

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

PRISCILLA VICENTE LOPES

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADO PRODUTOR DE NANOCELULOSE
BACTERIANA A PARTIR DE VINAGRE DE MAÇÃ**

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2023

PRISCILLA VICENTE LOPES

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADO PRODUTOR DE NANOCELULOSE
BACTERIANA A PARTIR DE VINAGRE DE MAÇÃ**

**CHARACTERIZATION OF BACTERIAL NANOCELLULOSE PRODUCING
ISOLATE FROM APPLE CIDER VINEGAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa em Ciência e Tecnologia Ambiental – PPGCTA - da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do grau de mestra em Ciência e Tecnologia Ambiental. Área de concentração: Tecnologia e processos ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite que outros distribuam, remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho, mesmo para fins comerciais, **desde que lhe atribuam o devido crédito pela criação original**

CURITIBA

2023



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do
Paraná
Campus Curitiba**



PRISCILLA VICENTE LOPES

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADO PRODUTOR DE NANOCELULOSE
BACTERIANA A PARTIR DE VINAGRE DE MAÇÃ**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Ciência E Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologias E Processos Ambientais.

Data de aprovação: 28 de Fevereiro de 2023

Dr. Gustavo Henrique Couto, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Francisco Menino Destefanis Vitola, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Rafael Mazer Etto, Doutorado - Universidade Estadual de Ponta Grossa (Uepg)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 01/03/2023

A todos os pesquisadores.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus pela saúde e conforto nos momentos de dificuldade, por me dar forças para executar este trabalho mesmo num momento tão delicado de pandemia mundial em que todos nós perdemos amigos e familiares para essa doença terrível que nos acometeu em 2020. Também gostaria de agradecer aos meus amigos e familiares que sempre foram meu porto-seguro, meu abraço apertado e meu colo. Um agradecimento especial também aos professores que fizeram parte dessa jornada e de antemão, um agradecimento aos professores doutores, Maria Giovanna Binder Pagnocelli, Francisco Menino Destéfani Vítola e Rafael M. Etto que aceitaram contribuir para este projeto, avaliando-o e agregando seus conhecimentos. Ao prof. Dr. Gustavo Henrique Couto por toda a orientação, paciência e por sempre me incentivar a não desistir. Ao Nicolas Augusto de Campos pela colaboração nas análises deste projeto. À prof. Dra. Marjorie Benegra também dedico meus agradecimentos pelas conversas e auxílios no laboratório.

Ao Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais – CMCM – e seus profissionais e alunos, os quais com muito zelo e boa vontade contribuíram neste trabalho. Ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Curitiba.

A todos os profissionais que compõem a vida universitária, em diversos cargos e a todos os pesquisadores e profissionais da saúde que estiveram na linha de frente enquanto enfrentávamos o pior da pandemia de COVID-19 deixo o meu muito obrigada e VIVA O SUS!

A toda comunidade acadêmica que resiste fazendo ciência mesmo quando muito desacreditada e até mal vista. Resistimos!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa de estudos que permitiu a realização deste projeto, código de financiamento 001.

A História está repleta de pessoas que, como resultado do medo, ou por ignorância, ou por cobiça de poder, destruíram conhecimentos de imensurável valor que, em verdade, pertenciam a todos nós. Nós não devemos deixar isso acontecer de novo.

Carl Sagan

RESUMO

Lopes, Priscilla Vicente. **Caracterização de isolado produtor de nanocelulose bacteriana a partir de vinagre de maçã.** 64p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2023.

Nanocelulose bacteriana (NCB) é um biopolímero ecologicamente correto com diversas aplicações comerciais. Este biopolímero apresenta-se como um polissacarídeo extracelular, secretado por algumas espécies de bactérias, além de algumas algas e tunicados, tem propriedades interessantes tais como biocompatibilidade, alto grau de pureza, biodegradabilidade, resistência de fibra e elevada retenção de água, podendo ser aplicada em diversos setores como área de saúde, alimentos, eletrônica, cosmética, têxtil, dentre outras. Seu uso atualmente é limitado pela capacidade de produtividade de cepas bacterianas e pelo elevado custo dos meios de cultivo. A busca por novos microrganismos com condições de crescimento menos complexas é algo importante para a adoção da NBC. Neste estudo, uma nova cepa produtora de nanocelulose foi isolada de vinagre orgânico de maçã e identificada a partir do sequenciamento de gene 16S rRNA. Os gêneros *Sphingobium* e *Sphingomonas* foram os mais representativos da análise, obtendo-se valor acima de 98% de identidade. Ao nível de espécie, *Sphingobium yanoikuyae* e *Sphingomonas paucimobilis* foram as mais representativas com 98,65% e 98,83% de identidade, respectivamente. Todas as membranas obtidas, tanto por meio de cultivo convencional e meio de cultivo alternativo foram caracterizadas por microscopia óptica. Além disso, foi realizada caracterização morfológica do consórcio de bactérias presentes no vinagre, do isolado produtor de NCB e da cepa padrão *K. hansenii*.

Palavras-chave: Biopolímero; 16S rRNA; Biocelulose; Bioprospecção.

ABSTRACT

Lopes, Priscilla Vicente. **Characterization of bacterial nanocellulose producing isolate from apple cider vinegar.** 64p. Masters dissertation. Postgraduate Program in Environmental Science and Technology. Federal Technological University of Paraná. Curitiba, 2023.

Bacterial nanocellulose (NCB) is an environmentally friendly biopolymer with several commercial applications. Its use is currently limited by the capacity to produce bacterial strains and the cost of culture media. The search for new organisms with less complex growth conditions is important for the adoption of NBC. This biopolymer presents itself as an extracellular polysaccharide, secreted by some species of bacteria, in addition to some algae and tunicates, it has interesting properties such as biocompatibility, high purity, biodegradability, fiber resistance and high-water retention, and can be applied in several sectors such as health, food, electronics, cosmetics, textiles, among others. Its use is currently limited by the productivity capacity of bacterial strains and the high cost of growing media. The search for new microorganisms with less complex growth conditions is important for the adoption of NBC. In this study, a new nanocellulose-producing strain was isolated from organic apple cider vinegar and identified by sequencing 16S rARN gene. The genera *Sphingobium* and *Sphingomonas* were the most representative of the analysis, obtaining a value above 98% of identity. At the species level, *Sphingobium yanoikuyae* and *Sphingomonas paucimobilis* were the most representative with 98.65% and 98.83% of identity, respectively. All membranes obtained, both by conventional culture and alternative culture medium were characterized by light microscopy. In addition, morphological characterization of the consortium of bacteria present in the vinegar, the isolate producing NCB and the standard strain *K. hansenii* was performed.

Key words: Biopolymer; 16S rARN; Biocellulose; Bioprospecting.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular da celulose demonstrando ligações de hidrogênio intra e intermolecular.	22
Figura 2. Coloração de Gram de <i>Sphingomonas sp.</i>	27
Figura 3. Esquema de metodologia empregada para produção de nanocelulose.....	30
Figura 4. Esquema de isolamento de BAA's à partir do vinagre de maçã	31
Figura 5. Componentes já separados para o preparo do meio H-S modificado.	34
Figura 6. Meio HS modificado autoclavado (à esq.) e apenas fervido (à dir.).	34
Figura 7. Meio de cultivo alternativo.	35
Figura 8. Preparo do inóculo	37
Figura 9. Placas multiposços com cultivo de <i>Komagataeibacter hansenii</i> em meio HS modificado.	38
Figura 10. Bandejas contendo meio HS modificado, antifúngico e o inóculo, identificadas de acordo com o método de esterilização adotado para o meio.	39
Figura 11. Preparação de esfregaço a partir de amostras coletadas com swab.	40
Figura 12. Frasco com formação de NCB em meio HS após 7 dias a 28°C sob cultivo estático a partir de inóculo com vinagre de maçã.	42
Figura 13. Plaqueamento das diluições 1.10 ⁻⁴ e 1.10 ⁻⁵ do fermentado acético em meio ágar HS.....	43
Figura 14. (A) e (B) Placas de Petri com os possíveis isolados 1 (colônia esbranquiçada) e 2 (colônia amarelada) e respectivos vials com meio HS; (C) Visualização de filme de NCB na interface ar-líquido em ambos os possíveis isolados.....	44
Figura 15. Sequências produzindo alinhamentos significativos para o primer 27F no programa BLASTN.....	46
Figura 16. Sequências produzindo alinhamentos significativos para o primer 1492R no programa BLASTN.	46
Figura 17. (A) Colônia do isolado do vinagre. (B) Colônia em destaque do isolado do vinagre.	49

Figura 18. Coloração de Gram do consórcio de microrganismos presentes no meio HS líquido tendo como inóculo o vinagre de maçã.	49
Figura 19. Coloração de Gram do isolado produtor de NCB.	50
Figura 20. Coloração de Gram de <i>K. hansenii</i>	50
Figura 21. Microscopia eletrônica de varredura de membrana de nanocelulose bacteriana obtida a partir do isolado do vinagre (A) com magnificação de 20 kx e (B) com magnificação de 10 kx.	51
Figura 22. Cultivo de nanocelulose em frascos de conserva a 28°C em estufa, a partir de <i>K. hansenii</i> e meio HS modificado.	52
Figura 23. Cultivo de nanocelulose em placas multipoços de 06 poços pós incubação de 07 dias a 28°C em meio HS modificado.	53
Figura 24. Cultivo de nanocelulose em placas multipoços de 12 poços pós incubação de 07 dias a 28°C em meio HS modificado.	53
Figura 25. (A) Membrana de celulose obtida pós cultivo de 07 dias em meio estático, à temperatura ambiente, utilizando meio HS modificado autoclavado e <i>K. hansenii</i> como microrganismo modelo. (B) Membrana de celulose obtida pós cultivo de 07 dias em meio estático.	54
Figura 26. Cultivo de nanocelulose em meio alternativo de abacaxi utilizando frasco do tipo conserva.	55
Figura 27. Processo de purificação de membranas em chapa de aquecimento.	56
Figura 28. Processo de purificação de membranas obtidas de bandejas de cultivo.	57
Figura 29. (A) Membranas provenientes de cultivo em bandejas submersas em NaOH e (B) Membranas de molho em água.	57
Figura 30. (A) Membrana de celulose purificada e (B) Membrana de celulose purificada e preparada para armazenamento refrigerado.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparativo entre propriedades físicas entre celulose vegetal e nanocelulose bacteriana.	25
Tabela 2. Composição de meios de cultivo alternativos contendo cascas de abacaxi como principal fonte de carbono com Brix mantido fixo em 3,5°	36
Tabela 3. Sequencias parciais do gene 16S rRNA do isolado produtor de NCB utilizando os primers 27F e 1492R.	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
3.1	Bactérias ácido acéticas (BAA's).....	18
3.2	Celulose.....	21
3.3	Nanocelulose bacteriana (NCB).....	23
3.4	<i>Sphingomonas sp.</i> e <i>Sphingobium sp.</i>	26
3.5	Meios de cultivo.....	27
3.6	Identificação molecular.....	28
4	METODOLOGIA.....	30
4.1	Isolamento e identificação de microrganismo a partir de vinagre comercial.....	30
4.2	Sequenciamento gene 16S rDNA.....	31
4.3	Preparo de meio de cultivo Hestrin-Shramm (HS) modificado.....	33
4.4	Preparo meio de cultivo alternativo.....	35
4.5	Preparo de inóculo do isolado do vinagre.....	36
4.6	Produção de nanocelulose a partir de <i>Komagataeibacter hansenii</i>	37
4.7	Purificação das membranas de NCB.....	39
4.8	Caracterização morfológica do isolado.....	39
4.8.1	Estudos de microscopia óptica e Coloração de Gram.....	39
4.8.2	Microscopia eletrônica de varredura.....	41
4.9	Cálculo de produção de nanocelulose.....	41
5	RESULTADOS.....	42

5.1	Triagem, isolamento e identificação de cepas produtoras de NCB a partir de vinagre de maçã.....	42
5.2	Identificação molecular da bactéria isolada	45
5.3	Caracterização morfológica do consórcio de bactérias presentes no vinagre, do isolado produtor de NCB e da cepa padrão <i>K. hansenii</i>	48
5.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da NCB produzida pelo isolado	51
5.5	Otimização da produção de NCB utilizando meio de cultivo de baixo custo	52
5.6	Produção de NCB a partir de isolado do vinagre	54
5.7	Purificação das membranas obtidas	56
6	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

O crescente interesse às questões ambientais, a instabilidade geopolítica de regiões detentoras de grandes reservas de petróleo associadas à alta do preço do barril do petróleo vem impulsionando a busca por fontes de energias renováveis como alternativas para os polímeros sintéticos. Considerada atenção tem sido dada aos biopolímeros em termos de substituição de polímeros sintéticos devido à sua alta eficiência e por serem provenientes de fontes ecologicamente amigáveis e pela degradação facilitada (VALERO-VALDIVIESO; ORTEGÓN; USCATEGUI, 2013; YANG *et al.*, 2019).

Existe uma forte preocupação pública com os resíduos plásticos, o que promove o desenvolvimento de novos materiais de base biológica. O benefício do uso biopolímeros para novos materiais se dá por conta de eles serem proveniente de fontes totalmente renováveis, e no caso de biopolímeros de origem microbiana, apresentam ainda mais vantagens por não se limitarem às condições climáticas, áreas plantadas, ou que possam causar desmatamento, já que estes são provenientes da biomassa oriunda ou produzida por microrganismos.

Assim, os biopolímeros surgem como alternativas para os polímeros sintéticos, que em grande parte são provenientes de fontes não renováveis, apresentando, em sua maioria, degradação facilitada no ambiente pela decomposição natural realizada por microrganismos, minimizando o impacto ambiental (VALERO-VALDIVIESO; ORTEGÓN; USCATEGUI, 2013; PAULO, 2014).

A madeira, oriunda dos vegetais, é um material heterogêneo constituído por tecidos formados por células com paredes celulares espessas, cujas formas e tamanhos variam de acordo com a espécie. São biocompósitos naturais compostas de celulose microfibrilar, sendo que a celulose, pectina, lignina e hemicelulose, presentes na parede celular vegetal, são responsáveis por 35-50% da biomassa das plantas (DE AMORIM *et al.*, 2020). A celulose, componente majoritário da parede celular de plantas, é utilizada pela sociedade material de engenharia há milhares de anos sendo o polímero mais abundante

na Terra. Apresenta propriedade atóxica e um dos principais candidatos como matéria-prima na produção de materiais poliméricos naturais, com potencial alternativa aos polímeros derivados de petróleo. Entretanto, mesmo que a celulose confira suas propriedades às células vegetais superiores, estas sofrem forte influência por diversos fatores como composição química e localização nas plantas. Além disso, tipos de clima e solo, defeitos microscópicos e moleculares como caroços e nódulos, nível de maturidade da planta podem afetar as propriedades das fibras (DE AMORIM *et al.*, 2020; DUFRESNE, 2013).

