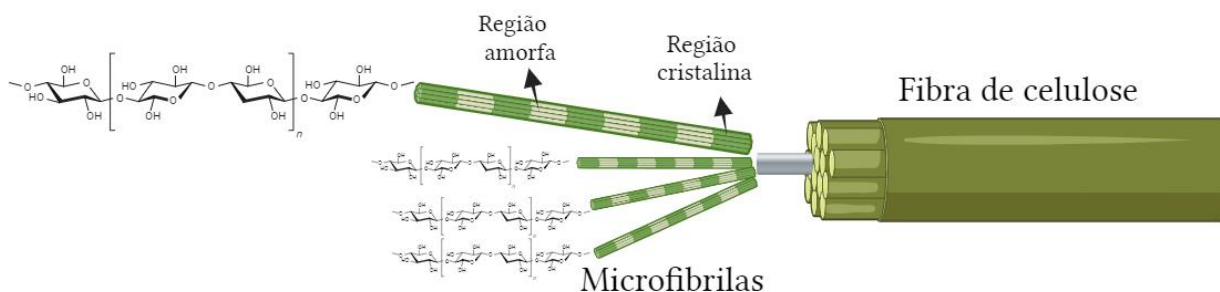


Figura 5: Estrutura da fibra de nanocelulose.

Fonte: Autora, 2023.

A produção de NCB foi identificada primeiramente por Brown (1996), que observou que a bactéria *Gluconacetobacter* é capaz de realizar a formação de uma camada gelatinosa durante o processo de fermentação do vinagre na presença de glicose e oxigênio.

A NCB produzida pela bactéria desempenha diferentes funções, incluindo seu uso como mecanismo de flotação, permitindo que a bactéria permaneça na interface entre o meio de cultura e o ar, facilitando a obtenção de oxigênio. Além disso, a membrana celulósica atua como uma barreira de proteção contra radiação ultravioleta, fornecendo uma camada de proteção para a bactéria. A NCB também ajuda a prevenir a desidratação do substrato, garantindo a manutenção da umidade do meio de cultivo (Williams, 1989).

A produção de NCB é uma vantagem evolutiva, descrita por Williams (1989), para a colonização da superfície da fruta. Além de conferir vantagens pela característica higroscópica e proteção contra os raios UV, tem a capacidade de reduzir a oportunidade de organismos competirem com sucesso pelo mesmo recurso limitado. A matriz de celulose cria um ambiente específico que favorece o crescimento das bactérias produtoras de celulose. O autor ainda provou que a NCB pode prevenir ou reduzir a colonização de um substrato natural, nesse caso fatias de maçã, por bolores e outras bactérias. Isso significa que as bactérias que produzem celulose têm uma vantagem na exploração dos recursos disponíveis, garantindo sua sobrevivência e sucesso reprodutivo.

Bactérias produtoras de nanocelulose podem ser isoladas de diversas fontes como frutas, vegetais, flores, vinagre e bebidas fermentadas. Alguns gêneros, como *Gluconacetobacter* e *Komagataeibacter*

foram encontrados e isolados de frutas maduras, como por exemplo, limão, abacaxi, laranja e mamão. Al-Deresawi (2018), por exemplo, realizou a bioprospecção e isolamento de bactérias produtoras de celulose a partir de frutas em decomposição obtidas no Iraque e tem como destaque dos resultados em termos de biomassa as bactérias *Komagataeibacter xylinum* isolada de limão, que apresentou a maior produtividade, 22,8 g de celulose a cada 200 ml de meio. Vieira (2013) apresenta a obtenção de uma biomembrana de celulose de forma simples, utilizando culturas estáticas e meios de cultivo naturais, como chá verde e sucos de frutas, como mamão, laranja e abacaxi, tornando o processo acessível devido ao baixo custo desses meios. Os resultados destacam a eficácia dos sucos de frutas, especialmente no caso do mamão com suco de laranja, que alcançou uma produtividade de 13,71 g de celulose por dia por litro de meio de cultivo e uma massa de 78 g em 15 dias. A adição de colágeno aumentou a massa da biomembrana, e a substituição de sacarose por suco de beterraba foi bem-sucedida. Segundo Ubina (2021) afirma que o cultivo estático é um método simples e comumente usados para a síntese de NBC, sendo a membrana produzida na interface ar/líquido da solução nutritiva.

4 METODOLOGIA:

4.1 COLETA DE FRUTAS:

Para o isolamento das bactérias foram selecionadas quatro frutas tropicais, pitaya (*Hylocereus megalanthus*), laranja Bahia (*Citrus sinensis* sp), ciriguela (*Spondias purpurea*) e jabuticaba (*Plinia cauliflora*) coletadas na cidade de Foz do Iguaçu, localizada no Oeste do Paraná - Brasil.

4.2 PREPARO DO EXTRATO DE FRUTAS:

Em um liquidificador 100 g da fruta madura foram colocados com 200 mL de água de torneira e misturados até se obter uma mistura homogênea, que foi então filtrada com auxílio de tecido de algodão para retirar o excesso de fibras e resíduos maiores (Al-Deresawi, 2018).

O extrato foi coletado em tubo Falcon estéril de 15 mL e armazenado em geladeira até a inoculação em meio líquido.

3.3 MEIO DE CULTIVO:

O meio líquido Hestrin-Schramm (HS) modificado foi preparado com (% m/v) 2% glicose dextrose; 0,5% extrato de levedura; 0,5% peptona; 0,27% fosfato dibásico; 0,115% ácido cítrico (SCHRAMM, 1954 e STIMULATION, 1953), e então o pH foi ajustado para 4,5 com ácido cítrico e foi adicionado 1 mL de nistatina para evitar crescimento de fungos e leveduras. O meio foi autoclavado por 15 minutos a 121°C.

3.4 ISOLAMENTO BACTERIANO:

Em um Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 100 mL do meio HS e 15 mL do extrato de fruta. O Erlenmeyer foi então fechado com um tampão e a mistura foi mantida em incubadora estática a 29°C por 14 dias.

Após este período, com o auxílio de uma alça de inoculação, foram retiradas alíquotas dos meios de cultivo líquidos que apresentaram grânulos brancos na superfície, indicando a presença de celulose. O material retirado foi então inoculado em placas de meio HS sólido pelo método de estrias. Todas as placas foram incubadas a uma temperatura de 30 °C por 72 horas, até que as colônias pudessem ser observadas. Após este período, foram realizados repiques sucessivos das colônias bacterianas em placas com meio sólido.

Em seguida, as placas contendo repique dos isolados bacterianos puros foram incubadas a 30 °C por 72 horas, e mantido em geladeira até o momento de uso.

3.5 CULTIVO E PRESERVAÇÃO:

Em Erlenmeyer s de 250 mL previamente autoclavados, foram adicionados 75 mL de meio de cultura HS com pH 6. Em duplicata, 5 colônias puras foram inoculadas em cada Erlenmeyer e então incubadas a 29°C por 14 dias. Esse procedimento foi realizado em duplicata com o isolado de cada fruta.

3.6 COLORAÇÃO DE GRAM:

Foram pipetados 10 uL do meio inoculado em uma lâmina e espalhado uniformemente no centro com auxílio de uma alça de inoculação, o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar. Depois de secar naturalmente, em uma bancada previamente limpa, foi realizado o procedimento de coloração. Foi adicionado 3 gotas de cristal violeta no esfregaço bacteriano e aguardado 1 minuto para a coloração. Após este período, foi realizada a lavagem da lâmina com água destilada corrente e foram adicionadas 3 gotas do reagente lugol e aguardado o tempo de 1 minuto para a reação. As lâminas foram então lavadas com água destilada e depois descorado duas vezes, rapidamente, com álcool 70% com a lâmina na vertical e então, novamente, lavado com água destilada. Em seguida, foi adicionado o complexo de corante de fucsina e após 1 min o excesso do reagente foi retirado o excesso com água destilada e aguardado a secagem na capela de fluxo laminar para a observação.

