



13º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS



NATAL - RN  
18 a 22 de outubro de 2015

## CELULOSE BACTERIANA OBTIDA POR DIFERENTES FONTES AGROINDUSTRIAIS

Helder L. Lima<sup>1\*</sup> (D), Eligenes S. Nascimento<sup>1</sup> (D), Matheus de O. Barros<sup>2</sup> (IC), Maria I. A. Santiago<sup>1</sup> (IC), André L. S. Pereira<sup>1</sup> (D), Ana I. S. Brígida<sup>4</sup>, João P. S. Morais<sup>5</sup>, Maria F. Borges<sup>3</sup>, Morsyleide F. Rosa<sup>3</sup>

1 - Universidade Federal do Ceará - UFC, helderlevi@gmail.com

2 - Instituto Federal do Ceará - IFCE, Campus Fortaleza.

3 - Embrapa Agroindústria Tropical

4 - Embrapa Agroindústria de Alimentos

5 - Embrapa Algodão

**Resumo:** No presente trabalho caracterizou-se películas de celulose bacteriana (CB) obtidas por cultivo de *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 utilizando suco de caju, extrato de algaroba e líquido de sisal como fontes alternativas. As películas obtidas não diferiram do meio padrão sintético, usualmente utilizado para produzir CB, quando ao perfil de degradação térmica, pureza e cristalinidade. Tais celuloses apresentaram índices de cristalinidade acima de 91%, temperatura máxima de degradação acima de 315°C e umidade acima de 97%.

**Palavras-chave:** Biotecnologia, Polímero natural, Extrato de algaroba, Líquido de sisal, Suco de caju

### CHARACTERIZATION OF BACTERIAL CELLULOSE FROM AGRO-INDUSTRIAL SOURCES

**Abstract:** In present work, bacterial cellulose (BC) films was characterized. BC was obtained by *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 cultivation using cashew juice, mesquite extract and sisal juice as alternative sources. Thermal degradation profile, purity and crystallinity are similar for all BC films and not differ from the synthetic standard medium usually employed to produce CB. The celluloses presented crystallinity above 91%, degradation temperature (maximum) above 315°C and humidity above 97%.

**Keywords:** Biotechnology, Natural Polymer, Mesquite extract, Sisal juice, Cashew juice

#### Introdução

A celulose bacteriana (CB) é um material polimérico natural bastante estudado desde a sua descoberta uma vez que apresenta características especiais como estrutura nanométrica, alto índice de cristalinidade, alta capacidade de absorção de água, pureza e biocompatibilidade. Tais características tornam a CB um material versátil com vasta aplicabilidade em áreas como biomedicina, cosmética, alimentos, farmacêutica, compósitos e eletrônica [1,2]. Bactérias do gênero *Gluconacetobacter* são as principais responsáveis pela síntese de CB em diversos meios [1,2]. Quando cultivada estaticamente obtém-se uma película porosa com alta resistência mecânica e absorção de água [2]. A CB pode ser facilmente produzida em meios alternativos sendo possível obter bons rendimentos [3].

No Brasil diversas fontes agroindustriais, incluindo resíduos, têm sido estudados para a produção de diferentes produtos biotecnológicos. Dentre eles tem-se o extrato de algaroba, suco de sisal (ou líquido de sisal) e suco de caju que, mesmo sendo ricos em alguns nutrientes, apresentam poucos trabalhos explorando seu potencial de forma significativa. A algaroba é o nome dado ao fruto da algarobeira (*Prosopis juliflora*) que encontra-se distribuída em todo Nordeste brasileiro, é rica em carboidratos e gera um extrato aquoso viscoso de cor escura com alto poder fermentescível [11]. O sisal (*Agave sisalana*) é cultivado no Brasil para a obtenção da fibra de sisal e gera uma grande

quantidade de resíduo líquido que corresponde a aproximadamente 80% do peso total das folhas. Tal líquido é rico em nitrogênio e açúcares. O Brasil é, atualmente, o principal produtor de fibras de sisal no mundo e todo o resíduo gerado tem sido descartado no campo de produção [12]. A cultura do caju (*Anacardium occidentale, L.*) também é muito importante no Brasil e como o maior produto de interesse é a castanha, uma grande quantidade de pedúnculo (90%) é desperdiçada. O pedúnculo quando prensado dá origem ao suco de caju que é rico em açúcares (glicose e frutose) e ácido cítrico [13].