A nanocelulose bacteriana (NCB) é uma forma de celulose (polímero de β -D glucopiranosose) obtida através de sua biossíntese por algumas espécies de microrganismos, principalmente bactérias ácido-acéticas. A NCB possui excelentes propriedades, e quando comparada à celulose vegetal, apresenta apresenta-se na forma pura, enquanto a celulose vegetal requer pré-tratamento e separação de seus componentes, devido a presença de lignina, pectina e hemicelulose. Além disso, nanocelulose apresenta propriedades interessantes como alta resistência mecânica, biocompatibilidade, presença de uma estrutura de nanofibrilas ultrafinas e bem organizadas. É capaz de reter uma quantidade considerável de água, e possui uma estrutura tridimensional que permite combinação a outros materiais. Pode ser utilizada como material de suporte devido à sua capacidade de retenção de água e morfologia nanoestruturada, semelhante à proteína da matriz extracelular, ou seja, colágeno, tornando-a altamente compatível para imobilização e adesão celular. A NCB também pertence à categoria de produtos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) e, portanto, útil para aplicações variadas (ULLAH; SANTOS; KHAN, 2016; SHARMA; BHARDWAJ, 2019 ; DE AMORIM *et al.*, 2020; GAO *et al.*, 2020). Os processos de produção e purificação da nanocelulose são simples e as membranas podem ser moldadas em diferentes formas durante e após a biossíntese, tornando-se um biopolímero muito atraente (DE AMORIM *et al.*, 2020).

Tradicionalmente, a NCB, é produzida a partir de meios de cultivo sintéticos, o que confere um custo de produção elevado que limita suas aplicações. O uso de fontes de carbono e nutrientes de baixo custo, como resíduos da agroindústria, apresenta-se como uma estratégia interessante para tal limitação (DUARTE *et al.*, 2019).

Os meios de cultivo para produção de nanocelulose representam até 30% do custo total de produção, fato que justifica a busca por meios de cultura alternativos para o meio convencional Hestrin-Schramm. Atualmente, diversos substratos alternativos vêm sendo propostos, com o objetivo de encontrar fontes de carbono e nitrogênio mais baratas e eficientes, como resíduos agroindustriais de abacaxi, extrato de uva, romã, melão, melancia, tomate e laranja, entre outros (MACHADO *et al.*, 2018).

Em geral, a NCB pode ser produzida por algas como a *Micrasterias denticulata*, *Micrasteria rotata*, *Valonia*, *Caldophora* e *Boergesenia* ou por bactérias como *Acetobacter* (*Komagataeibacter*), *Achromabacter*, *Aerobacter* e *Agrobacterium*, sendo que um número considerado de estudos vem sendo conduzidos nas últimas décadas na produção de NCB por *Komagataeibacter xylinus* utilizando diversas fontes de carbono na composição do meio de cultivo, como glicose, sucralose, frutose, glicerol, dentre outros (YANG *et al.*, 2019).

Portanto, é de grande importância a descoberta e prospecção de novas espécies produtoras de NCB. Tal prospecção deve estar acompanhada com a otimização e diminuição dos custos associados aos processos fermentativos para a produção desse biopolímero. Nesse contexto, este trabalho visou inicialmente o isolamento de novas cepas produtoras de NCB a partir de vinagres, a identificação e caracterização da nova espécie, a caracterização da NCB produzida, e por fim, estudos preliminares visando formular um meio de cultivo de baixo custo utilizando preferencialmente resíduos de frutas ou outros.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Isolar cepas produtoras de NCB a partir de diferentes tipos de vinagre e caracterizar físico-quimicamente o filme de NCB produzido.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar cepas bacterianas que produzem NCB a partir de vinagres comerciais orgânicos ou que não passaram pelo processo de microfiltração, esterilização ou pasteurização;
- Realizar uma caracterização bioquímica e morfológica da(s) cepa(s) selecionada(s);
- Identificar por meio do sequenciamento do gene 16S rDNA e análise bioinformática, as bactérias produtoras de NCB;
- Realizar uma caracterização físico-química do filme de NCB por meio de diversas análises;
- Otimizar a produção de NCB do(s) isolado(s) com relação ao pH, fonte de C e N e % inoculação.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Bactérias ácido acéticas (BAA's)

As BAA's são microrganismos estritamente aeróbicos, Gram-negativos ou Gram-variáveis, catalase-positivos e oxidase-negativos, apresentando células elipsoidais a bastonetes que podem ocorrer isoladamente, em pares ou em cadeias. Elas também são microrganismos mesófilos cuja a temperatura ótima de crescimento está na faixa de 25 a 30°C. O pH ideal para seu crescimento é de 5,0 a 6,5, mas também podem crescer em valores de pH mais baixos (GOMES *et. al.*, 2019).

Bactérias ácido acéticas são consideradas microrganismos comuns na deterioração de vinhos devido à sua capacidade de transformar a maioria dos açúcares e álcoois nos ácidos orgânicos correspondentes (GUILLAMÓN; MAS, 2017). O grupo inclui bactérias com grande versatilidade, capazes de produzir uma grande variedade de compostos de interesse nas áreas de alimentos e bebidas, médica, química, farmacêutica, especialmente conhecidas pela produção de ácido acético na fabricação do vinagre. A origem da denominação das bactérias ácido-acéticas provém do fato destas bactérias oxidarem o álcool em ácido acético e tal capacidade metabólica deriva de uma alta capacidade de oxidação rápida de açúcares e álcool, resultando em ácidos orgânicos correspondentes, que podem se acumular facilmente no meio. Tal característica torna as BAA's um grupo de microrganismos de especial interesse para aplicações biotecnológicas como a produção de ácido ascórbico (vitamina C) ou ainda celulose (GUILLAMÓN; MAS, 2017; LA CHINA *et al.*, 2018; LYNCH *et al.*, 2019).

Os primeiros estudos acerca de bactérias ácido acéticas datam de 1884. Neste ano, um estudo publicado por Louis Pasteur sobre fermentações acéticas intitulado "*Memóire sur la Fermentation Acétique*" foi o primeiro a demonstrar que a fermentação acética era realizada por microrganismos vivos. Estes, à época, foram nomeados como *Mycoderma aceti* e formação de biofilme foi reconhecida como sinônimo de fermentação do ácido acético no vinho. Neste trabalho, foi demonstrado que a fermentação ocorria pela oxidação do álcool

etílico na presença oxigênio do ar, sendo esta ação provocada pela fermentação (ULLAH; SANTOS; KHAN, 2016; GULLO *et al.*, 2018).

Atualmente, na indústria alimentícia, as BAA's vem sendo utilizadas como protagonistas na produção de diversos alimentos e bebidas, tais como vinagre, cacau, kombucha e outras bebidas fermentadas. Todavia, sua presença deve ser controlada pois pode resultar na deterioração de outros insumos como vinhos, cervejas, bebidas doces e frutas (GUILLAMÓN; MAS, 2017).

As BAA's ocorrem naturalmente na superfície de elementos açucarados no meio ambiente, como frutas e flores. Frutas parcialmente estragadas que podem ser parcialmente fermentadas em álcoois são um excelente meio para proliferação de algumas bactérias ácido acéticas devido à sua tolerância ao etanol e à transformação em ácido acético, ambos compostos altamente restritivos ao desenvolvimento de outros microrganismos (GUILLAMÓN; MAS, 2017).

Nos dias atuais, são reconhecidos 17 gêneros de bactérias ácido acéticas: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Gluconacetobacter*, *Asaia*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasaia*, *Granulibacter*, *Tanticharoenia*, *Ameyamaea*, *Neokomagataea*, *Komagataeibacter*, *Endobacter*, *Nguyenibacter* e *Swingsia*. Os gêneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Asaia* e *Komagataeibacter* apresentam um grande número de espécies. Os demais gêneros são monotípicos, ou seja, apresentam apenas uma espécie, exceto o *Neokomagataea* que apresenta duas espécies (YAMADA, 2016).

As espécies de BAA's são bem conhecidas por terem uma alta capacidade de oxidar álcoois, aldeídos, açúcares ou álcoois de açúcar na presença de oxigênio. Como resultado dessas atividades oxidativas, os produtos de oxidação correspondentes, como ácidos carboxílicos, se acumulam no meio de cultura. Essas reações oxidativas são catalisadas por desidrogenases primárias, localizadas na superfície externa da membrana citoplasmática (GOMES *et al.*, 2018).

Para um desempenho desejável para a fermentação acética, os organismos empregados devem apresentas as seguintes características gerais: apresentar alta eficiência na conversão de substrato em produto; permitir o acúmulo de produto no meio, de forma a ter elevada concentração deste no caldo

fermentado; não produzir substâncias incompatíveis com o produto; ser constante no que diz respeito ao comportamento fisiológico; não ser patogênico; não exigir condições de processo muito complexas e meios de cultivo dispendiosos, além de permitir a rápida liberação do produto para o meio (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

A disponibilidade de oxigênio desempenha papel fundamental no crescimento e atividade das bactérias acéticas. Sua atividade metabólica e crescimento são favorecidos em meio aeróbio. O pH ótimo das BAA's está na faixa de 5,5 – 6,3, mas tais microrganismos podem sobreviver em valores de pH mais baixos, em torno de 3,0 – 4,0. A temperatura ideal para crescimento é de 25 – 30 °C, mas algumas cepas podem crescer lentamente em temperaturas em torno de 10°C e outras podem se desenvolver a temperaturas acima de 30°C (GUILLAMÓN; MAS, 2017).

As bactérias ácido-acéticas são descritas como microrganismos exigentes e difíceis de se isolar e cultivar, principalmente a partir de bebidas fermentadas. Isso ocorre devido ao fenômeno do estado viável não cultivável (EVNC), isto é, um estado de dormência adotado pelo microrganismo quando submetido a condições adversas como falta de nutrientes, estresses oxidativos e osmóticos, variação de temperatura, entre outros, que causa dificuldade de cultivar e enumerar a população de BAA's em meios de cultivo convencionais, principalmente se a cepa é proveniente de ambientes com elevados níveis de ácido acético. Nem todos os meios de cultivo suportam o crescimento das bactérias ácido-acéticas e podem ser seletivos para uma cepa ou inibidor a outra (GOMES *et al.*, 2018).

O isolamento e purificação das cepas de bactérias ácido-acéticas de mosto de vinagre é realizado através de utilização de meio líquido ou sólido que atenda às suas necessidades nutricionais. As fontes de carbono normalmente utilizadas são D-glicose e D-manitol e, em alguns casos, adiciona-se etanol e ácido acético em várias concentrações. Como fontes de nitrogênio, utiliza-se, normalmente, peptona e extrato de levedura e também utiliza-se KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 e MgSO_4 para suprir as necessidades minerais desses microrganismos (GOMES *et al.*, 2018).

Nanocelulose bacteriana é o principal biopolímero produzido pelas bactérias ácido acéticas, que são organismos conhecidos pela produção de

biofilme. A produção deste biofilme está ligada a moléculas sinalizadoras que controlam a síntese de nanocelulose e também seu desprendimento em resposta a fatores do ambiente (GULLO *et al.*, 2018).

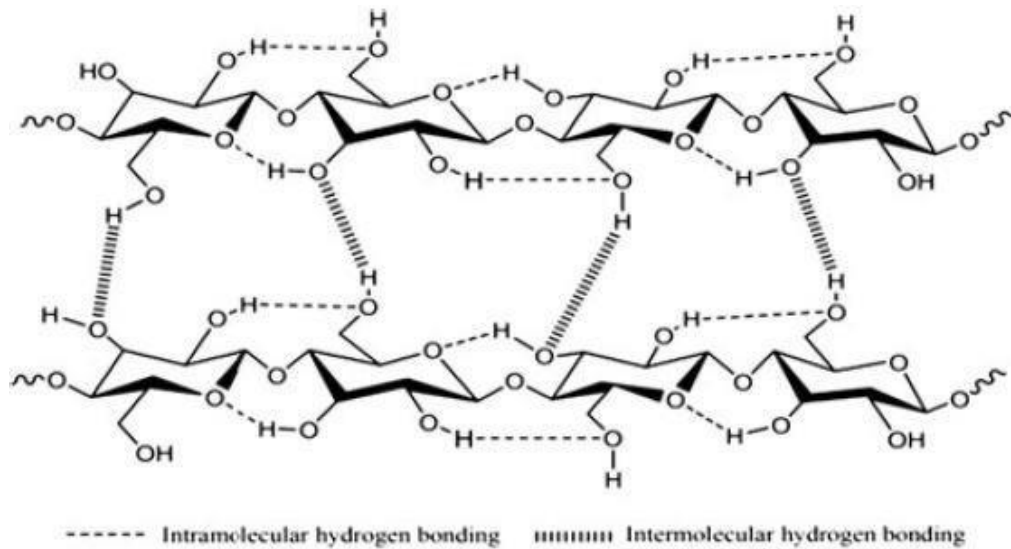
Uma série de cepas produtoras de nanocelulose já foram isoladas de diversos meios alimentícios como frutas, legumes, kombucha e também de solos. As bactérias ácido-acéticas (BAA's) são de especial interesse para aplicações biotecnológicas, dentre as quais a produção de NCB (DE AMORIM *et al.*, 2020). Cepa isolada do kombucha, por exemplo, mostra potencial para aplicações comerciais devido à sua alta estabilidade fenotípica e capacidade de produção sustentável de $7,56 \pm 0,57 \text{ gL}^{-1}$ em cultura estática e $8,31 \pm 0,79 \text{ gL}^{-1}$ em cultura sob agitação (GAO *et al.*, 2020).

3.2 Celulose

A celulose é considerada o polímero renovável natural mais abundante do planeta. É um polímero natural orgânico, de cadeia longa, composto por unidades de glicose conectadas por glicosídicas β -1,4 utilizada na elaboração de numerosos produtos industriais. Ela é encontrada como constituinte principal de paredes celulares em vegetais (MADIGAN *et al.*, 2010; FERNÁNDEZ; MORENA; VALENZUELA, 2019; LIU; ZHENG, 2021).

Como pode-se observar na Figura 1, cada unidade de glicose que compõem a estrutura da celulose possui grupos hidroxila (-OH) em C2, C3 e C6 que permitem a formação das ligações de hidrogênio entre as moléculas de celulose. Tais grupos OH desempenham papel crucial no conhecimento do empacotamento da molécula e no controle de suas propriedades físico-químicas (LIU; ZHENG, 2021).

Figura 1. Estrutura molecular da celulose demonstrando ligações de hidrogênio intra e intermolecular.



Fonte: HUANG *et al.*, 2014.

O comprimento da cadeia polimérica celulósica depende da fonte de origem. Geralmente, o número de unidades de glicose ou grau de polimerização da lignocelulose natural é tão alto quanto 10.000. Em resumo, a celulose não existe como uma única molécula na natureza, mas como uma fibra geométrica formada por múltiplas cadeias moleculares de celulose (LIU; ZHENG, 2021).

Na natureza, a celulose é um polímero estrutural que confere suas propriedades mecânicas às células vegetais superiores. A estrutura hierárquica das suas nanofibrilas naturais leva à resistência única e propriedades de alto desempenho de diferentes espécies de plantas. De fato, uma das características mais importantes da madeira e de outros materiais lignocelulósicos são suas propriedades mecânicas, em particular sua capacidade incomum de fornecer alta resistência mecânica e alta relação resistência-peso, permitindo flexibilidade para combater grandes mudanças dimensionais devido ao inchaço e encolhimento. Em todas as espécies de plantas terrestres e aquáticas, a parede celular primária é uma estrutura dinâmica e seu material constituinte deve ser sintetizado de forma que possa sofrer extensão (DUFRESNE, 2013).

