Universidade de Sorocaba

Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais

PROTOCOLO OPERACIONAL 09/2026

PRODUÇÃO E TRATAMENTO DE CELULOSE BACTERIANA ATÉ A FORMAÇÃO DE NANOCELULOSE BACTERIANA.

Autores:
Samanta Helena Martins de Oliveira
Anna Lúcia Vieira Corrêa
Gabriel Pereira Machado
Gabriella Silverio Pires
Giovanna Ferreira de Melo
Giovanna Soares de Camargo
Isabela Vieira Coraio
Jair Vaz Nogueira Jr
Patrícia Lius Melo Alves
Angela Faustino Jozala

Sorocaba
2026

APRESENTAÇÃO DO PRODUTO TECNOLÓGICO

Este produto tecnológico consiste em um protocolo operacional padronizado para produção, purificação e processamento da celulose bacteriana (CB), destinado à obtenção de uma matriz biopolimérica com potencial de aplicação em sistemas tópicos, curativos e plataformas de incorporação e liberação de substâncias bioativas. O protocolo contempla etapas de cultivo de *Komagataeibacter xylinus* em meio Hestrin–Schramm (HS), inativação celular, purificação, neutralização, esterilização, processamento mecânico e tratamento enzimático, permitindo maior controle e reprodutibilidade na obtenção do material.

Do ponto de vista tecnológico, o protocolo estabelece uma rota reprodutível para obtenção e modificação da CB, possibilitando sua associação a outros biopolímeros, antimicrobianos e diferentes compostos bioativos. Essa versatilidade amplia seu potencial para o desenvolvimento de novos biomateriais e produtos de interesse farmacêutico e biomédico, além de favorecer futuras estratégias de inovação e transferência tecnológica.

Sob a perspectiva ambiental, a CB destaca-se por ser um material de origem biológica, renovável e biodegradável, com potencial para substituir, em determinadas aplicações, materiais sintéticos de menor sustentabilidade. Além disso, sua produção por processos biotecnológicos pode ser otimizada pela utilização de diferentes fontes de carbono e subprodutos agroindustriais, contribuindo para o desenvolvimento de processos mais sustentáveis.

Na área da saúde, a CB apresenta características como biocompatibilidade, elevada capacidade de retenção de água, possibilidade de incorporação de agentes terapêuticos e estrutura tridimensional favorável ao desenvolvimento de sistemas tópicos. Do ponto de vista funcional e mecânico, sua rede fibrilar confere resistência, integridade estrutural e possibilidade de ajuste de propriedades como porosidade, absorção, hidratação e interação com outros componentes, tornando-a uma plataforma versátil para aplicações biomédicas, farmacêuticas e biotecnológicas.

Conteúdo

Celulose bacteriana 4
PRODUÇÃO E TRATAMENTO DA CELULOSE BACTERIANA 5
ETAPA 1 – PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA 5
ETAPA 2 – INATIVAÇÃO CELULAR E PURIFICAÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA 6
ETAPA 3- LAVAGEM E NEUTRALIZAÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA 7
ETAPA 4 – ACONDICIONAMENTO E ESTERILIZAÇÃO 8
ETAPA 5 – TRATAMENTO ENZIMÁTICO DA CELULOSE BACTERIANA 8
REFERÊNCIAS 10

Celulose bacteriana

A celulose bacteriana (CB) é um biopolímero extracelular produzido por diferentes espécies bacterianas, especialmente aquelas pertencentes ao gênero *Komagataeibacter*. Sua síntese ocorre a partir do metabolismo de fontes de carbono presentes no meio de cultivo, resultando na formação de uma rede tridimensional de fibrilas de dimensões nanométricas. Em comparação à celulose de origem vegetal, a CB apresenta elevado grau de pureza, por não conter lignina e hemicelulose, o que reduz a necessidade de etapas adicionais de purificação (George *et al*., 2011; George & Siddaramaiah, 2012; de Amorim *et al*., 2022).

A produção de CB pode ser conduzida em diferentes condições de cultivo e utilizando distintas fontes de carbono, como glicose, frutose e sacarose. Entre os meios mais empregados, destaca-se o meio *Hestrin & Schramm* (HS). O cultivo pode ser realizado em condições estáticas ou sob agitação, sendo que, no sistema estático, ocorre a formação de uma película de CB na interface ar-líquido. A produtividade e as características da matriz obtida são influenciadas por fatores como composição do meio, concentração da fonte de carbono, densidade do inóculo, pH, temperatura e disponibilidade de oxigênio. Para espécies do gênero *Komagataeibacter*, temperaturas próximas a 28–30 °C são frequentemente utilizadas (Ahmed *et al*., 2020; Lahiri *et al*., 2021).