A agregação de valor a essas fontes pode ser feita por meio da obtenção de produtos biotecnológicos por via fermentativa reduzindo assim o impacto ambiental proveniente da disposição final dessa fonte e reduzindo custos do produto ou processo desenvolvido.

O objetivo deste trabalho consistiu em caracterizar películas de CB produzidas a partir de três fontes alternativas de carbono (suco de caju, suco de sisal e extrato de algaroba) comparando com uma película obtida em meio padrão.

## Experimental

### *Produção e purificação da CB*

As películas de CB foram produzidas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Embrapa Agroindústria Tropical utilizando bactérias *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 em cultivo estático. Três diferentes meios foram formulados (Tabela 1) utilizando-se extrato de algaroba, líquido de sisal e suco de caju separadamente como fontes alternativas na composição. Os meios foram ajustados e suplementados adequadamente para uma produção mais adequada de CB. O meio de cultura utilizado para produção de CB em meio padrão (HS) e manutenção da estirpe foi descrito por Hestrin e Schramm (HS) [4]. Após esterilizados (autoclave, 121 °C, 15 minutos) e inoculados com 3% de cultura (v/v), os meios foram incubados a 30°C por 5 dias em placas de Petri de 14,5 cm de diâmetro contendo 100 mL de meio. Após o processo fermentativo, as películas foram purificadas com solução de NaOH 4% (m/v) a 80 °C por 1 hora e lavadas em água destilada até pH neutro.

**Tabela 1** - Composição dos meios de cultura utilizados para a produção de CB: Extrato de algaroba (MA), líquido de sisal (MS), suco de caju (MC) e HS.

Meio / Composição	Açúcar (g/L)	Peptona de caseína (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Ácido cítrico (g/L)	Fosfato de sódio (g/L)	pH
MS	15*	0	7.5	0	0	5
MA	30*	0	10	0	0	4
MC	20*	5	5	0,49*	0	5
HS	20 (Glicose)	5	5	1.15	2.75	5

\* Teores naturalmente presentes nas fontes alternativas

### *Caracterizações*

As películas obtidas nos diferentes meios (CBMS, CBMA, CBMC E CBMHS) foram caracterizadas por análise termogravimétrica (TGA), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), Raios-X e umidade. Para as análises de TGA, DRX e FTIR as películas foram desidratadas em estufa a 60°C por 24 horas a fim de serem utilizadas nas análises. As análises termogravimétricas foram realizadas em um analisador termogravimétrico Shimadzu modelo TGA-50, a 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio em fluxo de 40 mL/min. A análise termogravimétrica (ATG) foi realizada em um analisador termogravimétrico Shimadzu, modelo TGA-50, conduzida no intervalo de 0 a 600°C, na taxa de 10°C/min sob atmosfera de nitrogênio a 40 mL/min. A Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi analisada no

espectrômetro Nicolet 800 associado a uma célula MTech PAS. O preparo das amostras foi feito com KBr pulverizado, sob as seguintes condições: porcentagem de transmitância (%T) com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , na faixa de absorção de  $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ . As análises de raios-X (DRX) foram conduzidas em difratômetro da marca Rigaku modelo DMAXB, com tubo de Cobre. O intervalo angular (em  $2\theta$ ) utilizado foi de  $10$  a  $30^\circ$  com uma velocidade de varredura de  $0,5^\circ/\text{min}$ . O índice de cristalinidade (IC) foi estimado por deconvolução utilizando-se função Gaussiana feita pelo PeakFit® (Systat Software Inc - SigmaPlot®) no software Origin 9.1 (OriginLab®). O índice de cristalinidade foi calculado seguindo a equação 1 onde dividiu-se a área de picos cristalinos pela área total do difratograma, onde IC (%) representa a fração cristalina em porcentagem,  $A_{IC}$  a área total dos picos cristalinos e  $A_{IA}$  a área total dos picos amorfos.