3.7. MEIO DE RUGAI COM LISINA:

Foram separados 12 tubos contendo meio de rugai com lisina adquiridos do laboratório NewPro. Com os tubos previamente rotulados, em uma capela de fluxo laminar, foram inoculados com uma agulha bacteriológica uma colônia de cada meio, inoculado através de picada até o final do tubo, e, então, aplicada a técnica de estriamento ao final do meio. Na tampa foi adicionado um pedaço de algodão estéril com 3 gotas do reagente Reativo de Kovacs e então tampado, deixando a tampa frouxa para passagem de ar. O procedimento foi realizado em duplicata para cada inóculo. Os tubos foram incubados por 24 horas a 35°C para a realização da leitura dos resultados.

3.8. ENSAIO DE CATALASE:

Na capela de fluxo laminar, com o auxílio de uma alça de inoculação, foi coletada uma colônia bacteriana a qual foi espalhada dentro do limite de círculos desenhados em uma lamínula de vidro. Então, com uma pipeta pasteur, em cada círculo, foi adicionado três gotas de peróxido de hidrogênio 3%. A

formação de bolhas de oxigênio indica teste positivo para catalase. O procedimento foi repetido para cada bactéria isolada das frutas.

3.9. PURIFICAÇÃO DA NANOCELULOSE:

Para a purificação da nanocelulose bacteriana o meio de cultivo foi transferido para tubos Falcon de 15 mL e centrifugado por 3 minutos a 3000 rpm. Ao fim da centrifugação o sobrenadante foi vertido e posteriormente descartado. Ao material sólido remanescente nos tubos Falcon foi então adicionado 8mL de uma solução de NaOH 0,1 M, agitado e então colocado a 90°C por 20 minutos para remover as impurezas bacterianas e possíveis contaminantes. Após este período, a solução contendo a nanocelulose foi centrifugada por 3 minutos a 3000 rpm e o sobrenadante descartado.

A massa de nanocelulose obtida passou por ciclos de lavagem e centrifugação com água destilada, sendo repetidas até que se atingisse um pH neutro, mantendo as condições de tempo e consistentes ao longo do processo.

Após a purificação a nanocelulose foi congelada a -80°C por 24 horas e liofilizada no equipamento SL-4049 (Solab).

3.10. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV):

As amostras foram colocadas em uma fita adesiva dupla face de carbono fixada em um suporte (stub) e metalizada com ouro-paládio por 1 minuto e meio até chegar numa espessura de 6-9 nm aproximadamente, utilizando-se o sputter SC7620 Quorum Mini Sputter Coater/Glow Discharge System. Posteriormente, as amostras foram submetidas à observação microscópica utilizando o escopo de varredura Zeiss EVO-MA10, operando com uma tensão de 10 kV. Durante a análise, foram feitas observações em diferentes níveis de zoom para uma visualização detalhada das amostras.

3.11 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX):

Os difratogramas de raios X foram obtidos utilizando-se um difratômetro EMPYREAN com radiação CuK α , entre os ângulos 2 θ 5° a 80°, tempo de contagem de 96,390 segundos e passo de 0,0262606 para ambas as amostras de celulose extraída do isolado de Laranja Bahia e Pitaya.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1. ISOLAMENTO DAS CEPAS BACTERIANAS DO SUCO DE FRUTA:

Após 14 dias do suco de frutas inoculado no meio de cultura HS, frascos contendo grânulos brancos suspensos no fundo da vidraria e na superfície do meio foram selecionados para realizar o estriamento e formação de colônias, pois indicaram formação de celulose (Figura 6).



Figura 6: Grânulos brancos na superfície do meio.

Fonte: Autora, 2023.

Os inóculos selecionados para a técnica de estriamento foram pitaya (*Hylocereus megalanthus*), laranja Bahia (*Citrus sinensis*) e jabuticaba (*Plinia cauliflora*). O frasco contendo o suco de seriguela (*Spondias purpurea*) inoculado não foi selecionado para a técnica pois houve contaminação de fungos esporulados. É importante ressaltar que esta contaminação persistiu, mesmo quando foi utilizada a

quantidade recomendada do reagente antifúngico nistatina, conforme especificado pelo fabricante, foi incluída no meio de cultivo.

O método escolhido para observação dos microrganismos presentes no meio de cultura é o estriamento por esgotamento, onde pode-se observar a morfologia das colônias das bactérias presentes no inóculo em 48 horas dentro dos parâmetros de temperatura e incubação estática (Ubina *et al.*, 2021).

A identificação do gênero bacteriano encontrado é de suma importância para melhorar as condições de cultivo, resultando em uma maior produção de biomassa de celulose bacteriana no menor tempo possível. As variáveis críticas, como temperatura, pH e fonte de carbono no meio de cultura, podem variar significativamente, influenciando diretamente na eficiência do processo (Urbina *et al.*, 2021).

O tempo de incubação varia entre 7 e 14 dias (Al-Deresawi, 2018). Após esse período, ocorre o acúmulo de metabólitos secundários, causado por uma concentração suficientemente baixa de nutrientes ao longo do gradiente de nutrientes estabelecido em todo o biofilme (Winston, Garcin, 2002). Após esse intervalo, alguns desses metabólitos, como os ácidos glicólico e fórmico, descritos como inibidores de fermentação, podem exercer um efeito inibitório na produção de nanocelulose (Urbina *et al.*, 2021).

Após 48 horas, as placas de petri foram retiradas da incubadora e observou-se as colônias formadas. Foram selecionadas 3 colônias de cada fruta com as características morfológicas da tabela 1 para realizar o isolamento bacteriano.

Características	Observação
Cor/Aspecto	Creoso
Forma	Circular
Elevação	Convexo
Superfície	Suave
Margem	Inteiro
Textura	Suave
Forma da célula	Haste

Diâmetro da colônia

4mm

Tabela 1: Características microscópicas do isolado bacteriano.

Fonte: Singh, 2017.

Após uma série de 3 repiques consecutivos, com objetivo de isolamento das colônias com padrão similar de morfologia descrito por Singh (2017), foi possível isolar três cepas bacterianas de cada meio de cultura. As cepas isoladas foram inoculadas em meio HS e foram selecionadas os inóculos com produção de celulose então plaqueado uma cepa bacteriana isolada em duplicata para realização de testes bioquímicos (coloração de gram, teste de catalase e rugai com lisina) para identificação a nível de gênero bacteriano, conforme descrito no Manual de Bergey (2002).

Os resultados dos isolados obtidos e as colônias bacterianas formadas e estriadas a partir do inóculo já isolado pode ser observado na Figura 6:

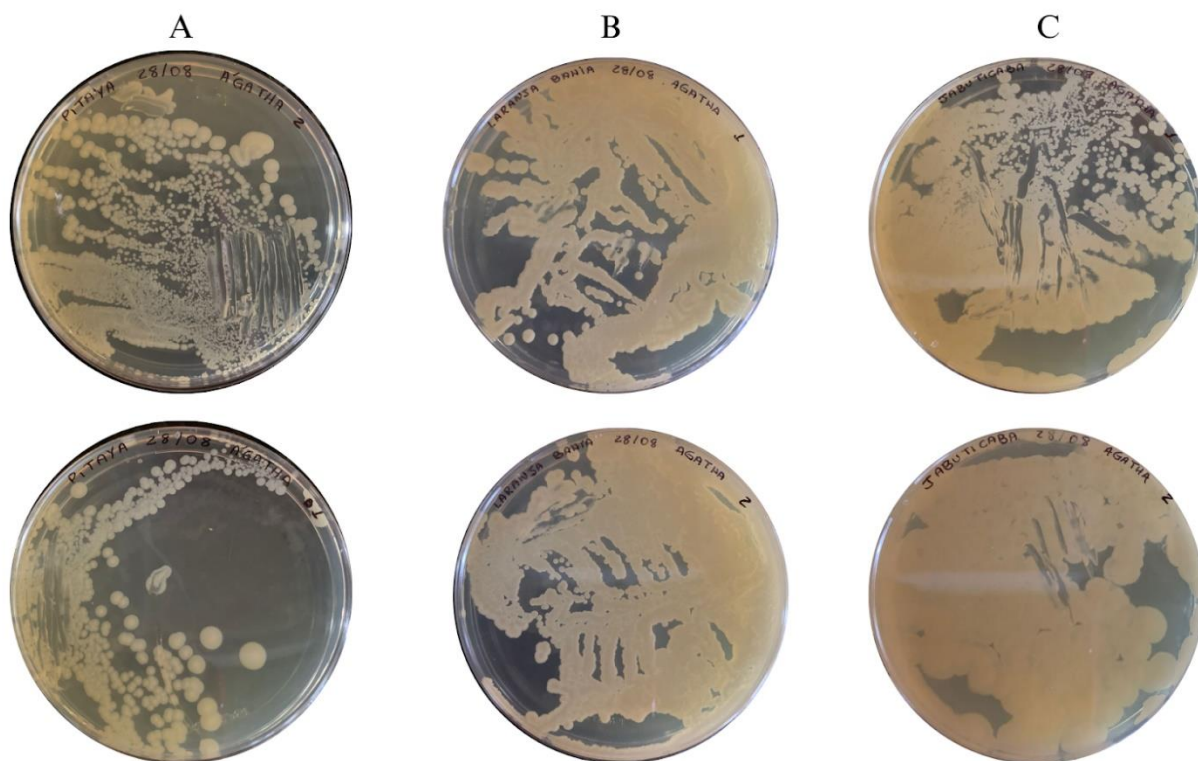


Figura 6: placas de Petri contendo colônias bacterianas isoladas e puras a partir de suco de (A) Pitaya, (B) Laranja Bahia e (C) Jabuticaba.