Há uma demanda crescente por produtos feitos a partir de recursos não petrolíferos renováveis e sustentáveis. A fonte natural de celulose mais explorada comercialmente é a celulose vegetal, proveniente de diversas espécies de plantas como o eucalipto, para atender à demanda da indústria do papel e celulose, indústria têxtil, aplicações médicas e para utilização em agentes de reforço (HUANG *et al.*, 2014; DUFRESNE, 2013).

No entanto, em plantas, além de celulose encontra-se hemicelulose, lignina, pectina, entre outros polímeros na composição da parede celular de plantas, que em um primeiro momento não são de interesse para tais indústrias, necessitando, então, separá-las do material de interesse o que gera um custo adicional ao processo. Uma exceção a isso, quando se trata de celulose de origem vegetal, é o algodão que apresenta porcentagem de conteúdo de 90% de celulose em sua constituição (HUANG *et al.*, 2014).

A purificação de celulose de fibras vegetais envolve tratamentos químicos que consistem em extração de álcalis e branqueamento (DUFRESNE, 2013).

3.3 Nanocelulose bacteriana (NCB)

A nanocelulose pode ser obtida de várias fontes, incluindo algas, animais marinhos (tunicados) e biomassa vegetal. Para se obter nanocelulose a partir de biomassa vegetal, no caso a biomassa celulósica, como polpa de madeira, esta pode ser tratada por ultra-som forte, passada por homogeneizadores ou moedores de alta pressão para reduzir as fibras de celulose em escala micrométrica a fibrilas de nanocelulose, o que requer um investimento energético e financeiro (LEE; BISMARCK, 2016).

A capacidade de produção de NCB é difundida entre diversas espécies microbianas, porém a bactéria ácido acética *Komagataeibacter xylinus* é o produtor mais proeminente conhecido. Todavia, outras espécies de microrganismos são capazes de sintetizar membranas de nanocelulose, tais como *Komagataeibacter hansenii*, *Komagataeibacter medellinensis*, *Komagataeibacter nataicola*, *Komagataeibacter oboediens*, *Komagataeibacter rhaeticus*, *Komagataeibacter saccharivorans*, *Komagataeibacter pomaceti*,

Rhizobium sp., *Sarine sp.*, *Azotobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Achromobacter sp.*, dentre outras (SPEROTTO *et al.*, 2020; ZHANG, *et al.*, 2018).

O número de relatos de bactérias produtoras de NCB continua a crescer, sugerindo que mais e mais amplos grupos de bactérias podem ser capazes de produzir celulose (JACEK *et al.*, 2019). A Literatura atual indica um interesse particular em cepas bacterianas da espécie *Komagataeibacter hansenii*, que, devido ao alto rendimento de celulose, tornou-se um organismo modelo usado para estudos genéticos, moleculares e bioquímicos (JACEK *et al.*, 2019).

A NCB produzida pelas bactérias ácido-acéticas não difere significativamente celulose vegetal em composição, exceto pelo fato de ser pura, não estando associada a outros polímeros, apresentando diversas vantagens sobre a celulose vegetal, incluindo alta pureza, boa absorção e forte retenção de água, alta cristalinidade e resistência mecânica, biocompatibilidade e biodegradabilidade, natureza não tóxica e alta estabilidade térmica, com temperatura de decomposição entre 340 – 370 °C. Além disso, a NCB conta com uma grande área superficial que permite a interação e absorção de grandes quantidades de líquidos, fortes interações com outros polímeros e biomateriais, nanopartículas e enzimas (MADIGAN *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2019).

Dentre as vantagens da NCB em detrimento à celulose vegetal também pode-se destacar a ausência de processos adicionais de tratamento para sua utilização. Para a purificação de membranas de nanocelulose bacteriana utiliza-se apenas hidróxido de sódio (NaOH) 0,3M à quente ou, num outro processo, 1% do surfactante alquilbenzeno linear sulfonato de sódio (LAS), enquanto a purificação da celulose vegetal requer processos químicos intensos, com considerável gasto energético e potencial poluidor (PIELAK, 2018; PETERSOHN JR., 2019).

Um comparativo entre a nanocelulose bacteriana e a celulose de origem vegetal é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Comparativo entre propriedades físicas entre celulose vegetal e nanocelulose bacteriana.

Característica	Celulose Vegetal	Nanocelulose bacteriana (NCB)
Grau de pureza (%)	60-70%	100%
Retenção de água (%)	60%	98,5%
Grau de cristalinidade (%)	50-65%	90%
Grau de polimerização	3.000 -15.000	8.000
Produtividade	80 ton./ 7 anos (1 hectare)	79,2 ton. /22 dias (500mil litros)

Fonte: Adaptado de Yang *et al.*, 2019.

A NCB pode ser aplicada em diversos setores, como área ambiental, biomédica e farmacológica, ótica, indústria cosmética como máscaras cosméticas para a pele, no setor têxtil, dentre outros. No âmbito alimentício pode ser utilizada como agente espessante, estabilizador de alimentos. Principalmente no sudeste asiático, a nanocelulose bacteriana é utilizada como fibra dietética em bebidas como a “nata de coco”. No campo biomédico, a NCB é amplamente estudada como matéria-prima altamente biocompatível para cicatrização de feridas, vasos sanguíneos artificiais e engenharia de tecidos (RAJWADE *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2017; AZEREDO *et al.*, 2019; GAO; SUN; HAN, 2020).

As propriedades e as potenciais aplicações da celulose bacteriana como membrana dependem em grande parte das propriedades da superfície. Petersohn (2019) em seu trabalho imobilizou papaína empregando dois métodos - adsorção e reticulação - em membranas de nanocelulose cultivadas a partir de *Gluconacetobacter sp.* visando avaliar o biopolímero quanto a atividade proteolítica sob diferentes condições reacionais e seu reuso. Os resultados obtidos por ele mostraram que é possível agregar características novas tanto para a enzima quanto para a nanocelulose em si, com possibilidade de aplicação como curativos com ação desbridante. Lopes e colaboradores (2022) avaliaram atividade antimicrobiana de biocompósito formado por membranas de

nanocelulose associadas a nanopartículas de dióxido de titânio em testes com presença e ausência de UV-A, observando inibição de crescimento microbiano (*E. coli*) de 98,5% na presença de UV-A e inibição de 68,0% na ausência de UV-A, indicando potencial utilização deste biocompósito na criação de novos materiais e superfícies com propriedades antimicrobianas.

O benefício ecológico da produção de nanocelulose para a bactéria acética não é totalmente claro, entretanto, tal produção cria uma barreira na interface líquido-ar, com a membrana flutuando na superfície líquida, principalmente em culturas estáticas, permitindo que as bactérias acessem tanto os nutrientes presentes no meio de cultivo quanto níveis suficientes de oxigênio no ar, necessários para seu metabolismo oxidativo (LYNCH *et al.*, 2019).

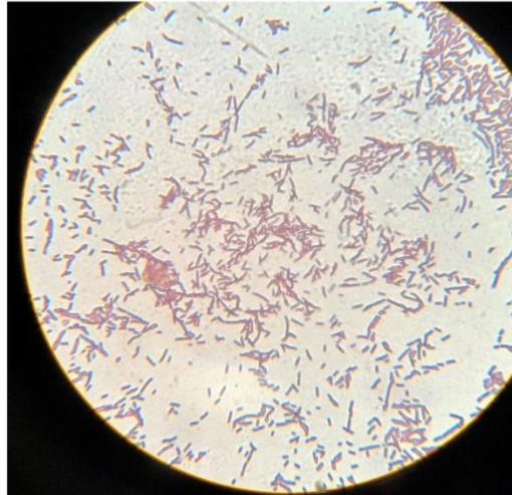
3.4 *Sphingomonas sp.* e *Sphingobium sp.*

A bactéria *Sphingomonas*, pertence à classe *Alphaproteobacteria*, filo *Proteobacteria*, ordem *Sphingomonadales* e foi descrita pela primeira vez em 1990 por Yabuuchi e colaboradores como uma bactéria gram-negativa estritamente aeróbia, de pigmentação amarela, quimio-heterotrófica em forma de bastonete. Por sequenciamento de gene 16S rRNA, Takeuchi e posteriores análises filogenéticas, quimiotaxonômicas e fisiológicas para dividir o gênero em quatro subgêneros: *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium* e *Sphingopyxis* (MITRA *et al.*, 2020).

As células de *Sphingobium sp.* são gram-negativas, medem 0,3-0,7 x 1-3,5µm. Já as células de *Sphingomonas sp.* medem cerca de 0,5-0,6x1,6-2,0 µm, que podem ser visualizadas dentro de 2 a 4 dias em cultivo em meio ágar nutriente a 30°C. Observa-se crescimento em temperaturas entre 15-35°C, sendo 30°C a temperatura ótima para este microrganismo. Este microrganismo acumula grânulos de polihidroxialcanoato na forma de poli-β-hidroxibutirato a partir de glicose e acetato. Positiva para catalase e nitrato redutase. Negativa para oxidase, urease e arginina dihidrogenase (LIANG; LLOYD-JONES, 2010).

Na Figura 2 é possível visualizar, sob uma lente de imersão de óleo de microscópio de campo claro, coloração de Gram de células de *Sphingomonas sp.* em placa média de LB-ágar.

Figura 2. Coloração de Gram de *Sphingomonas sp.*



Fonte: MITRA *et al.*; 2020.

3.5 Meios de cultivo

Meio de cultivo ou meio de cultura são substratos líquidos ou sólidos, previamente esterilizados, que fornecem os nutrientes e todos os elementos imprescindíveis para o crescimento de microrganismos, células e pequenas plantas (SPEROTTO *et. al*, 2020).

Os diversos meios de cultivo podem ser classificados em dois subtipos de acordo com sua composição: complexos (quando sua composição não é quimicamente precisa, como peptona e extrato de levedura) e sintéticos (quando apresentam quantidade exata e conhecida de componentes). Os meios de cultivo comumente utilizados para a produção de nanocelulose por *Komagataeibacter sp.*, principal espécie produtora de NCB, são nutricionalmente ricos e contém peptona e/ou extrato de levedura em sua composição (SPEROTTO *et. al*, 2020; VIEIRA, 2013).

O meio de cultivo ideal para produção de nanocelulose bacteriana deve conter, pelo menos, uma fonte de carbono e uma de nitrogênio, além de outros nutrientes que viabilizam o crescimento microbiano (JOZALA *et al.*, 2016).

Um dos meios amplamente utilizados para cultivo de *K. hansenii*, denominado meio Hestrim-Shramm (HS) apresenta composição glucose 2% (p/v), peptona 0,5 %, extrato de levedura 0,5 %, fosfato dissódico, 0,27% e ácido cítrico 0,115%, com pH ajustado para 4,0-5,0 com ácido acético 0,1 M. Entretanto, pode-se utilizar glicerol em substituição à glucose como fonte de carbono devido ao glicerol ser um subproduto da indústria em contínua ascensão do biodiesel (cerca de 10% da produção). À medida que a produção do biodiesel cresceu, a produção do glicerol aumentou e, conseqüentemente, seu custo abaixou, tornando, assim, o glicerol uma fonte de carbono interessante para os meios de cultivo. Além disso, o glicerol pode inibir alguns processos biológicos, sendo importante na inibição de crescimento de microrganismos indesejáveis no meio (HESTRIN; SCHRAMM, 1954; YANG, *et al.*, 2019).

Um número expressivo de estudos tem sido realizado nas últimas décadas na produção de NCB por *Komagataeibacter* sp. utilizando várias fontes de carbono como glucose, sacarose, frutose, glicerol, dentre outros (YANG *et al.*, 2019).

Assumindo os elevados custos de produção da NBC são principalmente relacionados aos meios de cultivo caros, que podem chegar a até 30% do custo total de produção, faz-se necessário o uso de meios de cultivo alternativos (MACHADO *et al.*, 2017).

3.6 Identificação molecular

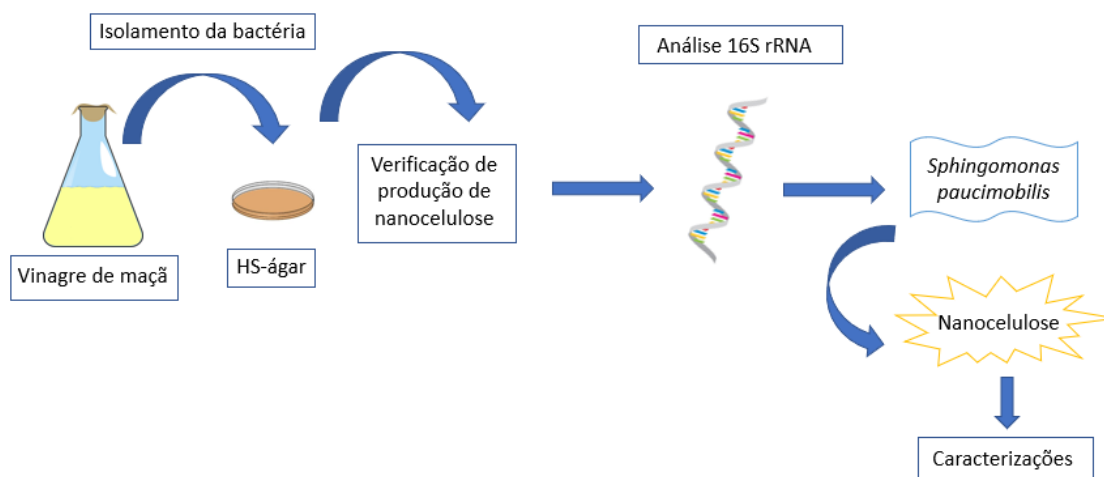
Os métodos tradicionalmente utilizados para a classificação de espécies de BAA's são baseados na morfologia celular, flagelação e algumas propriedades fisiológicas e bioquímicas. Entretanto, é muito difícil identificar corretamente as bactérias ácido-acéticas apenas pelas características bioquímicas e fisiológicas. Como exemplo de método, pode-se citar a produção de um pigmento marrom solúvel em água, produção de celulose, capacidade de oxidação de açúcares e etanol em meio ácido, além da capacidade de oxidar lactato e ácido acético em gás carbônico e água (GOMES *et al.*, 2018).

Para a correta identificação das BAA's é recomendada a análise molecular das cepas em comparação a cepas de referência. Uma vasta quantidade de metodologias baseadas em técnicas moleculares de extração de DNA e identificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizadas para identificação dos gêneros, espécies e cepas destas bactérias. Como principais métodos pode-se citar: perfil de plasmídeo, amplificação por PCR e sequenciamento de uma região específica do gene 16S rRNA, reação em cadeia de polimerase de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD-PCR), poliformismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) do gene amplificado por PCR Gene 16S rRNA e região espaçadora inteligêntica de rRNA 16S-23S, polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) do gene 16S rRNA parcial amplificado por PCR, PCR palindrômico extragênico repetitivo (REP-PCR), hibridização DNA-DNA, análise de restrição de DNA ribossômico, intergênico repetitivo enterobacteriano PCR de sequência de consenso (ERIC-PCR), sendo as principais diferenças entre esses métodos o tempo de análise, a instrumentação necessária e os níveis de capacidade de discriminação (GOMES *et al.*, 2018).