Estruturalmente, a CB apresenta uma rede tridimensional porosa formada por nanofibrilas interconectadas, característica que contribui para sua elevada capacidade de retenção de água, grande área superficial e resistência mecânica. Essas propriedades têm favorecido sua investigação em aplicações biomédicas, especialmente em curativos, sistemas tópicos e plataformas de incorporação e liberação de substâncias bioativas. A capacidade de manter um ambiente úmido pode contribuir para condições favoráveis ao reparo tecidual, enquanto sua estrutura fibrilar permite a incorporação de diferentes moléculas e agentes terapêuticos (George *et al*., 2011; de Amorim *et al*., 2022; Gouripriva *et al*., 2024). Além disso, características como biocompatibilidade, estabilidade estrutural e baixa citotoxicidade têm ampliado seu interesse para aplicações como curativos, *scaffolds* e sistemas de liberação de fármacos (Swingler *et al*., 2021).

Apesar dessas vantagens, a CB em sua forma nativa apresenta limitações estruturais que podem restringir determinadas aplicações. Entre elas, destaca-se o reduzido tamanho dos poros da rede fibrilar, que pode limitar a infiltração celular e a interação entre células e matriz em sistemas que requerem maior penetração celular e integração tecidual (Sulaeva *et al*., 2015; Liang, 2023). Além disso, dependendo da finalidade proposta, propriedades como porosidade, interação com compostos bioativos, capacidade de liberação e comportamento mecânico podem necessitar de ajustes específicos.

Nesse contexto, diferentes estratégias de modificação da CB têm sido empregadas para adequar suas propriedades às necessidades de cada aplicação. Essas modificações podem ocorrer *in situ*, durante o processo de biossíntese, ou *ex situ*, após a obtenção e purificação da matriz. Entre as abordagens descritas estão a incorporação de polímeros, nanopartículas, grupos funcionais e

substâncias bioativas, bem como tratamentos físicos, químicos ou enzimáticos capazes de alterar características estruturais e funcionais do material (Gouripriva *et al*., 2024; Hou *et al*., 2024). Neste protocolo, serão empregadas estratégias de modificação *ex situ*, com o objetivo de promover alterações na estrutura da CB e ampliar sua aplicabilidade como matriz para sistemas tópicos de incorporação e liberação de agentes bioativos.

PRODUÇÃO E TRATAMENTO DA CELULOSE BACTERIANA

ETAPA 1 – PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA

A produção das membranas de celulose bacteriana (CB) segue a metodologia adaptada descrita por Jozala *et al*. (2014), que utiliza a bactéria *Komagataeibacter xylinus* (ATCC 53582), cultivada em meio *Hestrin & Schramm* (HS) (20 g/L glicose monohidratada, 5 g/L extrato de levedura, 1,5 g/L fosfato de sódio bibásico anidro; 1,5 g/L ácido cítrico monohidratado.). O crescimento das bactérias deve ser realizado em erlenmeyers de 250 mL contendo 100mL de meio HS, para obter membranas de 10 cm de diâmetro. Os Erlenmeyers serão mantidos em estufa a 30ºC por tempo necessário para a formação das CB (Figura 1).

Figura 1 - Membranas de Celulose Bacteriana (CB) em meio HS.

ETAPA 2 – INATIVAÇÃO CELULAR E PURIFICAÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA

Após o período de cultivo, retirar cuidadosamente as membranas de celulose bacteriana dos frascos Erlenmeyer utilizando **pinça estéril**.

1. Transferir as membranas para um recipiente resistente à temperatura e à solução alcalina.
2. Preparar uma solução de **hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L**.
3. Adicionar a solução de NaOH às membranas na proporção de aproximadamente **1 L de solução para cada 40 g de membrana de celulose bacteriana**.
4. Manter as membranas completamente imersas na solução.
5. Submeter o sistema à **agitação constante, a 60 °C, durante 1 hora e 30 minutos**.
6. Ao término do tratamento, retirar cuidadosamente a solução alcalina e prosseguir imediatamente para a etapa de lavagem e neutralização.

Ponto crítico: garantir que todas as membranas permaneçam completamente submersas durante o tratamento alcalino. A proporção entre massa de membrana e volume de NaOH deve ser mantida constante entre os lotes.

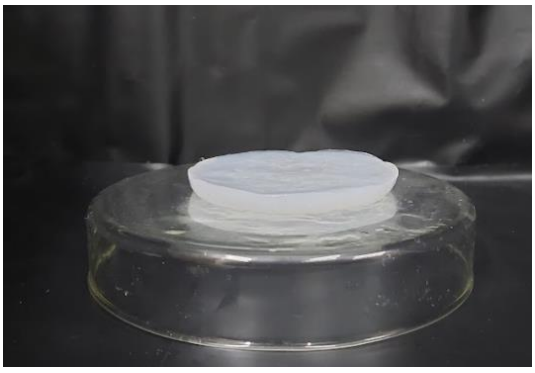
ETAPA 3- LAVAGEM E NEUTRALIZAÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA

Após o tratamento com NaOH, realizar sucessivas lavagens das membranas com água destilada ou purificada, com o objetivo de remover resíduos do meio de cultivo, células bacterianas, componentes solúveis e o excesso de solução alcalina.