4.2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS:

4.2.1. Coloração de gram:

A coloração de gram é uma técnica utilizada para diferenciar as espécies bacterianas em dois grandes grupos, Gram-positivas e Gram-negativas, com base nas propriedades químicas e físicas de suas paredes celulares. Foi originalmente desenvolvido por Hans Christian Gram em 1882 para discriminar entre pneumococos e bactérias *Klebsiella pneumoniae* no tecido pulmonar (Santos *et al.*, 2016).

Na coloração de Gram, a coloração primária, realizada com o corante cristal violeta, é usada para tornar todas as bactérias uniformemente violetas. Em seguida, o reagente fixador lugol forma um complexo insolúvel corante-iodo no citoplasma. O descolorante, como o álcool, remove o corante de algumas bactérias, enquanto outras a retêm. Finalmente, uma contracoloração, o como carbol fucsina é usada para colorir as bactérias descoloridas, permitindo a diferenciação entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Bhumbla, 2018).

As bactérias Gram-positivas adquirem uma cor violeta ou roxa. Isso ocorre porque as bactérias gram positivas possuem uma parede celular mais espessa, composta principalmente de peptidoglicano e ácido teióico (Figura 7), que não é removido facilmente com o álcool e retém o corante cristal violeta durante o processo de coloração (Santos, *et al.*, 2016).

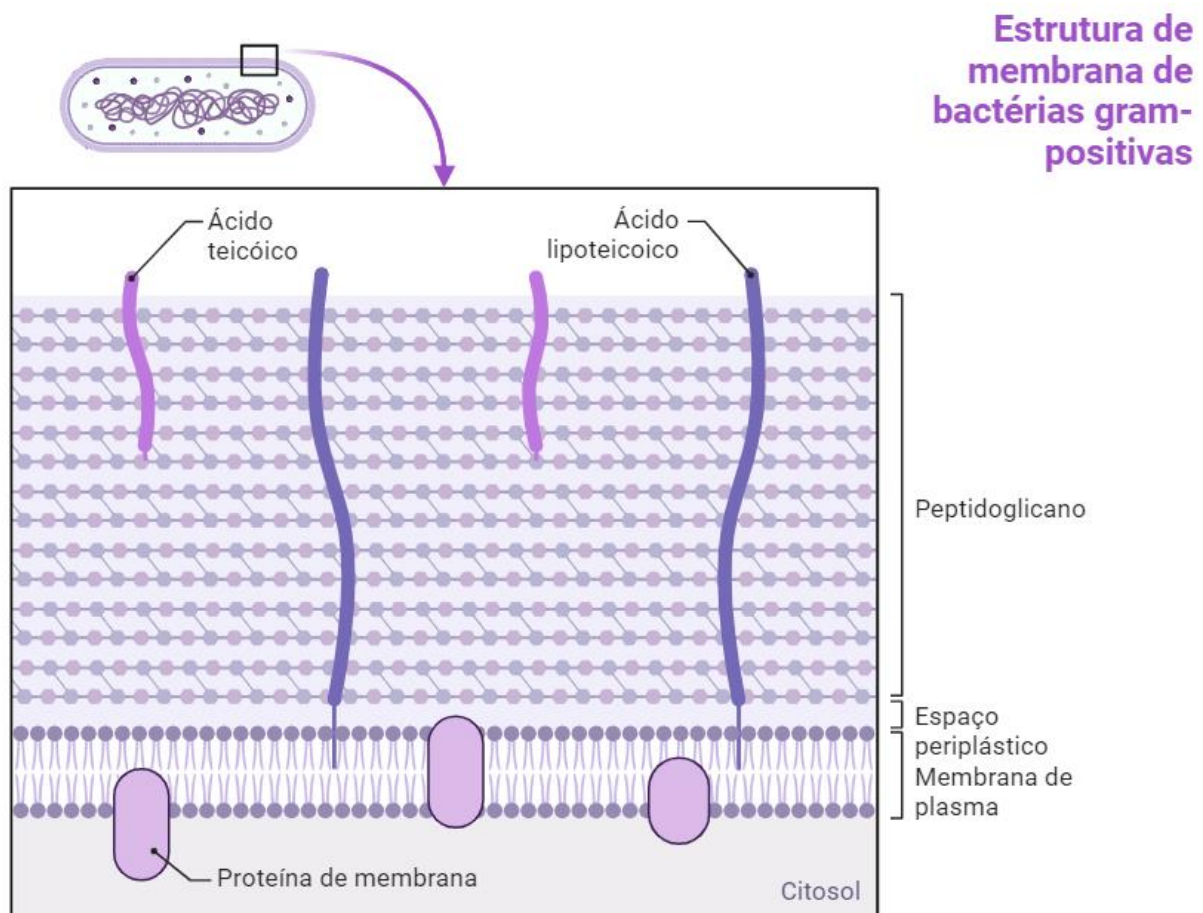


Figura 7: Estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas

Fonte: Biorender modificado, 2023.

As bactérias Gram-negativas, por outro lado, apresentam uma coloração vermelha ou rosa distintiva após o procedimento de coloração de Gram. Isso deve ter características únicas de sua parede celular, que são mais finas em comparação com as bactérias Gram-positivas. Essa parede celular possui uma alta concentração de lipídios em sua membrana mais externa (Figura 8), que é facilmente dissolvida pelo álcool durante a etapa de coloração. Esse processo resulta na formação de poros significativos na parede celular, compostos principalmente por ácidos graxos. Além disso, as bactérias Gram-negativas apresentam uma camada externa composta de lipopolissacarídeos e proteínas, tornando-as suscetíveis à lavagem do corante durante o procedimento e, conseqüentemente, sensíveis ao corante de contraste (Souza, 2011).

Estrutura da parede celular de bactérias Gram negativas

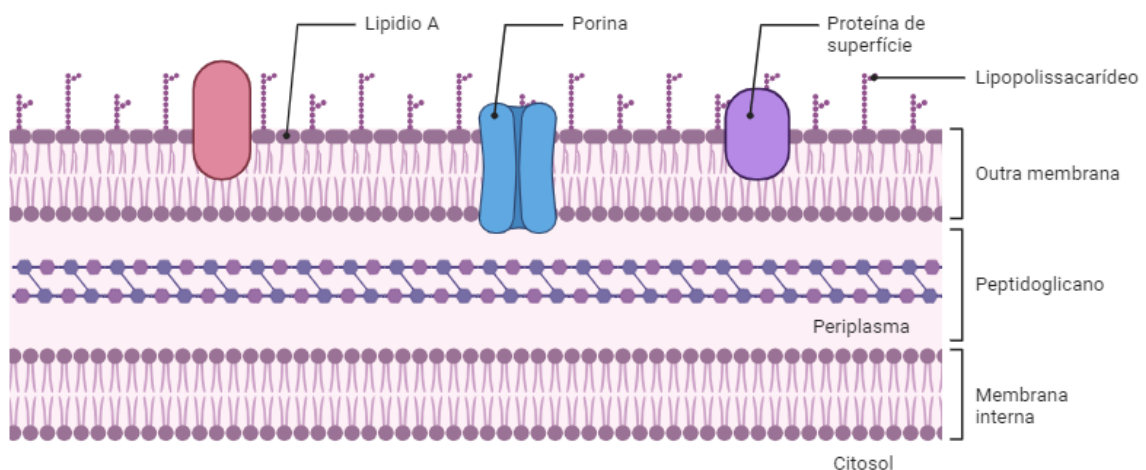
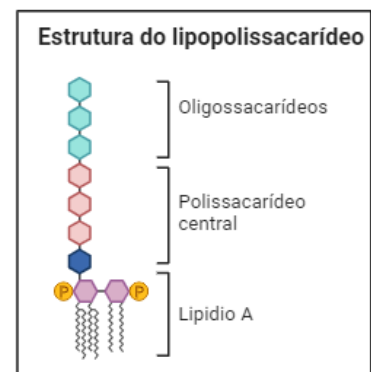
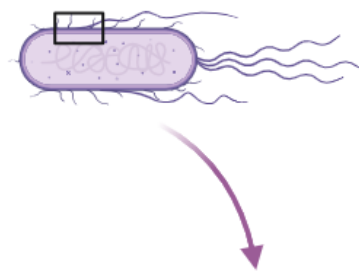


Figura 8: Estrutura da parede celular de bactérias Gram negativas

Fonte: Biorender modificado, 2023.