4 METODOLOGIA

Um esquema da metodologia empregada neste trabalho pode ser visualizado na Figura 3. Em primeiro momento, foi realizado o isolamento do microrganismo presente em vinagre de maçã orgânico comercial, seguido da sua identificação via sequenciamento do gene 16S rRNA. Após a identificação da bactéria, iniciou-se a produção de nanocelulose e as caracterizações do biopolímero produzido.

Figura 3. Esquema de metodologia empregada para produção de nanocelulose.



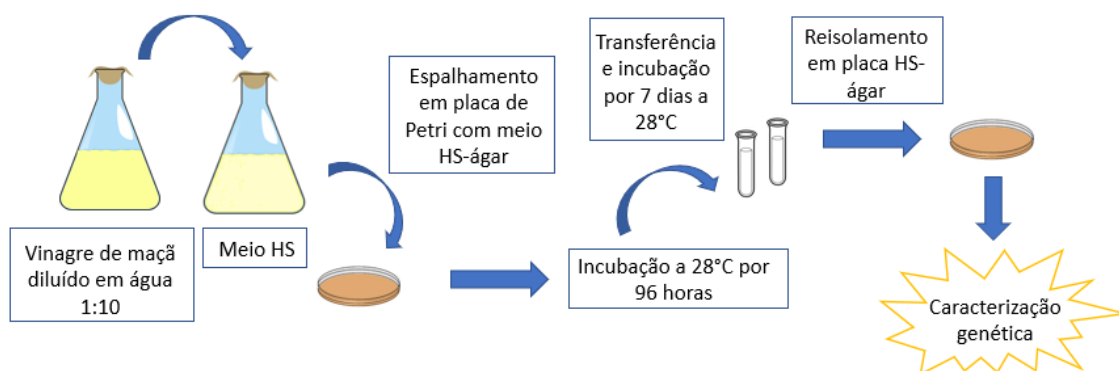
Fonte: Os autores.

4.1 Isolamento e identificação de microrganismo a partir de vinagre comercial

Para o isolamento de BAA's, Vinagre de maçã comercial foi diluído em água esterilizada (1:10) e 100µL adicionados por espalhamento na superfície de placa de Petri contendo meio Hestrin-Shramm (HS) em ágar para crescimento microbiológico e acondicionado em estufa a 28°C por 96 horas (Figura 4). O meio para isolamento possui a seguinte composição glucose 2% (p/v), peptona 0,5 %, extrato de levedura 0,5 %, fosfato dissódico, 0,27% e ácido cítrico 0,115%, ágar bacteriológico 1,5%, tendo o pH ajustado para 4,0 com ácido acético concentrado (HESTRIN; SCHRAMM, 1954)

Após incubação, as colônias observadas foram transferidas para tubos de ensaio separados contendo meio HS e incubadas em estufa por 7 dias a 28°C para observar se haveria formação de uma película de celulose na interface ar-líquido. As que formaram a película, foram novamente isoladas em placas de Petri contendo HS ágar, tiveram a sua atividade reconfirmada para a produção de NCB e foram identificadas por sequenciamento do gene 16S rDNA, caracterizações bioquímicas e morfológicas.

Figura 4. Esquema de isolamento de BAA's à partir do vinagre de maçã



Fonte: Os autores.

4.2 Sequenciamento gene 16S rDNA

A cepa selecionada foi submetida ao sequenciamento do gene 16S rDNA para identificação. Para a realização da etapa de sequenciamento o protocolo de extração de DNA genômico utilizado foi adaptado do proposto por ASAF *et al.*, 2020).

- A amostra foi centrifugada durante 10 minutos a 1.200 g e o sobrenadante foi removido.
- O sobrenadante foi ressuspensionado com 2 mL de solução salina (NaCl 0,9%), transferido para um tubo estéril e novamente centrifugado durante 5 minutos a 10.000 g.

- O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 500 μL de NaCl 0,9% e 27,5 μL de SDS 20% m/v (dodecil sulfato de sódio), seguido de incubação à temperatura ambiente.
- Na sequência, 250 μL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1; Sigma Aldrich) foram adicionados. Após a homogeneização por inversão, a solução foi levada para a centrifugação durante 10 minutos a 12.000 g.
- Ao sobrenadante foram adicionados 250 μL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1; Sigma Aldrich), novamente homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 12.000 g.
- Ao sobrenadante adicionou-se etanol absoluto (3:1 v/v). A mistura foi levada à centrifugação durante 20 minutos a 12.000 g, para que houvesse a precipitação do DNA.
- Os pellets obtidos passaram por lavagem com etanol 80%, foram secos e ressuspendidos em água ultrapura. A concentração do DNA isolado foi determinado através do uso do espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA).

Seguindo a metodologia proposta por Lane *et. al* (1985), a região 16S do rRNA foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização dos *primers* 27F e o 1492R em um Termociclador Veriti (Applied Biosystems, Paisley, UK). Com um volume final de 25 μL composto por:

- 2 μL de DNA (50 ng. μL^{-1});
- 0,55 μL dNTPs (10 mM);
- 0,75 μL MgCl_2 (50 mM);
- 2,5 μL de tampão (10x);
- 0,5 μL do primer 27F (10 μM);
- 0,5 μL do primer 1492R (10 μM);
- 0,2 μL de DNA polimerase (5U . μL^{-1});
- 18 μL de água.

As sequências amplificadas foram geradas nas seguintes condições:

- Ativação da enzima polimerase: 94 °C por 5 minutos;

- Desnaturação do DNA: 35 ciclos a 94 °C por 15 segundos;
- Anelamento dos *primers*: 55 °C por 45 segundos;
- Extensão dos nucleotídeos: 72 °C por 1,5 minutos;
- Extensão final: 72 °C por 06 minutos.

Os produtos obtidos pela reação PCR foram submetidos à eletroforese no analisador de DNA ABI 3730xl (Applied Biosystems, Paisley, Reino Unido). Os cromatogramas obtidos foram analisados usando o BioEdit 7.0.5.3.

As sequências de DNA do gene que codifica o rDNA 16S do isolado do vinagre foram submetidas à análise bioinformáticas do algoritmo BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), utilizado para comparar informações de sequências biológicas primárias, neste caso Blastn, que utiliza um banco de sequências de nucleotídeos.

4.3 Preparo de meio de cultivo Hestrin-Shramm (HS) modificado

O meio de cultura utilizado foi o meio HS com modificações, no qual a principal fonte de carbono, a glucose (2% p/v), foi substituída por glicerol (2% p/v) resultando num meio com a seguinte composição: glicerol 2% (p/v), peptona 0,5 %, extrato de levedura 0,5 %, fosfato dissódico, 0,27% e ácido cítrico 0,115%, com pH ajustado para 4,0 com ácido acético concentrado (HESTRIN; SCHRAMM, 1954) e água do abastecimento público foi utilizada para o preparo (Figura 5).

Figura 5. Componentes já separados para o preparo do meio H-S modificado.



Fonte: Os autores.

O meio de cultivo, ponteiros, frascos e demais materiais que foram devidamente autoclavados a 121°C e a pressão de 1,1 kgf por 15 minutos. Paralelamente, testou-se a utilização de meio de cultivo, de mesma composição e pH, apenas fervido, sem passar pelo processo de autoclavagem (Figura 6).

Figura 6. Meio HS modificado autoclavado (à esq.) e apenas fervido (à dir.).



Fonte: Os autores.

4.4 Preparo meio de cultivo alternativo

Como meio alternativo, utilizou-se cascas de abacaxi (BRIX ~3.5), sulfato de amônio ($0,6 \text{ gL}^{-1}$), sulfato de magnésio heptahidratado ($0,20 \text{ gL}^{-1}$), extrato de levedura ($2,5 \text{ gL}^{-1}$).

Para tanto, as cascas do abacaxi (*Ananas comosus L. Merrill*) foram processadas em água com auxílio de um liquidificador doméstico e coadas em peneira. A proporção cascas/água foi controlada visando grau superior a $3,0 \text{ }^\circ\text{Bx}$, que equivalem a 30 gL^{-1} de açúcares na solução. Os demais componentes do meio foram adicionados e o meio foi autoclavado a 121°C , $1,1 \text{ kgf}$ por 15 minutos (Figura 7).

Figura 7. Meio de cultivo alternativo.



Fonte: Os autores.

Diferentes concentrações de cada componente do meio alternativo abacaxi serão testadas com objetivo de minimizar gastos e obter a melhor composição para melhor rendimento de produção de nanocelulose conforme demonstrado na Tabela 2. A concentração de açúcar, BRIX, foi mantida

constante devido a testes que indicaram que a concentração mínima para crescimento era de 30gL⁻¹.

Tabela 2. Composição de meios de cultivo alternativos contendo cascas de abacaxi como principal fonte de carbono com Brix mantido fixo em 3,5°

Meio	(NH ₄) ₂ SO ₄ / gL ⁻¹	MgSO ₄ . 7H ₂ O / gL ⁻¹	Extrato de levedura / gL ⁻¹
AbcxI	0,6	0,2	2,5
AbcxII	0,4	0,2	2,5
AbcxIII	0,4	0,1	2,5
AbcxIV	0,4	0,1	1,5
AbcxV	0,6	0,1	1,5

Fonte: Os autores.

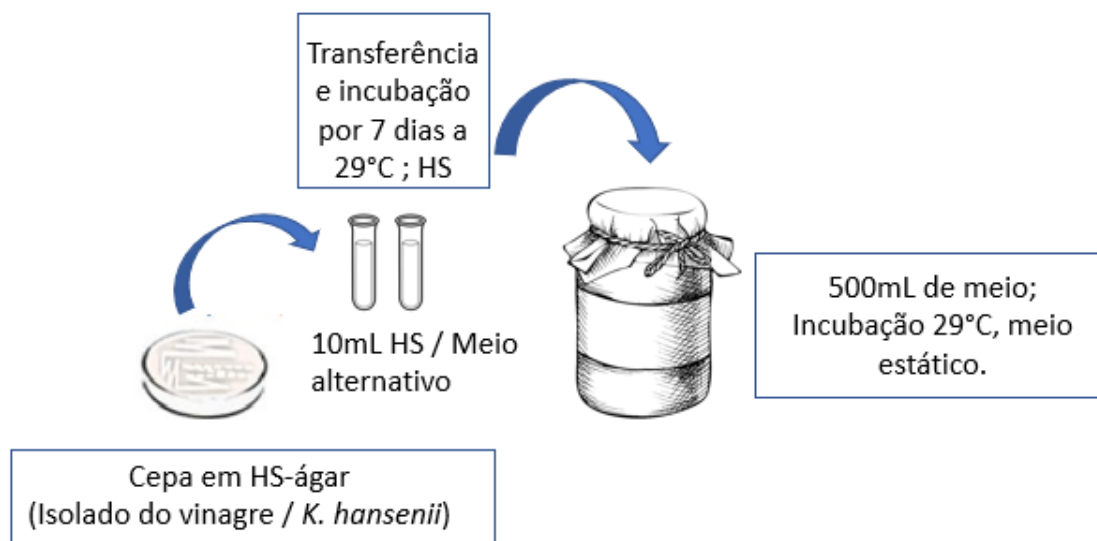
4.5 Preparo de inóculo do isolado do vinagre

O inóculo foi preparado pela transferência de células bacterianas do isolado para meio de cultivo Hestrin-Schramm (HS) com modificações previamente autoclavado, no qual a principal fonte de carbono, a glucose (2% p/v), é substituída pelo glicerol (2% p/v) resultando num meio com a seguinte composição: glicerol 2% (p/v), peptona 0,5 %, extrato de levedura 0,5 %, fosfato dissódico, 0,27% e ácido cítrico 0,115%, com pH ajustado para 4,0 com ácido acético 0,1 M.

Em primeiro momento, as células foram acondicionadas em tubos de ensaio com tampas parcialmente fechadas, contendo 10 mL do meio de cultura, em meio estático, por aproximadamente 7 dias, a 29°C em estufa.

Após o prazo, transferiu-se o meio de cultivo com as membranas formadas para frascos maiores autoclavados com aproximadamente 500 mL de meio de cultura, com a abertura protegida por um tampão, mantidos em estufa em meio estático a 29°C por 7 dias conforme demonstrado na Figura 8 (HESTRIN; SCHRAMM, 1954; FERNÁNDEZ, J.; MORENA, A. G.; VALENZUELA, 2019).

Figura 8. Preparo do inóculo



Fonte: Os autores.

O procedimento para adaptação da cepa ao meio de cultivo alternativo é feito da mesma maneira, apenas alterando o meio de cultura.

A metodologia foi realizada para o preparo de inóculo e obtenção de membranas a partir do microrganismo de referência *K. hansenii* em meio HS-glicerol, *K. hansenii* em meio alternativo abacaxi, *Sphingomonas paucimobilis* em meio HS-glicerol, *Sphingomonas paucimobilis* em meio alternativo abacaxi.

Frascos tipo conserva são utilizados para manutenção e/ou produção enquanto as placas multipoços e as bandejas são utilizadas exclusivamente para produção das membranas de nanocelulose.

Na manutenção, quando o nível de meio de cultivo no frasco diminui, adiciona-se mais meio de cultivo previamente esterilizado e à temperatura ambiente aos frascos. Além disso, as membranas depositadas ao fundo dos frascos são retiradas com auxílio de pinça estéril.

4.6 Produção de nanocelulose a partir de *Komagataeibacter hansenii*.

Filmes de NCB foram produzidos por fermentação estática em placas de cultivo de células com 6 poços (volume final de 10 mL) e 12 poços (6,3mL) utilizando a bactéria *Komagataeibacter hansenii* em meio HS (Hestrin-Shramm) com modificações (Figura 9). Para tanto, retirou-se o equivalente a

10% (v/v) de meio de cultivo do inóculo contendo as células dos microrganismos e adicionou-se ao novo meio previamente esterilizado, agitando vigorosamente para homogeneização.

O conteúdo foi transferido para placas multipoços (06 e 12 poços), higienizadas com etanol 70%, próximo ao bico de Bunsen.

As placas foram mantidas em meio estático, em estufa a 29°C por 08 dias e os filmes de NCB obtidos separados para purificação.

Figura 9. Placas multipoços com cultivo de *Komagataeibacter hansenii* em meio HS modificado.



Fonte: Os autores.

Para a produção de celulose em bandejas após preparo de meio conforme item 4.3, todo o conteúdo do inóculo foi adicionado ao meio de cultivo necessário para as bandejas (4L). Adicionou-se 100 µL de antifúngico Nistatina a cada 400 mL de meio do inóculo para evitar a contaminação por leveduras e bolores e, então, misturou-se ao frasco com volume total de meio de cultivo previamente preparado. A seguir, verteu-se o conteúdo em bandeja de polietileno de alta densidade com dimensões internas de (365 x 565 x 62) mm (larg x comp x alt) previamente higienizada com etanol 70%. Ao finalizar a transferência, cobriu-se rapidamente a bandeja com a próxima bandeja a ser utilizada, formando uma pilha de bandejas identificadas para cultivo, porém com pequena abertura para manter o meio aeróbico (Figura 10).