- Transferir as membranas para um béquer limpo.
- Adicionar volume suficiente de água destilada para manter as membranas completamente imersas.
- Cobrir o béquer com filme plástico ou material adequado para minimizar contaminações externas.
- Manter as membranas imersas por, no mínimo, 2 horas entre as trocas de água.
- Descartar a água de lavagem e substituí-la por novo volume de água destilada.
- Repetir sucessivamente o processo de lavagem até que o pH da água em contato com as membranas esteja entre 6,5 e 7,0.
- Durante o processo, observar visualmente as membranas (Figura 2). A remoção progressiva de resíduos deverá resultar em aumento da transparência e obtenção de uma coloração predominantemente branca.

Observação: o tempo total necessário para a neutralização poderá variar em função da espessura das membranas, da quantidade de material processado e da eficiência das trocas de água. O critério para encerramento desta etapa deve ser o pH final entre 6,5 e 7,0, e não apenas o tempo de lavagem.

Figura 2 – Aspecto das membranas de celulose bacteriana após o processo de purificação e neutralização.



Fonte: Elaboração própria.

ETAPA 4 – ACONDICIONAMENTO E ESTERILIZAÇÃO

Após a confirmação do pH entre **6,5 e 7,0**, transferir as membranas para frascos adequados, resistentes à autoclavagem e providos de tampa.

Adicionar volume suficiente de **solução tampão fosfato salina (PBS), pH 7,0**, para manter as membranas completamente imersas.

- Fechar os frascos de maneira compatível com o processo de esterilização em autoclave.
- Esterilizar as amostras em autoclave a **121 °C durante 15 minutos**.
- Após a esterilização, aguardar o resfriamento antes do armazenamento ou utilização das membranas.

Pontos críticos do processo

- Padronizar a proporção de **40 g de membrana para 1 L de NaOH 1 mol/L**.
- Manter temperatura de **60 °C** durante todo o tratamento alcalino.
- Realizar lavagens sucessivas até obtenção de **pH entre 6,5 e 7,0**.
- Manter as membranas totalmente imersas durante as etapas de lavagem e armazenamento.
- Utilizar sempre o mesmo critério de neutralização entre os diferentes lotes.
- Registrar o número de ciclos de lavagem e o pH final antes da esterilização.

ETAPA 5 – TRATAMENTO ENZIMÁTICO DA CELULOSE BACTERIANA

A celulose bacteriana previamente triturada deverá ser submetida a tratamento enzimático utilizando celulase de *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich, solução aquosa, atividade ≥700 U/g), com o objetivo de promover a desagregação controlada da matriz fibrilar e a obtenção de partículas de celulose bacteriana.

1. Pesar 5,0 g de celulose bacteriana triturada e transferir para um béquer de vidro de capacidade adequada.
2. Adicionar 15 mL de água destilada e homogeneizar até a dispersão da CB no meio.
3. Cobrir o béquer com filme plástico ou material apropriado, a fim de minimizar perdas por evaporação e contaminação durante o processo.
4. Manter a dispersão sob agitação branda, entre 300 e 400 rpm, e aquecer gradualmente até atingir 50 °C.
5. Após a estabilização da temperatura em 50 °C, adicionar 500 µL da solução de celulase para cada 5 g de CB dispersos em 15 mL de água destilada.
6. Manter o sistema sob agitação constante, entre 300 e 400 rpm, a 50 °C, durante 2 horas.
7. Ao término do tratamento enzimático, elevar a temperatura da dispersão para 100 °C.

8. Manter a amostra a 100 °C durante 20 minutos, sob agitação contínua, com a finalidade de promover a inativação térmica da enzima.
9. Após o período de inativação, interromper o aquecimento e permitir o resfriamento da dispersão até temperatura ambiente.
10. Prosseguir com o acondicionamento ou com as etapas subsequentes de processamento e caracterização.

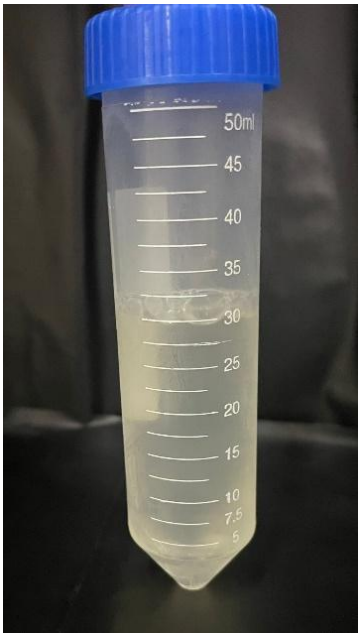
O procedimento foi adaptado de Soeiro et al. (2021) e tem como finalidade promover a hidrólise parcial e a desagregação da estrutura fibrilar da CB, favorecendo a formação de uma dispersão de partículas de menor dimensão.