A Figura 9 apresenta os resultados da coloração de Gram das bactérias isoladas a partir de amostras de suco de fruta. Em A, podemos identificar as bactérias Gram-positivas, coradas em roxo, que foram

isoladas do suco de pitaya. Em B, as bactérias Gram-negativas, originárias do suco de laranja Bahia, são claramente visualizadas devido à sua coloração em vermelho. Por fim, na última seção da Figura, observamos as bactérias Gram-positivas obtidas do suco de jabuticaba (C) inoculado.

A celulose bacteriana pode ser sintetizada por diversas espécies de bactérias Gram-negativas pertencentes aos gêneros *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella* e *Sarcina*. Esse biopolissacarídeo é predominantemente sintetizado por espécies Gram-negativas, mas também pode ser produzido por gram-positivas, como algumas espécies do gênero *Gluconoacetobacter*, como, por exemplo, *Gluconoacetobacter hansenii* (Lee, 2014).

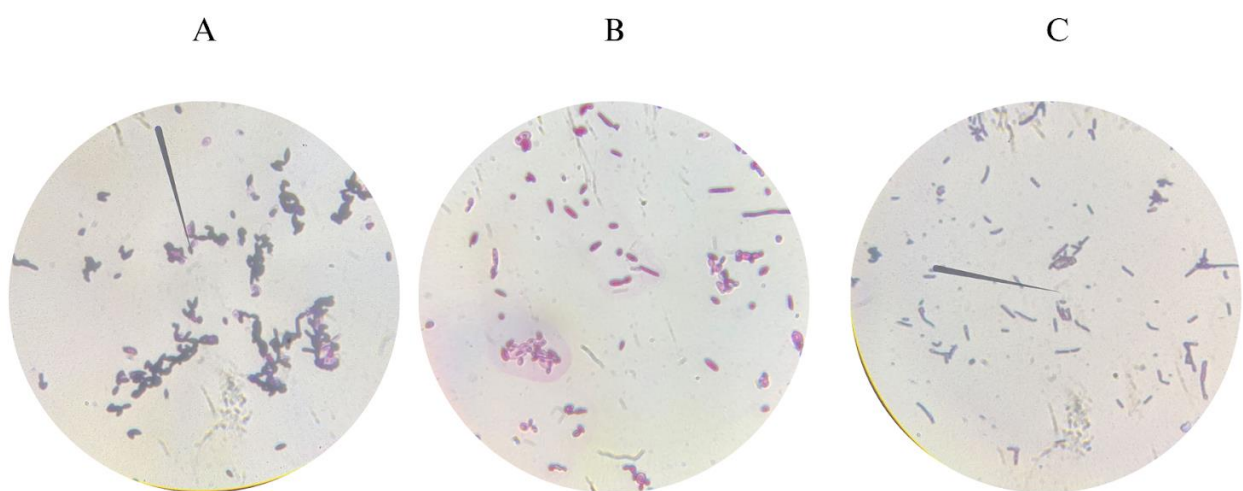


Figura 9: Resultado da coloração de gram dos isolados. Resultado da (A) Pitaya (gram positiva), (B) Laranja Bahia (gram negativa) e (C) Jabuticaba (gram positiva).

4.2.2. Teste catalase:

O teste bioquímico enzimático de catalase é usado para determinar a presença da enzima catalase em bactérias. A catalase é uma enzima que desempenha um papel importante na proteção das células contra danos oxidativos, pois ajuda a decompor o peróxido de hidrogênio H_2O_2 , uma espécie reativa de oxigênio que pode ser tóxica para as células quando presente em concentrações elevadas.

A alta reatividade do H_2O_2 pode resultar na oxidação prejudicial de biomoléculas essenciais, como proteínas, lipídios e DNA, levando à disfunção celular e até à morte. Além disso, danifica enzimas críticas para o metabolismo bacteriano, prejudicando os processos celulares, desestabiliza o equilíbrio redox nas células e gera espécies reativas de oxigênio (ROS), contribuindo ainda mais para o dano oxidativo e lesões celulares. Esse composto químico representa uma ameaça considerável para as células bacterianas e destaca a importância do controle rigoroso de sua concentração para manter a homeostase e a integridade celular (Wu, 2020).

A reação que a enzima desempenha é a redução do peróxido de hidrogênio em água (H_2O) e oxigênio (O_2), substâncias não reativas. Quando a bactéria é catalase-positiva, entra em contato com o H_2O_2 3%, é possível observar a formação de bolhas de oxigênio efervescentes, isto por que a catalase presente na bactéria inicia a reação de degradação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, conforme a enzima catalase age, a concentração de peróxido de hidrogênio na solução diminui, tornando-a menos tóxica para as bactérias (Camussi, 2021).

Os testes de catalase revelaram que as bactérias presentes nas Pitaya, Laranja Bahia e Jabuticaba são catalase-positivas. Isso ficou evidente quando os isolados dessas três frutas entraram em contato com peróxido de hidrogênio, resultando na efervescência e na liberação de gás oxigênio, como mostra a Figura 10. Esse fenômeno confirma o processo de redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 , demonstrando a presença da enzima catalase nas bactérias isoladas nessas frutas.

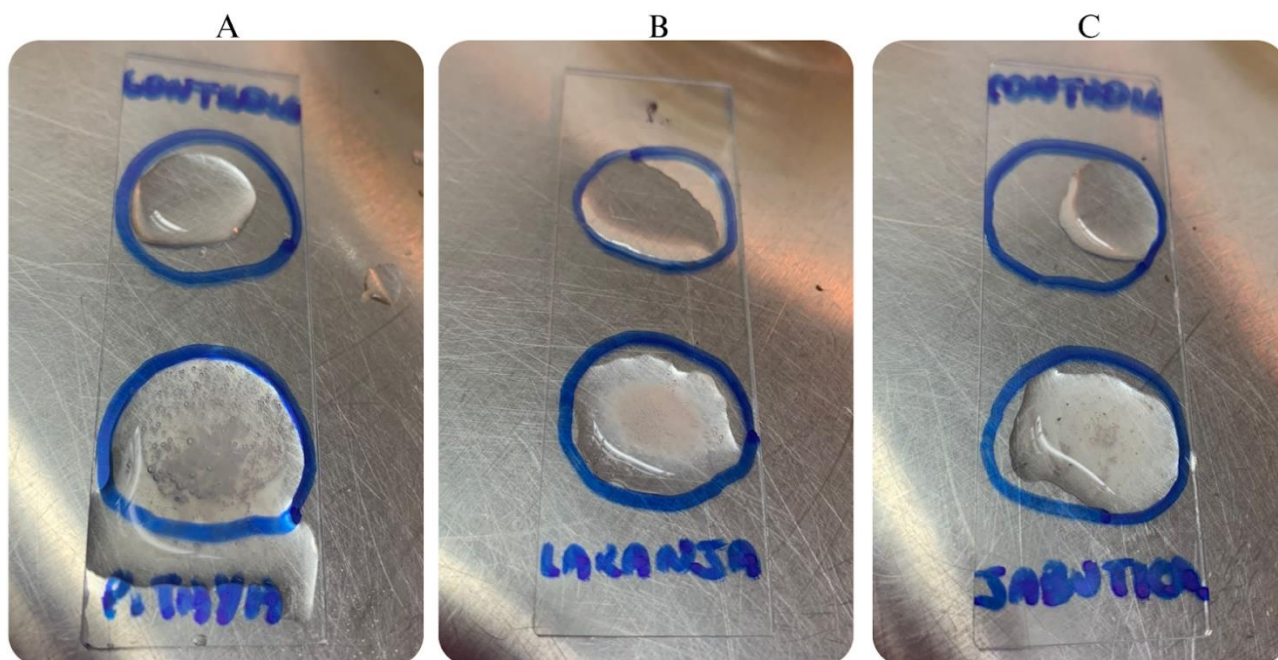


Figura 10: Resultado do catalase dos isolados. (A) Pitaya (positiva), (B) Laranja Bahia (positiva) e (C) Jabuticaba (positiva).