As bandejas foram mantidas sobrepostas à temperatura ambiente e em meio estático por 7 dias.

Figura 10. Bandejas contendo meio HS modificado, antifúngico e o inóculo, identificadas de acordo com o método de esterilização adotado para o meio.



Fonte: Os autores.

4.7 Purificação das membranas de NCB

As membranas de CB obtidas foram purificadas (remoção de células, meio de cultivo) em primeiro momento por meio de lavagem em água corrente, seguida por lavagem com uma solução de NaOH 0,3 M a 121°C por 15 minutos.

Procedeu-se com lavagem abundante em água deionizada até neutralização do pH da água de lavagem conforme metodologia adaptada de Khan e colaboradores (2015).

4.8 Caracterização morfológica do isolado

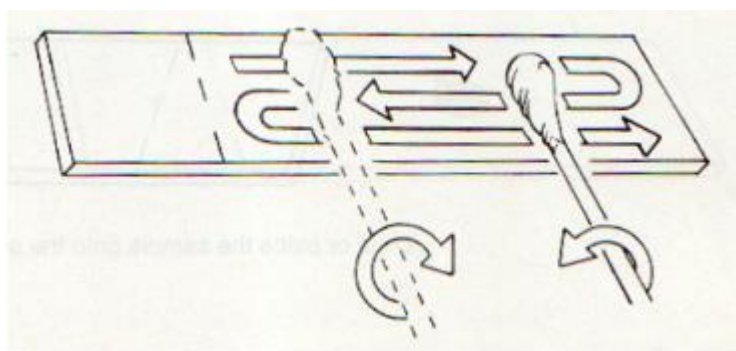
Para a caracterização morfológica do isolado do vinagre, utilizou-se de microscopia eletrônica de varredura.

4.8.1 Estudos de microscopia óptica e Coloração de Gram

Foi realizado o preparo de lâminas a partir do microrganismo isolado em placa de Petri. Para tanto, fez-se a técnica de esfregaço com *swab* para fixação em lâminas limpas e desengorduradas, previamente hidratada, conforme demonstrado na Figura 11 a fim de depositar uma fina camada do material.

Foram preparadas lâminas do consórcio de microrganismos isolados do vinagre, *K. hansenii* já conhecido como produtor de nanocelulose e *Sphingomonas paucimobilis* já isolada.

Figura 11. Preparação de esfregaço a partir de amostras coletadas com swab.



Fonte: MAHON; MANUSELIS, 1995.

O material foi espalhado até que se observasse uma fina camada do material sobre a lâmina, bem uniforme. O excesso de água foi evaporado próximo a uma chama de bico de Bunsen. A lâmina foi coberta com cristal violeta e após cerca de 1 minuto, quando estivesse seca, a lâmina foi lavada em água corrente e coberta com lugol, deixando-o agir por 1 minuto.

A lâmina foi lavada em água corrente e adicionado álcool 99,5°GL por 30 segundos. Posteriormente, a lâmina foi lavada outra vez em água corrente e coberta com corante Safranina por 30 segundos. Novamente a lâmina foi lavada em água corrente e deixada secar em temperatura ambiente. Uma gota de óleo de imersão foi adicionada à cada lâmina para observação em microscópio.

As lâminas obtidas foram observadas em microscópio óptico binocular (Olympus BX51TRF) no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

4.8.2 Microscopia eletrônica de varredura

Para análise por MEV, as amostras foram liofilizadas e posteriormente metalizadas com ouro para aumentar a condutividade do material e, então, analisadas em microscópio eletrônico, modelo Carl Zeiss- EVO MA15 no Centro Multiusuários de Caracterização de Materiais (CMCM), localizado na UTFPR sede Curitiba.

As micrografias obtidas em aumento 10.000x na análise foram utilizadas como ferramenta de caracterização da morfologia das membranas obtidas.

4.9 Cálculo de produção de nanocelulose

A produção de nanocelulose foi calculada de acordo com a Equação 1 (HO JIN *et al.*, 2019).

$$\textit{Produção nanocelulose (gL}^{-1}\text{)} = \frac{\textit{Massa da membrana NCB (g)}}{\textit{Volume de meio de cultivo (L)}} \quad (1)$$

5 RESULTADOS

5.1 Triagem, isolamento e identificação de cepas produtoras de NCB a partir de vinagre de maçã

Frutas em decomposição, superfície de vegetais e vinagres são frequentemente utilizados como ponto de partida para o isolamento de bactérias que sintetizam e secretam NCB. Desta forma, frascos contendo meio HS contendo nistatina foram inoculados com uma amostra de vinagres de diversas procedências (maçã, uva, balsâmico, álcool) visando a visualização, após 7-10 dias de incubação estática, de um filme gelatinoso (NCB) na superfície do meio inoculado. Foi dada preferência a vinagres que não passaram pelos processo de microfiltração, esterilização ou pasteurização com o objetivo de manter a microbiota original. Um dos frascos, inoculados com vinagre de maçã orgânico comercial, após incubação a 28°C apresentou crescimento de um biofilme branco uniforme e proeminente conforme mostrado na Figura 12.

Figura 12. Frasco com formação de NCB em meio HS após 7 dias a 28°C sob cultivo estático a partir de inóculo com vinagre de maçã.



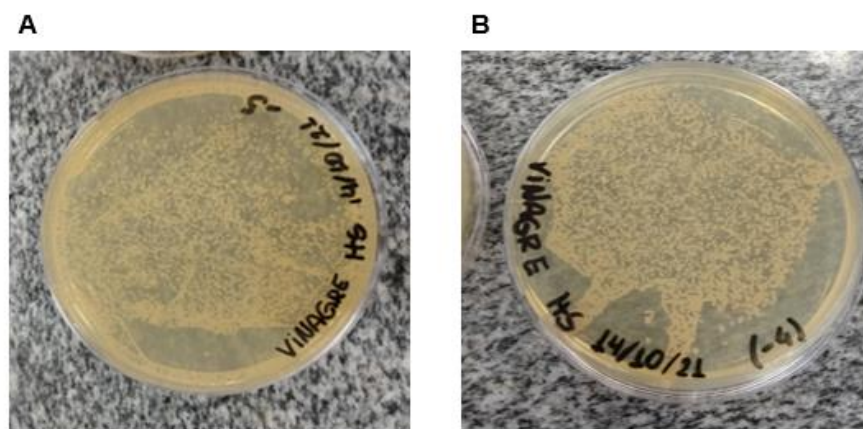
Fonte: Os autores.

Vinagres com certificação orgânica possuem a característica de não passarem pelo processo de esterilização ao final da fermentação acética.

Além disso, utilizam matérias primas não processadas, sem aditivos ou conservantes químicos, o que provavelmente pode ter preservado a microbiota original presente nos frutos e ambiente.

Posteriormente, foi realizada uma diluição seriada do líquido fermentado acético (positivo para a produção de NCB), seguido por plaqueamento por espalhamento em meio HS ágar. Após 5-7 dias de incubação das placas de Petri, foi observado a formação de colônias isoladas na superfície do meio (Figura 12).

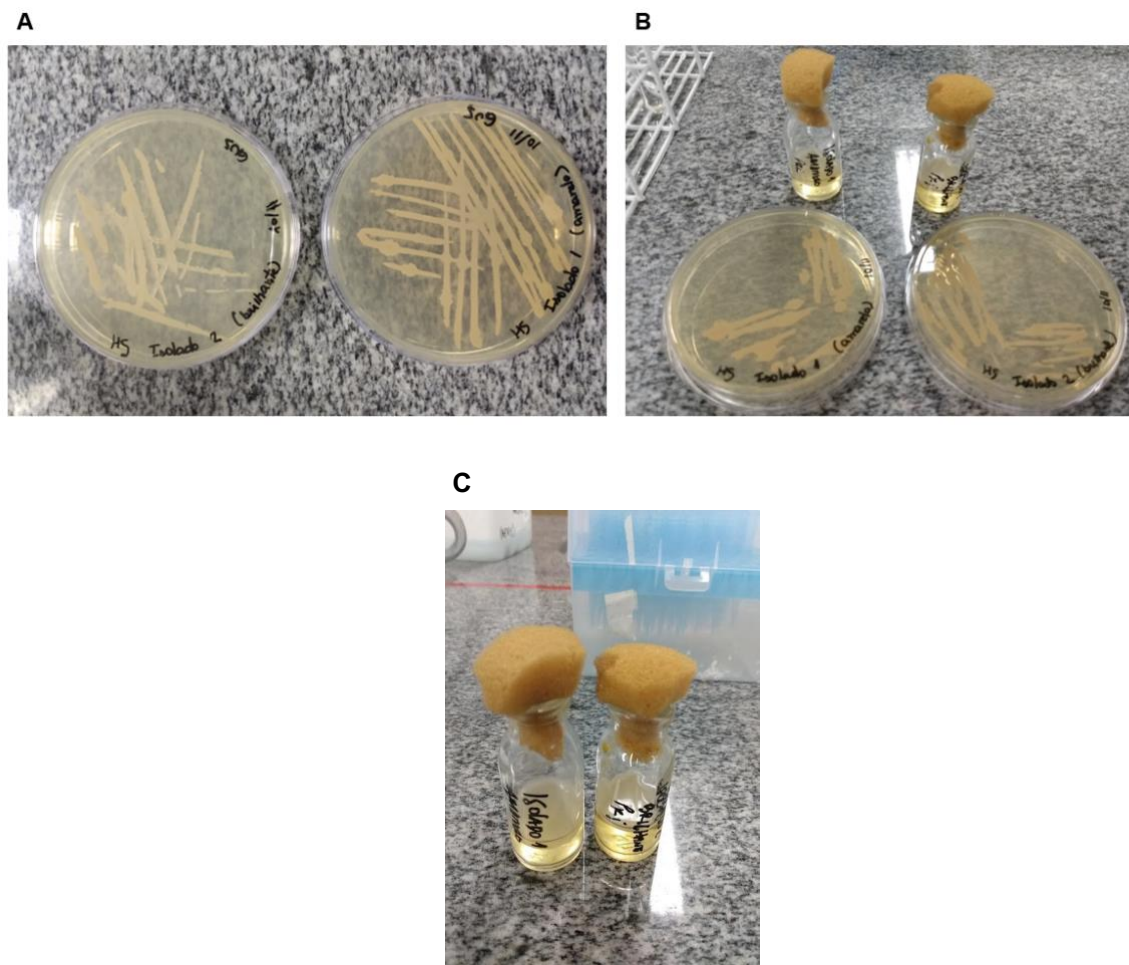
Figura 13. Plaqueamento das diluições 1.10⁻⁴ e 1.10⁻⁵ do fermentado acético em meio ágar HS.



Fonte: Os autores.

Inicialmente, foi observado a presença de dois isolados de cor discretamente diferente (um amarelo e outro esbranquiçado), o que poderia indicar a presença duas espécies possivelmente produtoras de NCB. Os dois isolados passaram então por um novo isolamento pela técnica de esgotamento em meio HS ágar, e paralelamente cada isolado foi inoculado em vial com meio líquido HS para verificar se a formação do filme estava associada a um ou ambos os isolados (Figura 14).

Figura 14. (A) e (B) Placas de Petri com os possíveis isolados 1 (colônia esbranquiçada) e 2 (colônia amarelada) e respectivos vials com meio HS; **(C)** Visualização de filme de NCB na interface ar-líquido em ambos os possíveis isolados.



Fonte: Os autores.

Observou-se a formação dos filmes de NCB na interface ar-líquido em ambos isolados contidos nos vials com meio líquido HS. Posteriormente, foi verificado que o isolado 1 (colônia mais esbranquiçada) com o tempo passou a apresentar também uma coloração amarelada na placa de Petri com meio sólido, se igualando visualmente e morfológicamente ao isolado 2, o que provavelmente representou a mesma colônia isolada que produziu a NCB. Análises posteriores de microscopia óptica (item 5.3), também indicaram essa possibilidade: que o isolado indicava se tratar de uma bactéria ácido-acética produtora de NCB.

5.2 Identificação molecular da bactéria isolada

Para a identificação molecular do isolado, após o a extração e purificação do DNA, este foi submetido a amplificação parcial do gene 16S rRNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando primers específicos. Os amplicons resultantes foram submetidos a reação de sequenciamento cujas as sequências parciais mostradas na Tabela 3 abaixo:

Tabela 3. Sequencias parciais do gene 16S rRNA do isolado produtor de NCB utilizando os primers 27F e 1492R.

Primer 27F	GACTTCTGGGGTTTATTATACGTGCGGTGCAACGAGATCTTCGGATCTAGTGGCGCAC GGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTTGGGTTTCGGAATAACTTCTGGAAACGGAA GCTAATACCGGATGATGACGTAAGTCCAAAGATTTATCGCCCAAGGATGAGCCCGCGT AGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCTTAGCTGGTCTG AGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAG CAGTAGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGA TGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTACCCGGGATGATAATGACAGTACCGGGAG AATAAGCTCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGAGCTAGCGTT GTTCCGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAAGCGCGCTATTCAAGTCAGAGGTGAAAG CCCGGGGCTCAACCCCGGAAGTGCCTTTGAAACTAGATAGCTTGAATCCAGGAGAGGTG AGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGA AGGCGGCTCACTGGACTGGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGATAACTAGCTGTCAGGGCACATGGT GTTTTGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTATCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCTGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG CAACGCGCAGACCTTACCAACGTTTGACATCCTATCGCGATCGTGGAGACACTTTCATCAG TTCGCTGGATAGTGACAGGGGTGCCCTGCATGGGCCGTGTCTCG
Primer 1492R	AGGGGACCTCTGTGGTTCGCCTGCCTCCTTACGGTTAGCTCAACGCCTTCGAGTGAATCCAA CTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCTGGGAACGTATTACCGCGGCATGCT GATCCGCGATTACTAGCGATTCCGCCTTACGCTCTCGAGTTGCAGAGAACGATCCGAACT GAGACGACTTTTGGAGATTAGCTCCCTCTCGCGAGGTGGCTGCCACTGTAGTCGCCATTG TAGCACGTGTGTAGCCCAACGCGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCT CCGGCTTATCACCGGCGGTTCTTTAGAGTACCCAACCTCAATGCTGGCAACTAAAGGCGAG GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGC AGCACCTGTCACCTATCCAGCCGAAGTGAAGGAAAGTGTCTCCACGATCCGCGATAGGGAT GTCAAACGTTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTTCAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTG CAGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGATAACTTA ATGCGTTAGCTGCGCCACCAAACACCATGTGCCCTGACAGCTAGTTATCATCGTTTACGGC GTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAATACC AGTCCAGTGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCGAATATCTACGAATTTACCTCTACAC TCGGAATTCACCTCACCTCTCCTGGATTCAAGCTATCTAGTTTCAAAGCAGTTCCGGGTTGAG CCCCGGGCTTTCACCTCTGACTGAATAGCGCTACGTGCGCTTACGCCAGTAATCGACACGCTA GCTCCCTCCGTATACCGCGCTGCTGGCACGGGGAAGTATAGC

Ambas sequências foram submetidas online para análise utilizando o algoritmo BLAST, que encontra regiões de similaridade entre a sequência submetida (*query*) e sequências de nucleotídeos ou proteínas previamente depositadas no banco do NCBI. Após análise foram retornados os resultados e pontuações (*scores*) conforme as Figuras 15 e 16.