Ponto crítico: a temperatura, o tempo de reação, a proporção entre CB e enzima e a velocidade de agitação devem ser mantidos constantes entre os lotes, uma vez que variações nesses parâmetros podem alterar o grau de hidrólise e as características das partículas obtidas.

Identificação do produto obtido

Após o tratamento enzimático, obtém-se uma **dispersão particulada de celulose bacteriana (Figura 3)**. A denominação “nanocelulose bacteriana” deverá ser empregada após confirmação das dimensões das partículas por método de caracterização adequado.

Figura 3 – Aspecto da dispersão de celulose bacteriana após tratamento enzimático.



Fonte: Elaboração própria.

REFERÊNCIAS

Ahmed, J., Gultekinoglu, M., & Edirisinghe, M. (2020). Bacterial cellulose micro-nano fibres for wound healing applications. Biotechnology Advances, 41, 0734-9750. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107549.

Amorim, J. D. P. de, Cavalcanti, Y. de F., Medeiros, A. D. M. de, Silva Junior, C. J. G. da, Durval, I. J. B., Costa, A. F. de S., & Sarubbo, L. A. (2024). Synthesis of Transparent Bacterial Cellulose Films as a Platform for Targeted Drug Delivery in Wound Care. Processes, 12(7), 1282. https://doi.org/10.3390/pr12071282.

George, J., Ramana, K. V., Bawa, A. S., & Siddaramaiah. (2011). Bacterial cellulose nanocrystals exhibiting high thermal stability and their polymer nanocomposites. International Journal of Biological Macromolecules, 48(1), 50–57. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.09.013.

George, J., & Siddaramaiah. (2012). High performance edible nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals. Carbohydrate Polymers, 87(3), 2031–2037. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.10.019.

Gluconacetobacter xylinus by employing alternative culture media. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 99, no. 3, p. 1181–1190, 2014. https://doi.org/10.1007/s00253-014-6232-3.

Gouripriva, D. A., Adhikari, J., Debnath, P., Ghosh, S., Ghosh, P., Thomas, S., Ghandilyan, E., Gorbatov, P., Kuchukyan, E., Gasparyan, S., & Saha, P. (2024). 3D printing of bacterial cellulose for potential wound healing applications: Current trends and prospects. International Journal of Biological Macromolecules, 279, 135213. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135213.

Hou, S., Xia, Z., Pan, J., Wang, N., Gao, H., Ren, J., & Xia, X. (2024). Bacterial Cellulose Applied in Wound Dressing Materials: Production and Functional Modification – A Review. Macromolecular Bioscience, 24(2), 2300333. https://doi.org/10.1002/mabi.202300333.

JOZALA, Angela Faustino; Pértile, Renata Aparecida Nedel; Dos Santos, Carolina Alves; De Carvalho Santos-Ebinuma, Valéria; Seckler, Marcelo Martins; Gama, Francisco Miguel; PESSOA, Adalberto. Bacterial cellulose production by

Lahiri, D., Nag, M., Dutta, B., Dey, A., Sarkar, T., Pati, S., Edinur, H. A., Kari, Z. A., Noor, N. H. M., & Ray, R. R. (2021). Bacterial cellulose: Production, characterization and application as antimicrobial agent. International Journal of Molecular Sciences, 22(23), 12984. https://doi.org/10.3390/ijms222312984.

Liang, S. (2023). Advances in drug delivery applications of modified bacterial cellulose-based materials. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 11, 1252706. https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1252706.

Sulaeva, I., Henniges, U., Rosenau, T., & Potthast, A. (2015). Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review. Biotechnology Advances, 33(8), 1547–1571. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.009.

Swingler, S., Gupta, A., Gibson, H., Kowalczuk, M., Heaselgrave, W., & Radecka, I. (2021). Recent advances and applications of bacterial cellulose in biomedicine. Polymers, 13(3), 412. https://doi.org/10.3390/polym13030412.

SOEIRO, V. S.; TUNDISI, L. L.; NOVAES, L. C. L.; MAZZOLA, P. G.; ARANHA, N.; GROTTO, D.; JÚNIOR, J. M. O.; KOMATSU, D.; GAMA, F. M. P.; CHAUD, M. V.; JOZALA, A. F. Production of bacterial cellulose nanocrystals via enzymatic hydrolysis and evaluation of their coating on alginate particles formed by ionotropic gelation. Carbohydrate Polymer Technologies and Applications, v. 2, 100155, 2021. DOI: 10.1016/j.carpta.2021.100155