4.2.3. Teste rugai com lisina:

O teste de rugai com lisina utiliza meios de cultura específicos para realização de ensaios bioquímicos para diferenciação de gênero das bactérias gram negativas (Oliver, 2004). Dentre os testes bioquímicos presente no meio de cultura incluem a ocorrência de indol (IND), desaminação de aminoácido L-triptofano (LTD), fermentação de sacarose (SAC), produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), produção de gás (GAS), hidrólise de uréia (URE), fermentação da glicose (GLI), descarboxilação da lisina (LIS) e motilidade (MOT) (Laborclin, 2022).

O teste de rugai com lisina, além de realizar provas bioquímicas de bactérias gram negativas, ainda investiga a nível de gênero a família *Enterobacteriaceae*. que conta com mais de 27 gêneros, 102 espécies e 8 grupos indefinidos (Laborclin, 2022). Essas são bacilos com coloração gram-negativa, não formam esporos e podem exibir motilidade variável. São tipicamente oxidase-negativas e prosperam em diversos tipos de meios, incluindo meios básicos, meios ricos e meios seletivos. Possuem uma natureza de anaeróbios facultativos, o que significa que podem crescer tanto em ambientes com oxigênio (aeróbios) quanto em ambientes sem oxigênio (anaeróbios) (Rodrigues, 2017). Demonstram a capacidade de fermentar a glicose, podendo ou não produzir gás durante esse processo. Além disso, são positivos para a enzima catalase e têm capacidade de reduzir nitrato a nitrito (Laborclin, 2022).

Dentre as 102 espécies, a literatura descreve *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca* como produtoras de celulose em meio de cultura específico (Rodrigues, 2017; Zogaj *et al.*, 2003; Urbina *et al.*, 2021).

Essas bactérias são comumente encontradas no sistema gastrointestinal e têm capacidades e características diferentes na produção do biofilme. As principais substâncias que compõem a matriz extracelular da *E. coli* e *Salmonella typhimurium* são a fímbria curli (estruturas bacterianas filamentosas envolvidas na adesão e agregação de bactérias) e a celulose. Além de promover a adesão, as curli também são críticas para a estabilidade de biofilmes, pois formam uma matriz tridimensional que mantém as bactérias unidas (Zogaj *et al.*, 2003).

As fímbrias tipo 3 e a composição dos polissacáridos capsulares são as principais estruturas superficiais envolvidas no processo de produção de biofilmes. As fímbrias são responsáveis pela adesão

estável das células, enquanto a composição dos polissacáridos capsulares influencia a comunicação entre as células e a arquitetura do biofilme. Biofilmes formados por *Klebsiella* fornecem uma proteção parcial contra as defesas do sistema imunológico, pois a matriz do biofilme bloqueia o acesso de anticorpos e peptídeos antibacterianos, proporcionando a eficiência do complemento e da fagocitose. Isso destaca a importância das estruturas extracelulares na formação e na defesa dos biofilmes (Piperaki, 2017).

Os testes bioquímicos foram realizados em todas as amostras (Figura 11) com o objetivo de coletar informações bioquímicas que auxiliassem na identificação dos gêneros bacterianos potenciais na literatura, seguindo o Manual de Bergey (2002) para identificação bacteriana.

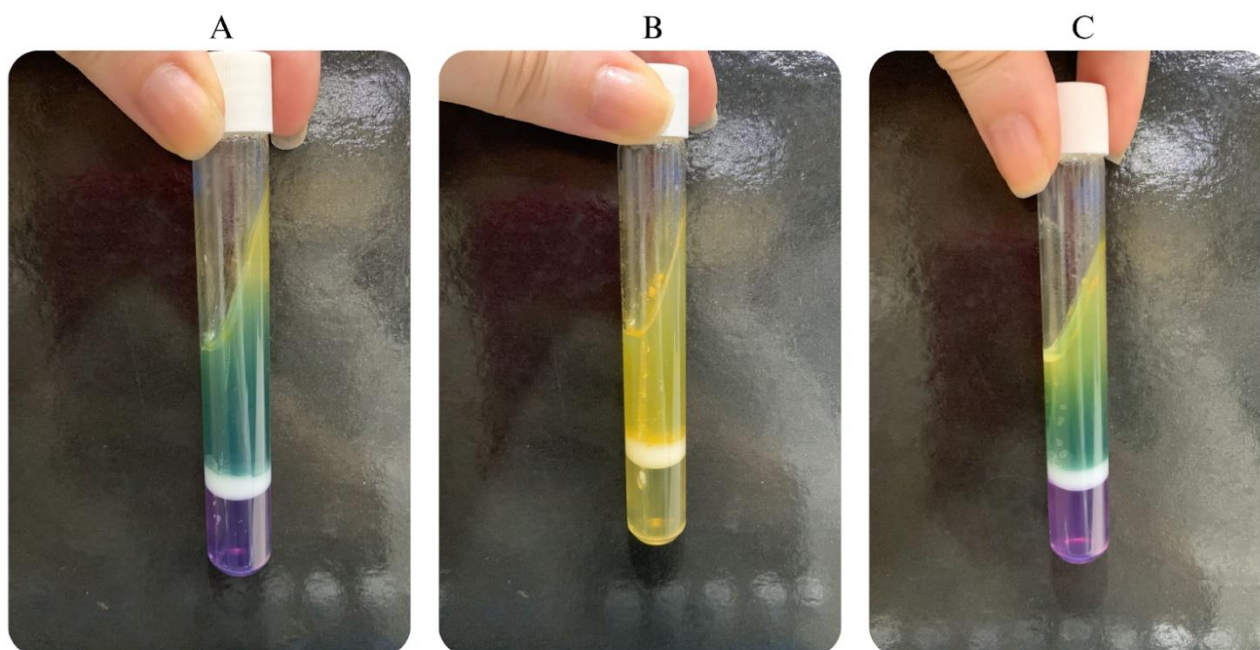


Figura 11: Resultado teste de rugai e lugol de (A) Pitaya, (B) Laranja Bahia e (C) Jaboticaba.

No entanto, é importante observar que apenas a amostra de laranja Bahia, devido à sua característica gram-negativa, pode estar associada à família *Enterobacteriaceae*. Os resultados dos testes bioquímicos prolongados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultado dos testes bioquímicos Gram, Catalase e Rugai com Lisina.

Amostra	Gram	Catalase	Indol	LTD	Sacarose	Glicose	Gás	Uréia	H2S	Lisina	Motilidade
---------	------	----------	-------	-----	----------	---------	-----	-------	-----	--------	------------

Pitaya	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
Laranja Bahia	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
Jaboticaba	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+

Fonte: Autora, 2023.

Dentro do software disponibilizado pela NewProv, foram inseridos os resultados do teste de Rugai com lisina, conforme apresentado na Tabela 2, com o objetivo de determinar a taxa de semelhança entre o bacteriano isolado da laranja Bahia e enterobactérias. Os resultados obtidos pelo software apontaram uma semelhança bioquímica significativa, atingindo a marca de 61,78% com a espécie *Klebsiella pneumoniae* (Figura 12). Esse resultado sugere uma semelhança entre o isolado proveniente da laranja Bahia e a *K. pneumoniae*. Essa informação pode ser crucial para a identificação precisa do organismo em estudo e pode ter implicações importantes na melhora das características de cultivo e fonte de carbono.