Figura 15. Sequências produzindo alinhamentos significativos para o primer 27F no programa BLASTN.

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
select all 100 sequences selected									
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
<input checked="" type="checkbox"/> Sphingobium sp. GR 4-07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sphingobium sp. GR 4-07	1677	1677	95%	0.0	98.84%	1371	KM253072.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Sphingomonas paucimobilis strain ZFJ-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sphingomonas paucimobilis	1676	1676	95%	0.0	98.83%	1428	EU931555.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Sphingobium yanoikuyae strain SJTF8 chromosome, complete genome	Sphingobium yanoikuyae	1672	6667	97%	0.0	98.73%	5172777	CP033230.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Sphingobium yanoikuyae strain BBL01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sphingobium yanoikuyae	1672	1672	95%	0.0	98.73%	1408	MK326866.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Sphingobium yanoikuyae partial 16S rRNA gene, strain HAMB1 1842	Sphingobium yanoikuyae	1672	1672	95%	0.0	98.73%	1466	LT899948.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Sphingomonas sp. strain HR67 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sphingomonas sp.	1672	1672	95%	0.0	98.73%	1417	MG818739.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Sphingomonas sp. strain HR2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sphingomonas sp.	1672	1672	95%	0.0	98.73%	1416	MG818725.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Sphingobium yanoikuyae strain E14 - 14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sphingobium yanoikuyae	1672	1672	97%	0.0	98.43%	1335	KY938169.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Sphingomonas paucimobilis strain VNPL4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sphingomonas paucimobilis	1672	1672	95%	0.0	98.94%	971	KY970143.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Sphingobium yanoikuyae strain DM6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sphingobium yanoikuyae	1672	1672	95%	0.0	98.94%	1363	KT229739.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured alpha proteobacterium clone S-5-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured Alphaproteobacteria...	1672	1672	95%	0.0	98.73%	1400	KF827315.1	

Figura 16. Sequências produzindo alinhamentos significativos para o primer 1492R no programa BLASTN.

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
select all 0 sequences selected									
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
<input type="checkbox"/> Sphingobium yanoikuyae strain HAOB_L32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sphingobium yanoi...	1688	1688	97%	0.0	98.65%	1369	MH064251.1	
<input type="checkbox"/> Sphingobium sp. GR 4-07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sphingobium sp. G...	1687	1687	98%	0.0	98.45%	1371	KM253072.1	
<input type="checkbox"/> Sphingobium yanoikuyae strain SWFU-SYCO1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sphingobium yanoi...	1687	1687	98%	0.0	98.45%	1394	OL588234.1	
<input type="checkbox"/> Sphingomonas sp. MN35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sphingomonas sp. ...	1687	1687	98%	0.0	98.45%	1400	JN082746.1	
<input type="checkbox"/> Sphingomonas sp. XLDN2-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sphingomonas sp. ...	1687	1687	98%	0.0	98.45%	1384	EF062503.1	
<input type="checkbox"/> Sphingobium yanoikuyae strain YC-XJ2 chromosome, complete genome	Sphingobium yanoi...	1685	6729	98%	0.0	98.54%	5232360	CP053021.1	
<input type="checkbox"/> Sphingobium yanoikuyae strain YC-JY1 chromosome, complete genome	Sphingobium yanoi...	1685	6741	98%	0.0	98.54%	5482815	CP047218.1	
<input type="checkbox"/> Sphingobium yanoikuyae JCM 10197 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	Sphingobium yanoi...	1685	1685	97%	0.0	98.54%	1409	LC506140.1	
<input type="checkbox"/> Sphingobium yanoikuyae strain YC-XJ2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sphingobium yanoi...	1685	1685	97%	0.0	98.54%	1479	MN224662.1	
<input type="checkbox"/> Sphingobium sp. strain YC-JY1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sphingobium sp.	1685	1685	97%	0.0	98.54%	1447	MN165536.1	
<input type="checkbox"/> Sphingomonas sp. strain YJ1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sphingomonas sp.	1685	1685	97%	0.0	98.54%	1386	MK104142.1	

A sequência consulta (*query*) oriunda do primer 27F e 1493R tiveram um tamanho de 979 e 968 pares de bases (pb), respectivamente; que correspondem ao tamanho parcial do gene 16S rDNA com ~1500 pb, mostrando

assim cobertura aceitável de comparação com as sequências do banco BLASTN. Os gêneros *Sphingobium* e *Sphingomonas* foram os mais representativos da análise (>98% de identidade). Ao nível de espécie, *Sphingobium yanoikuyae* e *Sphingomonas paucimobilis* foram as mais representativas com 98,65% e 98,83% de identidade, respectivamente.

Sphingobium é um gênero formado por bactérias Gram negativas e inclui espécies com potencial para biorremediação para ambientes contaminados devido à sua capacidade de degradar compostos aromáticos como fenol, nitrobenzeno, fenantreno, entre outros. Usualmente essas bactérias são encontradas em substratos com alta relação C/N, em ambientes degradados pela sua capacidade de metabolizar diversos resíduos industriais. Várias espécies desse gênero são capazes de acumular poli-hidroxicarboxilatos (PHAs) como reserva energética (BENTO, 2013).

O gênero *Sphingomonas* é formado por bactérias Gram-negativas compostas de mais de 103 espécies. Morfologicamente, é caracterizada como uma espécie que produz pigmento amarelo, possui a forma de haste, e geralmente imóvel. Como características desempenham um papel importante na interação com plantas, na biorremediação e biodegradação de contaminantes ambientais, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) (ASAF; NUMAN; KHAN; AL-HARRASI, 2020).

Takeuchi *et al.* (1994) descreveram quatro agrupamentos filogenéticos no gênero com base em dados da sequência do gene 16S rRNA e, posteriormente, combinaram análises filogenéticas, quimiotaxonômicas e fisiológicas para dividir o gênero em quatro (sub)gêneros: *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium* e *Sphingopyxis*. Desta forma, o gênero *Sphingobium* é um dos forma um desses agrupamentos e é caracterizado pela utilização de ciclo-cloroalcanos, hidrocarbonetos saturados, polihidroxicarboxilatos e compostos aromáticos mono e policíclicos, como únicas fontes de carbono para o crescimento (MITRA *et al.*, 2020).

Curiosamente, uma busca na literatura não se encontra informações relacionadas a síntese de NCB por *Sphingomonas*, nem para *Sphingobium*. O gênero *Sphingomonas* está relacionado com a produção de polissacarídeos, mais especificamente a goma gelana, cuja unidade de repetição é um tetrassacarídeo que consiste em dois resíduos de D-glucose e um resíduo

de cada de L-ramnose e ácido D-glucurônico. Isso abre perspectivas futuras para a primeira citação e constatação da possível síntese de NCB entre esses gêneros. Uma análise mais fina de caracterização sobre essa questão está em andamento no projeto.

O gênero *Sphingomonas* foi encontrado num estudo que analisou a sucessão da comunidade bacteriana em vinagre obtido, por fermentação no estado sólido, a partir do fruto de jujuba (uma planta da família das Ramnáceas, originária da Ásia e que está presente nos estados da Bahia e São Paulo) (FAN; MA; WANG, 2022).

O estudo mostrou que durante a fermentação a sucessão bacteriana foi dividida em 4 estágios com *Staphylococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, e *Acetobacter* como gêneros dominantes, respectivamente. O gênero *Sphingomonas* esteve presente em maior abundância principalmente no estágio final da fermentação (estágio S4).

Outro estudo cujo objetivo foi caracterizar a microbiota de diversos vinagres obtidos por cultura submersa por sequenciamento de amplicon 16S rRNA e MALDI-TOF MS também foi constatado o gênero *Sphingomonas* (ROMÁN-CAMACHO *et al.*, 2022). O Estudo mostrou que os grupos bacterianos do metagenoma não abundante foram atribuídas aos gêneros *Cetobacterium*, *Rhodobacter*, *Bacillus* e *Sphingomonas*, com a última contida principalmente em amostras de fermentação obtidas a partir de vinho tinto.

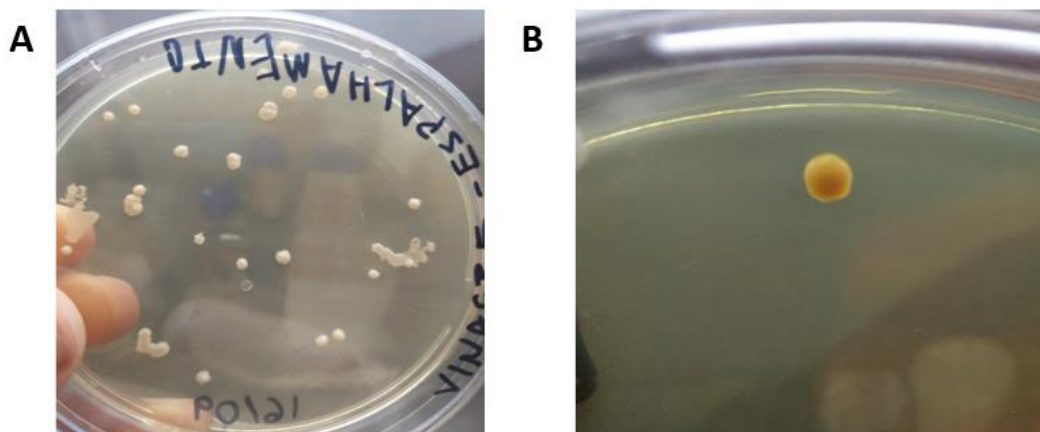
Em outro estudo realizado com um vinagre tradicional chinês (Shanxi) foi verificado que a comunidade microbiana foi dominada por 17 gêneros bacterianos com uma abundância relativa de >0,1%, cujo gênero *Sphingomonas* foi encontrado em menor abundância (0.1%) (NIE, Z. *et al.*, 2017).

5.3 Caracterização morfológica do consórcio de bactérias presentes no vinagre, do isolado produtor de NCB e da cepa padrão *K. hansenii*

A Figura 17 representa o aspecto da colônia do isolado. As colônias apresentaram-se com coloração branca e opaca, aspecto liso e leitoso/pastoso

e bordas lisas e regulares. Como alguns dias após isolamento a colônia adquire coloração amarelada mantendo o aspecto leitoso/pastoso e bordas lisas e regulares.

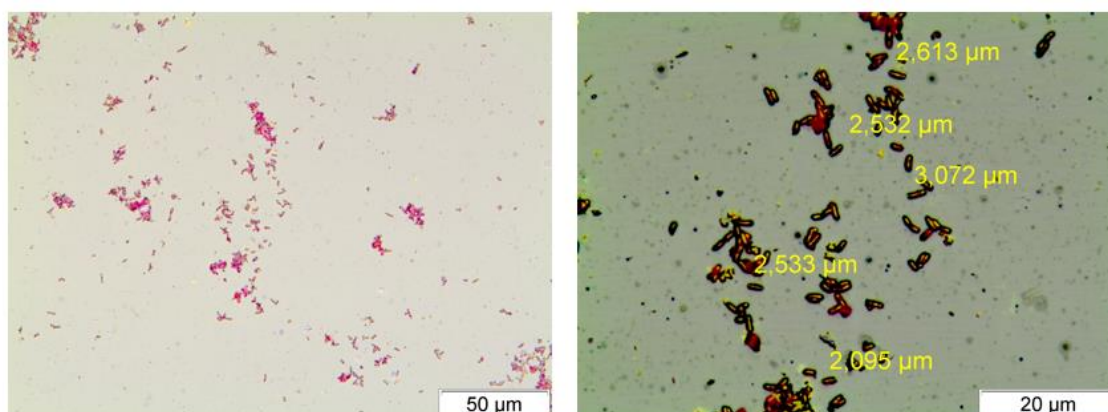
Figura 17. (A) Colônia do isolado do vinagre. **(B)** Colônia em destaque do isolado do vinagre.



Fonte: Os autores.

Após o preparo e fixação de lâminas, a morfologia do consórcio de microrganismos (microbiota no frasco com NCB inoculado com vinagre), do isolado (*Sphingomonas* sp.) e da cepa padrão *K. Hansenii*, foram observados em microscópio óptico com aumentos de 200-1600x. As bactérias que compõem o consórcio foram após coloração de Gram caracterizadas majoritariamente com forma de bacilos e Gram-negativas, com tamanhos que variam de 2,095 μm a 3,072 μm (Figura 18).

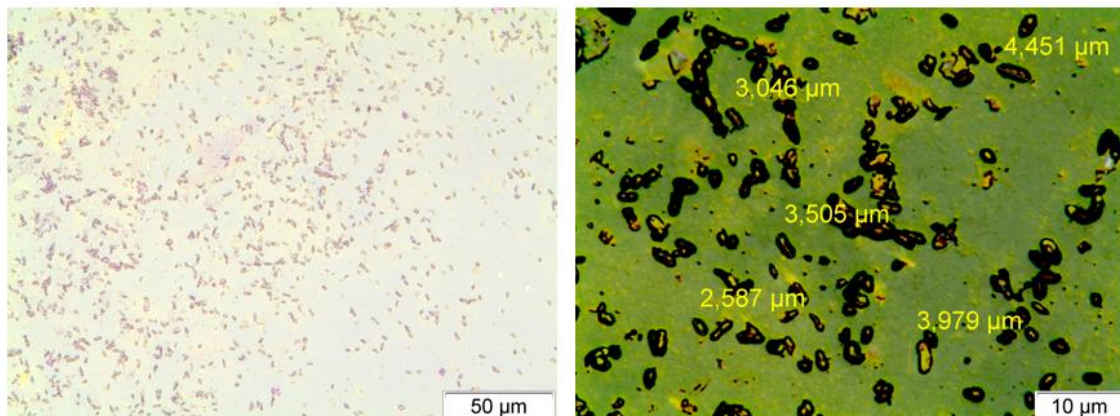
Figura 18. Coloração de Gram do consórcio de microrganismos presentes no meio HS líquido tendo como inóculo o vinagre de maçã.



Fonte: Os autores.

A morfologia do isolado (*Sphingomonas* sp.) foi observado como bacilos gram-negativos de tamanho que variam de 2,5 μ m a 4,5 μ m (Figura 19).

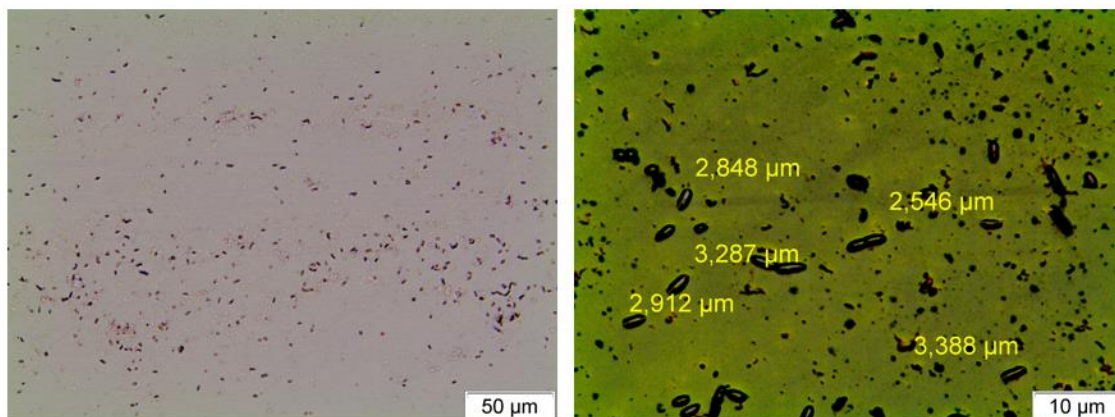
Figura 19. Coloração de Gram do isolado produtor de NCB.