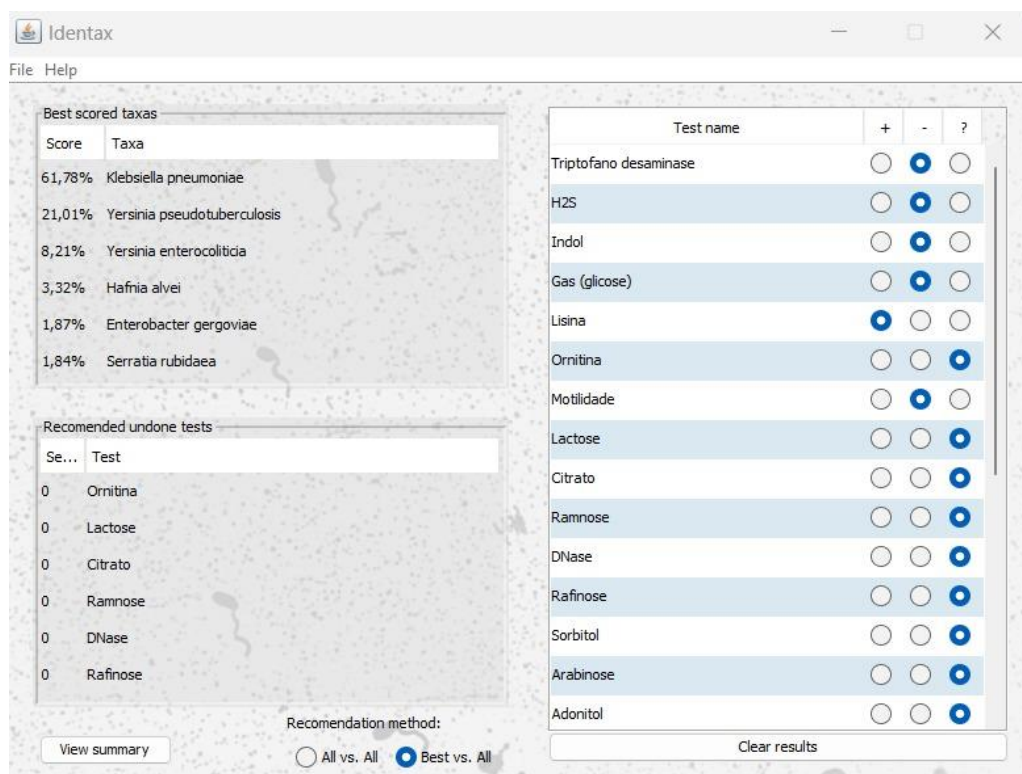


Figura 12: Análise de Semelhança entre Isolado de Laranja Bahia e Enterobactérias: Resultados do Software.

Fonte: NewProv, 2023.

Os testes bioquímicos, embora sejam uma ferramenta eficaz na identificação bacteriana, muitas vezes não conseguem distinguir entre diferentes gêneros bacterianos ou podem gerar resultados ambíguos. Os testes bioquímicos são baseados em respostas de diferentes microrganismos a determinados substratos ou condições de cultivo. No entanto, esses testes nem sempre são conclusivos, especialmente quando se trata de bactérias menos comuns ou espécies que apresentam características semelhantes em termos de crescimento e metabolismo. Por isso, a investigação genotípica torna-se uma etapa crucial no processo de identificação. Essa análise permite examinar sequências específicas de DNA, identificar marcadores genéticos diferentes e compará-los com bancos de dados genômicos para determinar a camada de isolados com outras espécies bacterianas. Essa abordagem pode fornecer resultados mais definitivos, permitindo a identificação precisa da bactéria em questão.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA NANOCELULOSE:

4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV):

A morfologia da NCB produzida foi avaliada com microscopia eletrônica de varredura (MEV). Durante esta análise, foi possível notar uma estrutura notavelmente organizada e intrigante da nanocelulose produzida através do isolado de pitaya. Na Figura 13 podemos observar a estrutura que se destacou por sua notável regularidade e organização. Além disso, a estrutura do NCB revelou um tamanho na ordem de 665 nm, um indicativo de propriedades únicas e promissórias. Sua organização estrutural e tamanho na escala nanométrica tornam um recurso valioso para o desenvolvimento de tecnologias inovadoras e sustentáveis, com grande potencial de aplicação em diversos campos, desde a nanotecnologia até a farmacêutica (Donini *et al.*, 2010).

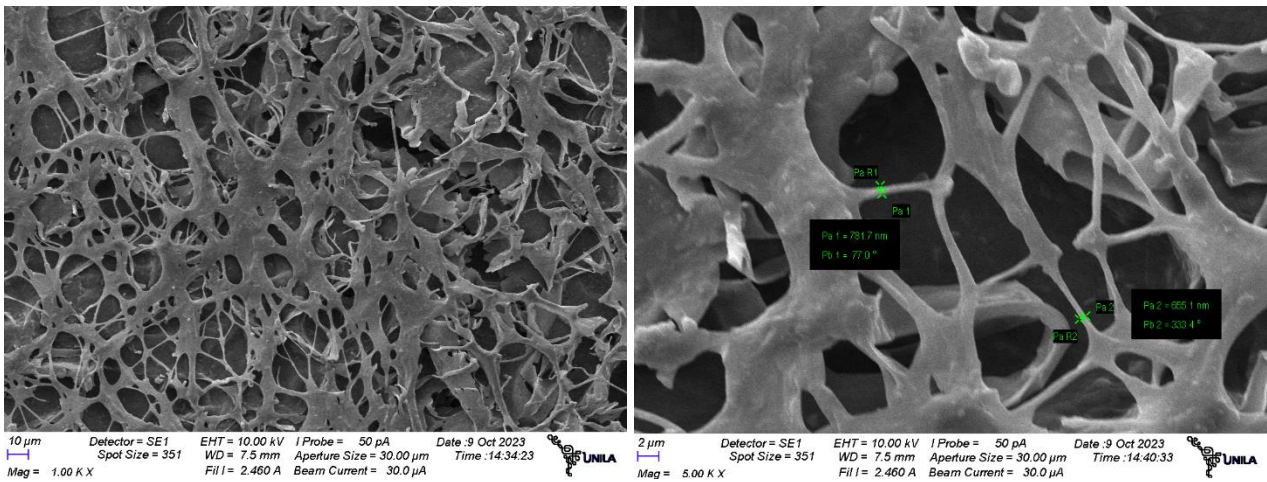


Figura 13: Avaliação da nanocelulose produzida pelo isolado de pitaya no MEV.

Também foi realizada a avaliação do material produzido a partir do isolado de laranja Bahia. Durante a análise, foi possível constatar a presença de uma estrutura de menor tamanho, chegando a aproximadamente 588 nm. Mostrando semelhança ao tamanho da estrutura do material obtido a partir do isolado da pitaya.

Em contrapartida, a estrutura avaliada de laranja Bahia é altamente desordenada, ainda com o processo de liofilização nos mesmos parâmetros da amostra de pitaya, demonstrou partículas suspensas de celulose com espessuras nanométricas.

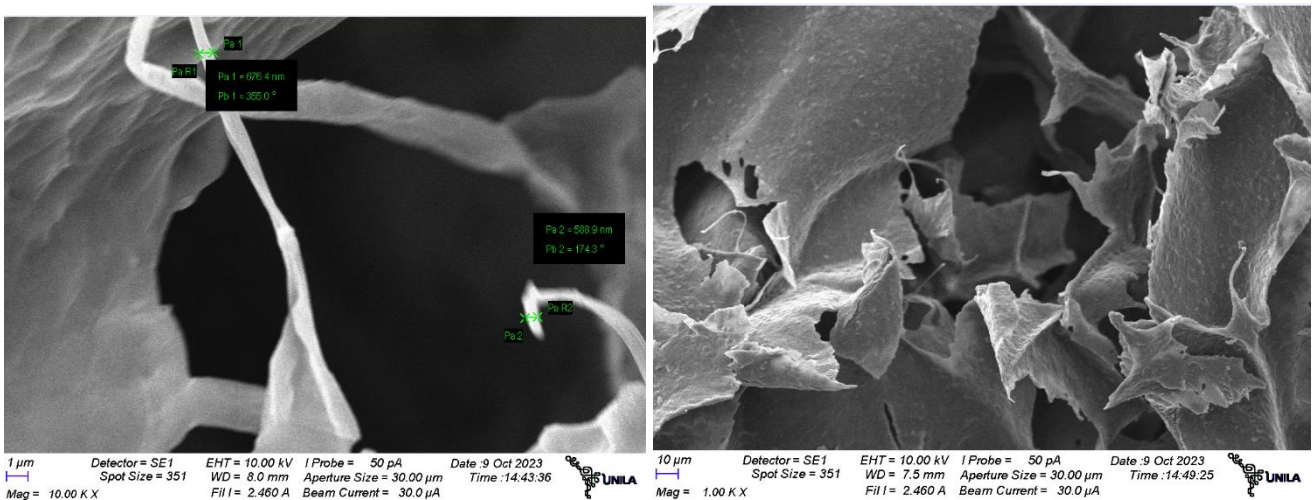


Figura 14: Avaliação da nanocelulose produzida pelo isolado de Laranja Bahia no MEV.

Um ponto de destaque nesse processo de análise é que, apesar das minuciosas investigações com o MEV, não foi possível visualizar nenhuma cepa bacteriana presente na amostra. Esse resultado ressalta a eficácia das etapas de purificação na produção da nanocelulose. A ausência de contaminação bacteriana demonstra a alta qualidade e pureza do produto, tornando-o adequado para uma ampla gama de aplicações. Contudo, vale ressaltar que maiores estudos são necessários para confirmar a obtenção de materiais nanoestruturados de celulose.

4.3.2 Difração de Raio-X (DRX):

Na Figura 15 pode ser observado o resultado obtido pela difração de raios X (DRX) com picos correspondentes ao material presente na amostra. Geralmente, a celulose é constituída por uma combinação de fases I α e I β , e a proporção entre essas fases varia conforme a espécie de origem. Entretanto, é importante destacar que a estrutura I α prevalece na celulose gerada por algas e bactérias (Duarte, 2012). De acordo com Lima, (2015) três picos são característicos da celulose I a ângulos de difração 2θ de 14° a 23°. Na Figura, em A, pode ser observado picos a 19,0°, 22,6° e 30,7°, já em B pode-se observar picos a 15,6°, 22,8° e 31,1°, característicos da celulose.

Ou seja, o difratograma típico de celulose I, apresenta picos na região amorfa ($18^\circ \leq 2\theta \leq 19^\circ$) e pico máximo na região cristalina ($22^\circ \leq 2\theta \leq 23^\circ$) (Bilcati, 2022). Esses picos são indicativos da presença da forma cristalina da celulose. A posição e a intensidade desses picos característicos fornecem dados para a caracterização e comparação das diferentes amostras de celulose, bem como a organização das unidades de glicose nas fibrilas celulósicas. Os ruídos presentes nos gráficos correspondem a característica amorfa, isto porque a celulose produzida pelas bactérias não corresponde ao formato de membrana, e sim de celulose suspensa compactada.

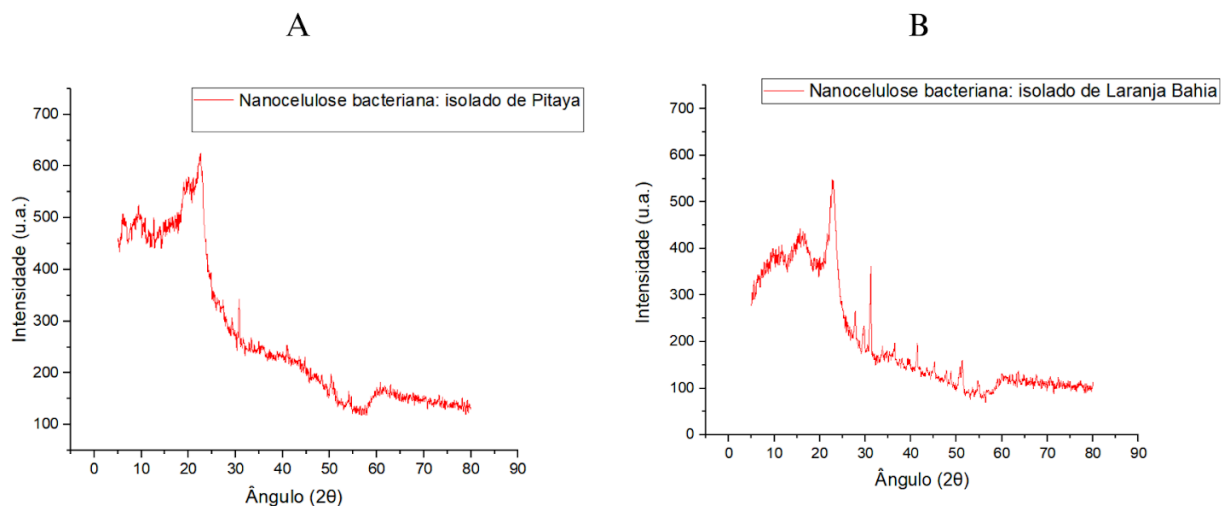


Figura 15: Difração de Raios X das amostras de nanocelulose bacteriana. O material da laranja Bahia parece mais cristalino, os picos estão mais definidos

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Dentre os meios inoculados, apenas pitaya e laranja Bahia tiveram uma produção significativa de nanocelulose bacteriana no intervalo de 7 a 14 dias de cultivo. A NCB isolado da pitaya demonstrou alta organização com estrutura de dimensões nanométricas. Já a celulose produzida pelo isolado de laranja Bahia, apesar de também ter estruturas nanométricas foram avaliadas como partículas grandes de celulose, desordenadas e suspensas. As duas estruturas são promissoras para diferentes aplicações industriais frente a composição de alta pureza de celulose tipo I demonstrado pelos resultados obtidos no DRX, em curto período e com estruturas nanométricas.

Os isolados não produziram biofilme de nanocelulose, mas obteve celulose suspensa, forma promissora de aplicação como matéria-prima em áreas como cosmética e farmacêutica. Para a ausência de formação de película, a falta de incubadoras com luz e, conseqüentemente, a ausência de estímulo à radiação ultravioleta, pode ter sido a razão pela qual o biofilme não se formou na superfície do meio de cultura.

Para uma identificação mais embasada dos gêneros bacterianos dos isolados, torna-se necessária a utilização de técnicas de avaliação genotípica, complementando os resultados dos testes bioquímicos. Além disso, mais estudos com a NCB são necessários para o aprimoramento das técnicas para a formação de

celulose, como repetir o cultivo com variações de fonte de carbono, condições de luminosidade e pH para a aprimoração da produtividade. E técnicas de caracterização da cristalinidade e da composição da NCB realizando análises como termogravimétrica (TG) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

Esses estudos podem ajudar a identificar novos isolados bacterianos que produzem NCB de alta qualidade e a otimizar as condições de cultivo para aumentar a produtividade das bactérias advindas da bioprospecção das frutas. Além disso, os estudos com a nanocelulose podem contribuir para o desenvolvimento de novas técnicas para a produção de celulose a partir de fontes renováveis, como resíduos agrícolas e florestais. Isso não apenas promove a sustentabilidade, mas também reduz a dependência de fontes de celulose que geram altos níveis de resíduos poluentes e materiais derivados do petróleo.

7 REFERÊNCIAS:

DONINI, Í. A. N. *et al.* **Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana.** *Eclética Química*, v. 35, n. 4, p. 165–178, 2010.

IBÁ. **Estatísticas da Indústria Brasileira de Árvores. Celulose.** Disponível em: <https://www.iba.org/celulose-2>.

VASCONCELOS, G. M. D. DE. *et al.* **Produção e caracterização de celulose pela *Glucanoacetobacter hansenii* em meio contendo glicose ou manitol.** *Matéria* (Rio de Janeiro), v. 25, n. 4, p. e-12844, 2020.

OLIVEIRA *et al.*, R. V. *et al.* **Biocompósito biodegradável hidrofóbico à base de amido de banana verde associado à celulose bacteriana.** *Matéria* (Rio de Janeiro), v. 27, n. 1, p. e202149059, 2022.

MELCHIORS, E. & XAVIER, C. **Influências do processo de polpação em efluentes de indústrias de celulose e papel. Influences of the pulping process in the effluent from pulp and paper industries,** 2018.