Fonte: Os autores.

A cepa padrão de *K. hanseni*, normalmente utilizada para produção de celulose também foi analisada e foram observados bacilos gram-negativos de tamanhos que variam entre 2,54 μ m 3,3 μ m. (Figura 20).

Figura 20. Coloração de Gram de *K. hanseni*.



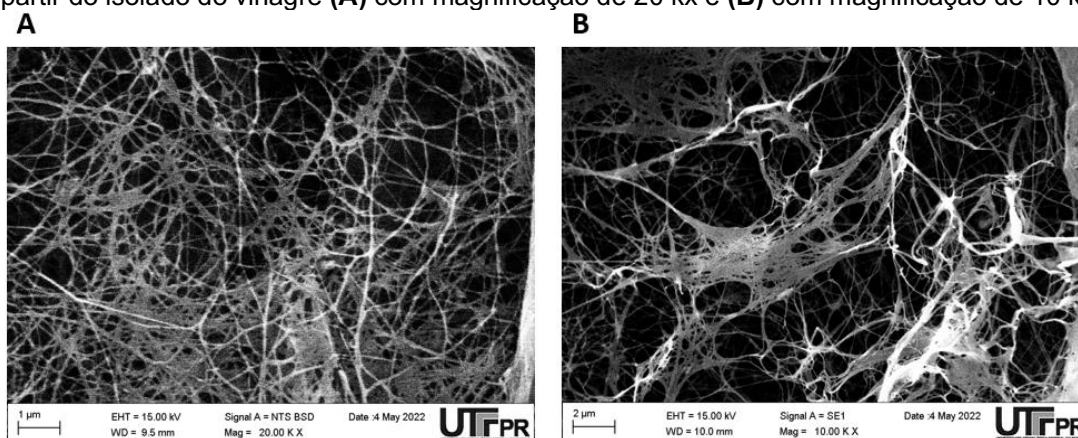
Fonte: Os autores.

5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da NCB produzida pelo isolado

A microscopia eletrônica de varredura (MeV) auxilia na determinação da estrutura e homogeneidade do material celulósico obtido, além de possibilitar a visualização de materiais imobilizados, quando for o caso, e a possível orientação das nanofibrilas da celulose. Como a celulose liofilizada é um material não condutor, foi necessário seu recobrimento anterior à análise por MeV com átomos metálicos, neste caso especial ouro, podendo ser platina, e ósmio também, a fim de obter uma camada condutora que possibilitam esta análise (KONDO; RYTCHAC; BIELECKI, 2016).

A morfologia da NCB produzida a partir do isolado pode ser observada na Figura 21. Observa-se que o filme de NCB produzido pelo isolado é composto por uma rede aleatória de fibras ultrafinas (110 nm, Image-J) com poros de tamanhos variados que conferem ao material uma área superficial extensa e com uma imensa possibilidade de aplicações. Em trabalho de Chen, Zou, Hong (2015), a NCB produzida por *Gluconacetobacter xylinus* apresentou um diâmetro aproximado de 100 nm. Um outro dado obtido pelo programa Image-J foi uma estimativa da área compreendida por poros que ficou em 32,18% \pm 7,08.

Figura 21. Microscopia eletrônica de varredura de membrana de nanocelulose bacteriana obtida a partir do isolado do vinagre **(A)** com magnificação de 20 kx e **(B)** com magnificação de 10 kx.



5.5 Otimização da produção de NCB utilizando meio de cultivo de baixo custo

Nesta etapa, a intenção foi padronizar os cultivos utilizando uma cepa padrão para a produção de NCB, a *K. hansenii*, que na sequência servirá como base para os estudos com o isolado do vinagre. O cultivo de NCB foi realizado, principalmente, em frascos do tipo conserva recobertos por tampão a fim de permitir a oxigenação do meio essencial para a produção da NCB (Figura 22).

Devido à instabilidade hídrica do Estado do Paraná e ao fato dos destiladores descartarem aproximadamente 32 L de água para cada 1 L de água destilada preparada, optou-se pela utilização de água de torneira. A utilização de água tratada de fornecimento pelas concessionárias apresenta-se como alternativa em caso de aumento de produção, projetando para nível industrial, minimizando custos e desperdício (MEDEIROS; STORCK; VOLPATTO, 2017).

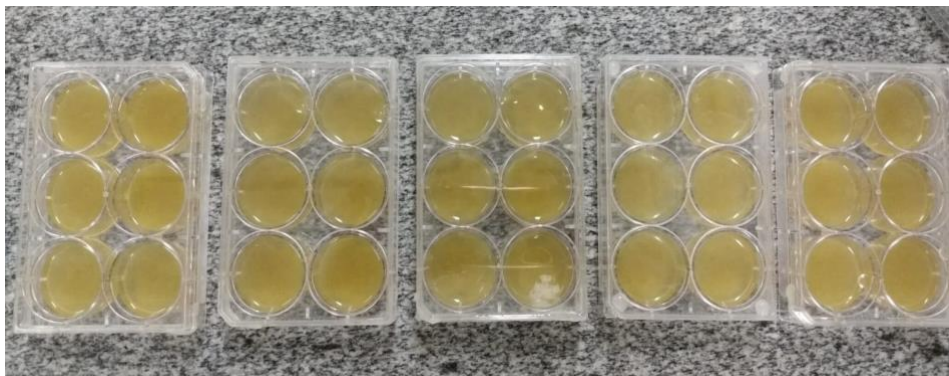
Figura 22. Cultivo de nanocelulose em frascos de conserva a 28°C em estufa, a partir de *K. hansenii* e meio HS modificado.



Fonte: Os autores.

Foram obtidas membranas de celulose em meio estático em estufa à 28°C em estufa por 07 dias em placas multipoços com 06 (Figura 23) e 12 poços (Figura 24) e meio de cultivo HS modificado, com glicerol como principal fonte de carbono.

Figura 23. Cultivo de nanocelulose em placas multipoços de 06 poços pós incubação de 07 dias a 28°C em meio HS modificado.



Fonte: Os autores.

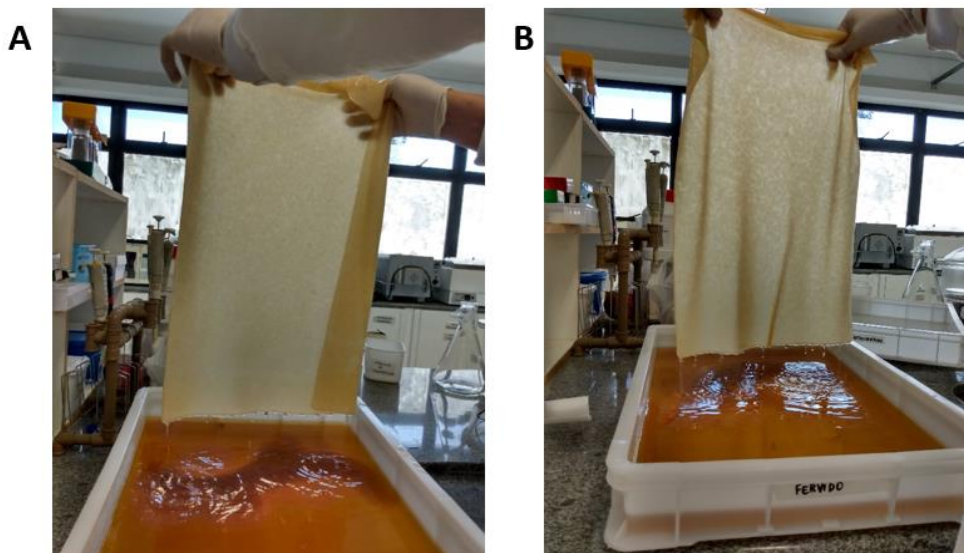
Figura 24. Cultivo de nanocelulose em placas multipoços de 12 poços pós incubação de 07 dias a 28°C em meio HS modificado.



Fonte: Os autores.

Além disso, foram cultivadas *K. hansenii* em meio estático, à temperatura ambiente, em maior escala utilizando bandejas de polietileno de alta densidade com dimensões internas de (365 x 565 x 62) mm (larg x comp x alt) previamente higienizadas com etanol 70%. Tanto o meio de cultivo fervido quanto o meio autoclavado foram eficientes e não foi observada contaminação nas membranas obtidas (Figura 25A e 25B). Pode-se dizer que para este meio, a utilização de nistatina e álcool 70% para a limpeza das bandejas foram efetivos em minimizar contaminações.

Figura 25. (A) Membrana de celulose obtida pós cultivo de 07 dias em meio estático, à temperatura ambiente, utilizando meio HS modificado autoclavado e *K. hansenii* como microrganismo modelo. (B) Membrana de celulose obtida pós cultivo de 07 dias em meio estático.



Fonte: Os autores.

5.6 Produção de NCB a partir de isolado do vinagre

Após o preparo do inóculo, em que as células foram acondicionadas em tubos de ensaio com tampas parcialmente fechadas, contendo 10 mL do meio de cultura, em meio estático, por aproximadamente 7 dias, a 29°C em estufa, observou-se o aparecimento de membrana no interior do tubo. Com isso, o conteúdo do tubo foi transferido para frascos tipo conserva maiores, previamente autoclavados, com aproximadamente 500mL de meio de cultura, com a abertura protegida por tampão, mantidos em estufa em meio estático a 29°C por 7 dias, sendo observado, então, o surgimento de membrana na interface líquido-ar.

Meios alternativos contendo resíduos de abacaxi foram testados. O meio nomeado “abcxl” demonstrou-se melhor devido à superior qualidade das membranas obtidas.

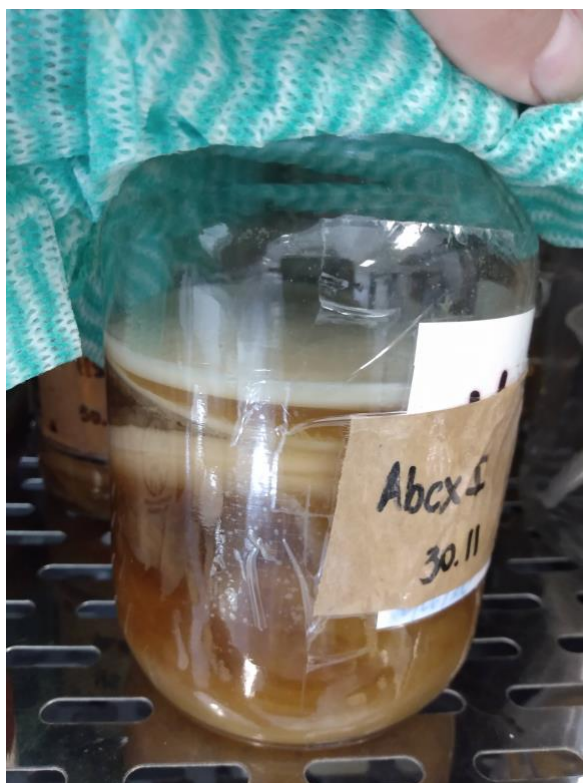
Os resíduos de abacaxi (cascas) foram escolhidos por esse fruto ser cultivado em todas as Unidades da Federação brasileira, sendo o país o segundo produtor mundial. A fruta (*Ananas comosus L. Merrill*) é a quinta mais produzida no país, contribuindo com aproximadamente R\$ 2,2 bilhões para o PIB

agrícola. A produção é absorvida quase totalmente pelo mercado interno, o que a torna interessante para o desenvolvimento de novos meios de cultivo devido à sua disponibilidade e valor nutricional (EMBRAPA, 2013).

A questão nutricional torna o abacaxi uma fruta interessante para o uso em meios de cultivo. Seu valor nutricional está relacionado ao seu conteúdo de açúcares solúveis, minerais e vitaminas. Em frutos maduros, o teor de sólidos solúveis varia de 13-15° BRIX e entre as vitaminas presentes no abacaxi pode-se destacar a vitamina C, com valores médios de 34,6mg/100g fruta. Entre os minerais, é fonte de potássio (K) com 131mg/100g, cálcio (Ca) com 22mg/100g, magnésio (Mg) 18mg/100g e fósforo (P) com 13mg/100g (EMBRAPA, 2013).

Com isso, utilizando as cascas, alguma parte da polpa fica retida, aumentando seu valor nutricional para o uso como meios de cultura. Entretanto, houve dificuldade para a produção de membranas em placas multipoços sem que houvesse contaminação. O melhor cultivo empregando o meio alternativo de abacaxi foi observado em frascos tipo conserva (Figura 26).

Figura 26. Cultivo de nanocelulose em meio alternativo de abacaxi utilizando frasco do tipo conserva.



Fonte: Os autores.

5.7 Purificação das membranas obtidas

As membranas obtidas foram purificadas em NaOH à quente. Quanto menores as membranas, mais rápido e simples era o processo de purificação. Membranas obtidas em placas multipoços necessitaram apenas de algumas horas para purificação total (Figura 27). As membranas foram enxaguadas e o pH aferido até que este fosse igual ao pH da água da torneira.

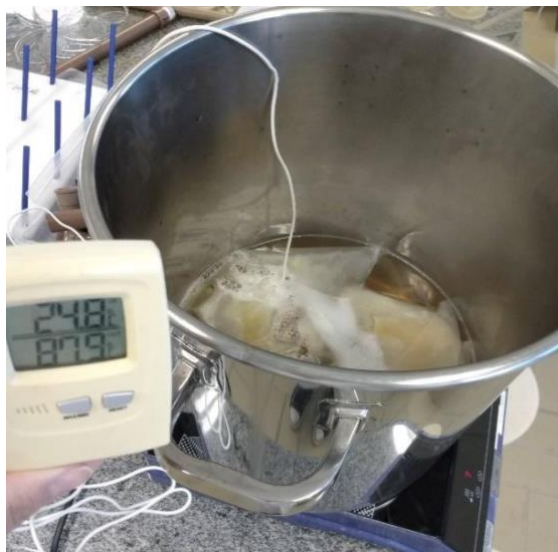
Figura 27. Processo de purificação de membranas em chapa de aquecimento.



Fonte: Os autores.

Já as membranas maiores, além da purificação à quente (Figura 28), foram deixadas de molho em NaOH por 24h e após visualizar que a coloração da membrana estava branca, vários enxagues foram realizados com água da torneira até que o pH da água de enxague se igualasse ao pH aferido da água do fornecimento (Figura 29).