FRANCISCO, A. *et al.* **Resíduos da indústria de celulose em plantios florestais.** *Boletim de Pesquisa Florestal*, v. 37, p. 99–106, 1998.

SILVA, R. *et al.* **Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos.** *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 661–671, 2009.

SANTI, Thais. **Painel de discussão sobre celulose aponta novas oportunidades e importância do redesenho da indústria.** *Revista O Papel*, 2017.

KUDLICKA, K.; BROWN, JR, R. M. **Cellulose biosynthesis in higher plants.** *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, v. 65, n. 1-2, p. 17–24, 2014.

- WILLIAMS, W. S.; CANNON, R. E. **Alternative Environmental Roles for Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum***. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55, n. 10, 1989.
- BARROS, Matheus de Oliveira. **Propriedades de celulose bacteriana: influência do tempo de fermentação em diferentes cepas de *Komagataeibacter***. Fortaleza, 2021. 102 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química.
- SCHRAMM, M.; HESTRIN, S. **Factors affecting Production of Cellulose at the Air/ Liquid Interface of a Culture of *Acetobacter xylinum***. *Journal of General Microbiology*, v. 11, n. 1, p. 123–129, 1 ago. 1954.
- STIMULATION, R.; LABAVITCH, J. M.; CHENG, K. C. **Synthesis of Cellulose by *Acetobacter xylinum* 2. Preparation of Freeze-Dried Cells Capable of Polymerizing Glucose to Cellulose**. *Journal of General Physiology*, v. 58, p. 71, 1953.
- AL-DERESAWI, T. S.; MOHAMMED, M. K.; KHUDHAIR, S. H. **Isolation, Screening, and Identification of Local Bacterial Isolates Producing Bio-Cellulose**. *Journal of Medicinal and Chemical Sciences*, v. 6, n. 3, p. 622–633, 1 mar. 2023.
- URBINA, L. *et al.* **A review of bacterial cellulose: sustainable production from agricultural waste and applications in various fields**. *Cellulose*, v. 28, n. 13, p. 8229–8253, 10 jul. 2021.
- WINSTON, Daniel, Leukes. Clive, Garcin. (2002). **Production of secondary metabolites**.
- SINGH, O.; S. PANESAR, P.; K. CHOPRA, H. **Isolation and Characterization of Cellulose Producing Bacterial Isolate from Rotten Grapes**. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*, v. 14, n. 1, p. 373–380, 25 mar. 2017.
- UPASANA, B. **Workbook for Practical Microbiology**. Edição 1/e. Jaypee, 2018. DOI 10.5005/jp/books/14206_7. Página 14. Capítulo: Coloração de Gram.
- SOUZA, Clovis Wesley Oliveira et al., de. **Preparo de lâminas fixadas e coradas: técnicas de coloração de Gram**. Ufscar, 2011. <http://hdl.handle.net/123456789/835>
- SANTOS, Sandna Larissa Freitas, Barros, Karla Bruna Nogueira Torres, Prado, Regilane Matos da Silva, Arraes, Maria Luísa Bezerra de Macedol. **Desenvolvimento de uma cartilha educativa sobre coloração de gram em microbiologia no ensino superior resumo**. v. 1, n. Saúde, 2016.
- LEE, KY *et al.* **Mais do que aparenta em celulose bacteriana: biossíntese, bioprocessamento e aplicações em compósitos de fibras avançados**. *Macromol Biosci*, [SI], v. 1, pág. 10-32, jan. 2014. DOI: 10.1002/mabi.201300298. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23897676/>. Acesso em: 08 de setembro de. 2023. PMID: 23897676.
- GARRITY, G. M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. New York: Springer, 2002. v. 2, p. 41-43.
- ULLAH, H. *et al.* **Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites**. *Carbohydrate Polymers*, v. 150, p. 330–352, 2016.

WU, Y., JIANG, S., & FU, Z. (2020). Employment of teicoplanin-coated magnetic particles for quantifying gram-positive bacteria via catalase-catalyzed hydrolysis reaction of H₂O₂. *Talanta*, 211, 120728. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2020.120728>.

CAMUSSI, M. F., Castilho, R. B., Lima, M. P., Siliano, P. R., & Laporta, M. Z. (2021). **Isolamento e identificação de bactérias em telas de celulares**. *Revista Científica UNISANTA (ISESC)*, v. 10, n. 3, p. 154–161.

GISELE, c.; coimbra, o. **produção de celulose bacteriana por gluconacetobacter xylinus e elaboração de filmes comestíveis**. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/17462/1/Tese%20Cynthia%20Coimbra%20BC.pdf>>.

BORRO, Jéssyca de Araújo. **Produção de celulose bacteriana utilizando substratos alternativos no meio de cultura**. Botucatu, 2021. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/244b0515-7bd0-463f-b74b-b746bc24658b/content>

HOMMEL, R. K. Acetobacter. In: **Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition**. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. p. 3–10.

VIEIRA, D. C. M. **Produção de biofilme (membrana de biocelulose) por Gluconacetobacter xylinus em meio de resíduos de frutas e folhas de chá verde**. Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo, 2013.

GENEROSO, Amanda Lyane. **Membrana de Celulose Bacteriana Regenerada Aplicada em Embalagens de Alimentos**. Universidade Federal de São Carlos, 2021.

OLIVER, SP; Hogan, JS; Jayarao, BM e Owens, WE 2004. **Procedimentos microbiológicos para o diagnóstico de infecção do úbere bovino e determinação da qualidade do leite**. In: Conselho Nacional de Mastite.

LABORCLIN. **Meio de rugai com lisina**. Registro ANVISA: 10097010-135. 2022. Disponível em: <<https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2023/03/170741.pdf>>.

RODRIGUES, Suelle Vencato. **Avaliação da formação de biofilme por isolados de Escherichia coli patogênica aviária e sua relação com o índice de patogenicidade in vivo**. 2017. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Orientador: Hamilton Luiz de Souza Moraes.

ZOGAJ *et al.* **Produção de celulose e fímbrias curli por membros da família Enterobacteriaceae isoladas do trato gastrointestinal humano**. 2003. P. 4151-4158, 2003. DOI: 10.1128/IAI.71.7.4151-4158.2003.

TURECK, Biassander Camila. **Efeito do Meio de Cultivo e do Tratamento de Purificação nas Propriedades Térmicas e Químicas da Celulose Bacteriana**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade da Região de Joinville

PIPERAKI, Evangelia-Theophano MD, PhD; SYROGIANNOPOULOS, George A. MD, PhD; TZOUVELEKIS, Leônidas S. MD, PhD; DAIKOS, George L. MD, PhD. **Klebsiella pneumoniae: Virulência, Biofilme e Resistência Antimicrobiana**. 2017. *Revista Pediátrica de Doenças Infecciosas*, v. 36, n. 10, pág.

BORRO, Jéssyca de Araújo. "**Produção de celulose bacteriana utilizando substratos alternativos no meio de cultura.**" (2021).

LIMA, L. R., Santos, D. B., Santos, M. V., Barud, H. S., Henrique, M. A., Pasquini, D., Pecoraro, E., & Ribeiro, S. J. L.. (2015). **Nanocristais de celulose a partir de celulose bacteriana.** *Química Nova*, 38(9), 1140–1147. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150131>.

DUARTE, Eden Batista; FEITOSA, Judith Pessoa de Andrade; ROSA, Morsyleide de Freitas; BORGES, Maria de Fátima; SOUZA FILHO, Men de Sá Moreira de. **Caracterização de celulose bacteriana obtida a partir de resíduos agroindustriais.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 20º., 04 a 08 nov. 2012, Joinville, Santa Catarina, Brasil. Anais[...] Joinville, Santa Catarina, 2012.

BILCATI, Géssica Katalyne; MARON DA COSTA, Marianne do Rocio de Mello; PAULINO, Rafaella Salvador. **Efeito do reforço multi-escala fibra de celulose-microcelulose cristalina na fase de hidratação de pastas de cimento.** Portland. Revista Matéria, 2022.

MOYINOLUWA, *et al.* (2022) **Produção de celulose bacteriana a partir de resíduos agrícolas por *Komagataeibacter* sp.** *Cepas, Bioengenharia*, 13:4, 10010-10025, DOI:[10.1080/21655979.2022.2062970](https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2062970)