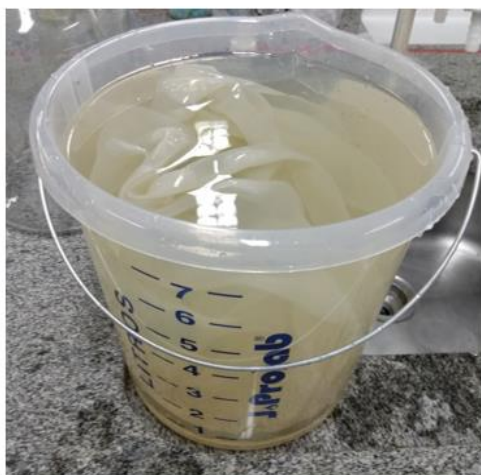
Figura 28. Processo de purificação de membranas obtidas de bandejas de cultivo.



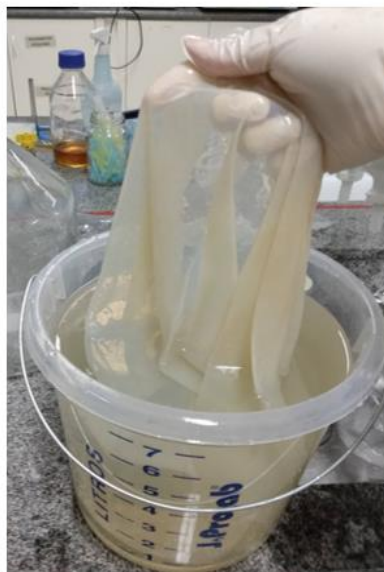
Fonte: Os autores.

Figura 29. (A) Membranas provenientes de cultivo em bandejas submersas em NaOH e **(B)** Membranas de molho em água.

A



B

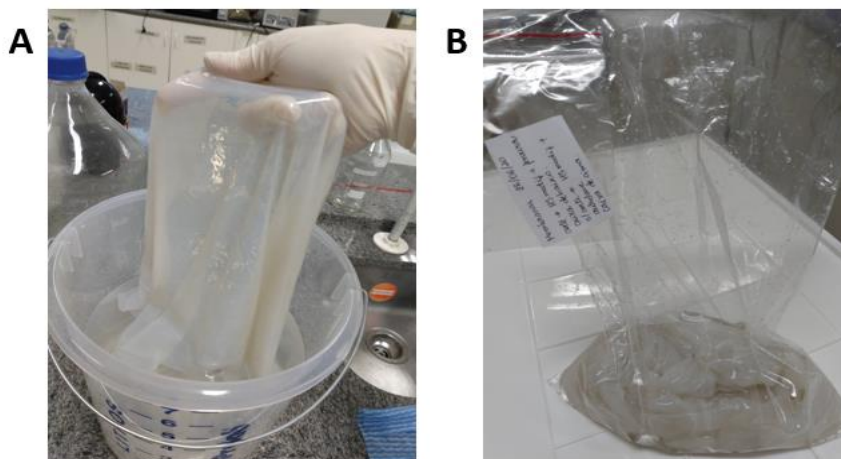


Fonte: Os autores.

Após a purificação, que pode ser observada pela alteração de coloração, de uma cor acastanhada para coloração esbranquiçada das membranas, estas tiveram o pH de sua última água de enxague aferido e, por

apresentar pH igual ao da água da torneira, estas foram armazenadas em plásticos tipo Ziplock, em geladeira para posteriores análises (Figura 30).

Figura 30. (A) Membrana de celulose purificada e (B) Membrana de celulose purificada e preparada para armazenamento refrigerado.



Fonte: Os autores.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho foi isolada uma espécie de bactéria a partir de vinagre de maçã comercial que após análise apresentou-se como um microrganismo Gram-negativo, de tamanho que varia entre 2,5 – 4,4 μm . Os gêneros mais representativos após a análise de gene 16S rDNA foram *Sphingobium* e *Sphingomonas*. Já ao nível de espécie, *Sphingobium yanoikuyae* e *Sphingomonas paucimobilis* foram as mais representativas com 98,65% e 98,83% de identidade, respectivamente.

Obteve-se membranas de nanocelulose tanto utilizando a cepa *K. hansenii* quanto a cepa isolada a partir de vinagre de maçã.

Meio alternativo de abacaxi mostrou-se interessante para a produção na nanocelulose, desde que em frascos tipo conserva.

É interessante em trabalhos futuros testar outros meios de cultivo alternativos com outros frutos devido à sazonalidade e redução de custos, além de otimizar as condições de crescimento microbiano para aumentar a produção de nanocelulose em menor tempo de cultivo.

Como sugestão de trabalhos futuros está também um estudo bioquímico do microrganismo isolado do vinagre a fim de estudar suas necessidades nutricionais e otimização de meios de cultivo que são uma problemática na produção de nanocelulose em grande escala. Além disso, a confirmação da análise molecular do isolado através do sequenciamento do gene 16S rRNA na sua integralidade e uma análise de várias estirpes de grandes filos visando identificar o microrganismo e sua árvore filogenética são possíveis incrementos para este trabalho.

REFERÊNCIAS

ASAF, S.; NUMAN, M.; KHAN, A. L.; AL-HARRASI, A. Sphingomonas: from diversity and genomics to functional role in environmental remediation and plant growth. **Crit Rev Biotechnol**, 40(2), p.138-152, 2020.

AZEREDO, H. M. C.; BARUD, H.; FARINAS, C. S.; VASCONCELLOS, V. M.; CLARO, A. M. Bacterial Cellulose as a RawMaterial for Food and Food Packaging Applications. **Front. Sustain. Food Syst.**, n. 3, 2019.

BENTO, M. A. O. **Prospecção e avaliação do potencial biotecnológico de bactérias da serrapilheira e do solo em área de floresta atlântica do Norte Fluminense**. Dissertação ((Mestrado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes. p. 125, 2013.

DE AMORIM, J. D. P.; DE SOUZA, K. C.; DUARTE, C. R.; et al. Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 3, p. 851–869, 2020.

DUARTE, E. B.; *et al.*, Celulose bacteriana propriedades, meios fermentativos e aplicações. **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2019.

DUFRESNE, A. Nanocelulose: a new ageless bionanomaterial. **Materials today**, v. 16, n. 6, p. 220-227, 2013.

EMBRAPA. Abacaxi: o produtor pergunta, a Embrapa responde / editores técnicos, Nilton Fritzon Sanches, Aristóteles Pires de Matos. – 2 ed. rev. e ampl. – Brasília, DF : **Embrapa**. 196 p., 2013.

FAM, Y.; MA, C.; WANG, R. Deciphering bacterial community succession patterns and their correlations with physicochemical factors in solid-state fermentation of high-quality jujube vinegar. **Food Sci. Technol.**, 2022.]

FERNÁNDEZ, J.; MORENA, A. G.; VALENZUELA, S. V.; et al. Microbial Cellulose from a Komagataeibacter intermedius Strain Isolated from Commercial Wine Vinegar. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 27, n. 5, p. 956–967, 2019.

GAO, H.; SUN, Q.; HAN, Z.; et al. Comparison of bacterial nanocellulose produced by different strains under static and agitated culture conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 227, n. June 2019, p. 115323, 2020.

GOMES, R. J.; BORGES, M. F.; ROSA, M. F.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H.; SPINOSA, W. A. Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 2, n. 56, p. 139-151, 2018.

GOMES, R. J.; ANDRADE, T. N.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H.; SPINOSA, W. A.

Isolamento de Bactérias Acéticas a Partir de Vinagres e Avaliação do Potencial de Síntese de Celulose Bacteriana. VI SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA, Londrina -PR, 2017.

GUILLAMÓN, J. M.; MAS, A. Acetic Acid Bacteria In: KÖNIG, H.; UNDEN, G.; FRÖHLICH, J. Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. **Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine**, p. 1–710, 2017.

GULLO, M.; LA CHINA, S.; FALCONE, P. M.; GIUDICI, P. Biotechnological production of cellulose by acetic acid bacteria: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 16, p. 6885–6898, 2018.

HO JIN, Y., LEE, T., KIM, J. R., CHOI, Y. E., PARK, C. Improved production of bacterial cellulose from waste glycerol through investigation of inhibitory effects of crude glycerol-derived compounds by *Gluconacetobacter xylinus*. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 75, 158–163, 2019.

HUANG, Yang; ZHU, Chunlin; YANG, Jiazhi; NIE, Ying; CHEN, Chuntao; SUN, Dongping. Recent advances in bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 21, p. 1-30, 2014.

JACEK, P.; DOURADO, F.; GAMA, M.; BIELECKI, S. Molecular aspects of bacterial nanocellulose biosynthesis. **Microbial Biotechnology**. v. 12, n. 4, p. 633-649, 2019.

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

KHAN, Shaukat; UI-ISLAM, Mazhar; KHATTAK, Waleed Ahmad; ULLAH, Muhammad Wajid; PARK, Joong Kon. Bacterial cellulose-titanium dioxide nanocomposites: nanostructural characteristics, antibacterial mechanism, and biocompatibility. **Cellulose**, v.22, p. 565-579, 2015.

KONDO, T.; RYTCZAK, R., BIELECKI, S. Chapter 4 - Bacterial NanoCellulose Characterization. **Bacterial Nanocellulose, Elsevier**, p. 59-71, 2016.

LA CHINA, S.; ZANICHELLI, G.; DE VERO, L.; GULLO, M. Oxidative fermentations and exopolysaccharides production by acetic acid bacteria: a mini review. **Biotechnol Lett.**, 2018.

LANES, D. J.; OLSEN, G. J.; SATAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 82(20):6955-9, 1985

LEE, K. Y.; BISMARCK, A. Bacterial nanocellulose as reinforcement for Polymer matrices. **Bacterial NanoCellulose From Biotechnology to Bio-Economy**, Elsevier, 2016.

LI, G.; NANDGAONKAR, A. G.; WANG, Q.; ZHANG, J.; KRAUSE, W. E.; WEI, Q.; LUCIA, L.A. Laccase-Immobilized Bacterial Cellulose/Tio₂ Functionalized Composite Membranes: Evaluation for Photo-and Bio-Catalytic Dye Degradation. **Journal of Membrane Science**, 525, 89 -98, 2017.

LIU, K.; DU, H.; ZHENG, T.; et al. Recent advances in cellulose and its derivatives for oilfield applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 259, n. January, p. 117740, 2021.

LOPES, P. V.; LIZ, M. V.; DOMINGUES, R. C. P. R.; COUTO, G. H. Ação antimicrobiana de um filme nanocompósito formado por nanocelulose bacteriana e dióxido de titânio. **Revista Tecnologia e Sociedade**, v. 18, n. 51, p. 314-329, 2022.

LYNCH, K. M., ZANNINI, E., WILKINSON, S., DAENEN, L., ARENDT, E. K. Physiology of Acetic Acid Bacteria and Their Role in Vinegar and Fermented Beverages. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 3, pp. 587–625, 2019.

MACHADO, R. T. A., MENEGUIN, A. B., SÁBIO, R. M., FRANCO, D. F., ANTONIO, S. G., GUTIERREZ, J., TERCJAK, A., BERRETA, A. A., RIBEIRO, S. J. L., LAZARINI, S. C., LUSTRI, W. R., BARUD, H. S. Komagataeibacter rhaeticus grown in sugarcane molasses-supplemented culture medium as a strategy for enhancing bacterial cellulose production. **Industrial Crops and Products**, 122, 637–646, 2018.

MADIGAN, Michel T.; MARTINKO, John M.; DUNLAP, Paul V.; CLARK, David P. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010.

MEDEIROS, R. C.; STORCK, W. R.; VOLPATTO, F. **Gestão da água de descarte de destiladores de água em laboratórios de uma IES**.In: VIII Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental, Campo Grande -MS, 2017.

MITRA, M.; NGUYEN, K. M. A. K.; BOX, T. W.; et al. Isolation and characterization of a novel *Sphingobium yanoikuyae* strain variant that uses biohazardous saturated hydrocarbons and aromatic compounds as sole carbon sources. **F1000Research**, v. 9, p. 1–25, 2020.

NIE, Z.; ZHENG, Y.; XIE, S.; ZHANG, X. SONG, J. XIA, M., WANG, M. Unraveling the correlation between microbiota succession and metabolite changes in traditional Shanxi aged vinegar. **Sci Rep.**, 2017.

PAULO, Heloisa Delgado. Biopolímeros: Uma alternativa favorável. **Revista Temas Atuais em Biologia**, v.2, 2014.

PETERSOHN JR., E. **Imobilização de papaína em membranas de nanocelulose bacteriana**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Departamento de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba. p. 121, 2019.

PIELAK, F. **Desenvolvimento de nanocompósitos de nanocelulose bacteriana e TiO₂ e sua aplicação na degradação do corante preto reativo 5 por fotocatalise heterogênea**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Departamento de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba. p. 92, 2018.

RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M.; KUMBHAR, J. V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 99, P. 2491-2511, 2015.

ROMÁN-CAMACHO, J. J.; GARCÍA-GARCÍA, I.; SANTOS-DUEÑAS, I. M.; EHRENREICH, A.; LIEBL, W.; GARCÍA-MARTÍNEZ, T.; MAURICIO, J. C. Combining omics tools for the characterization of the microbiota of diverse vinegars obtained by submerged culture: 16S rRNA amplicon sequencing and MALDI-TOF MS. **Front Microbiol.**, 2022.

SCHIMIDELL NETTO, W.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. 2ª ed., São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

SHARMA, C.; BHARDWAJ, N. K. Bacterial nanocellulose: Present status, biomedical applications and future perspectives. **Materials Science and Engineering: C**. v. 104, 2019.

SPEROTTO, G.; STASIAK, L. G.; GODOI, J. P. M. G.; GABIATTI, N. C.; DE SOUZA, S. S. A review of culture media for bacterial cellulose production: complex, chemically defined and minimal media modulations. **Cellulose**, v. 28, n. 5, p. 2649–2673, 2021.

ULLAH, H.; SANTOS, H. A.; KHAN, T. Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery. **Cellulose**, n. 23, p. 2291-2314, 2016.

VALERO-VALDIVIESO, Manuel Fernando; ORTEGÓN, Yamileth; USCATEGUI, Yomaira. Biopolímeros: Avances y perspectivas. **Dyna**, v.181, p. 171-180, 2013.

VIEIRA, D. C. M. **Produção de biofilme (membrana de biocelulose) por Gluconacetobacter xylinus em meio de resíduos de frutas e folhas de chá verde**. Tese (Doutorado em Ciências farmacêuticas) – Departamento de Tecnologia Bioquímico-farmacêutica, Universidade de São Paulo. São Paulo. 176 p. 2013.

YANG, H. J.; LEE, T.; KIM, J. R.; CHOI, Y. E.; PARK, C. Improved production of bacterial cellulose from waste glycerol through investigation of inhibitory effects of crude glycerol-derived compounds by *Gluconacetobacter xylinus*. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 75, p. 158–163, 2019.

ZHANG, W.; WANG, X.; QI, X.; REN, L.; QIANG, T. Isolation and identification of a bacterial cellulose synthesizing strain from kombucha in different conditions: *Gluconacetobacter xylinus* ZHCJ618. **Food Sci Biotechnol.**, v. 27, n. 3, p. 705-713, 2018.

YAMADA, Y. Systematics of Acetic Acid Bacteria. In: MATSUSHITA, K.; TOYAMA, H.; TONOUCI, N.; OKAMOTO-KAINUMA, A. **Acetic acid bacteria: Ecology and physiology**. 2016.