$$IC (\%) = A_{IC}/(A_{IC}+A_{IA}) \quad (1)$$

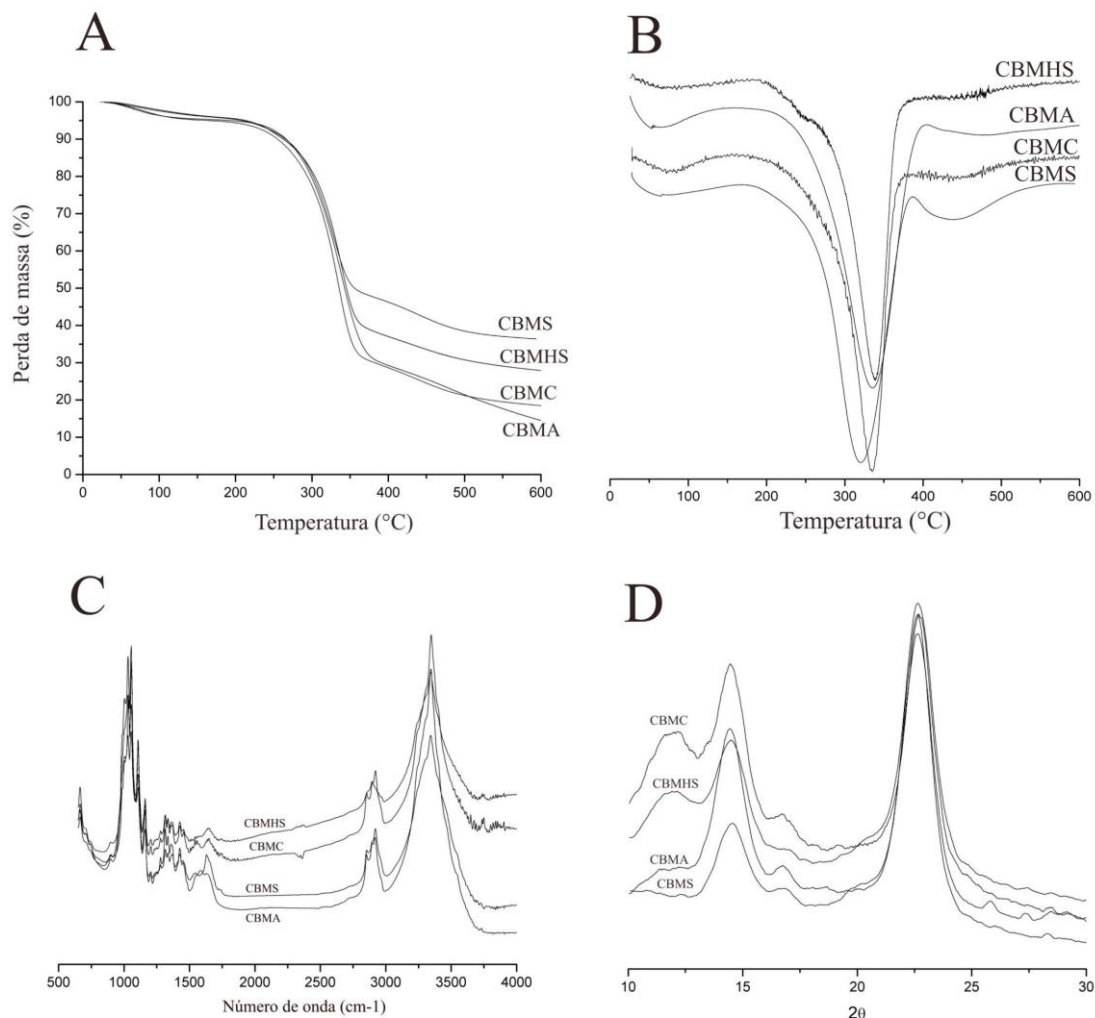
Para a determinação de umidade, as películas de CB em estado úmido foram submetidas à secagem em balança de infravermelho ( $170^\circ\text{C}$ ) após breve drenagem do excesso de água com papel de filtro. Os resultados de FTIR, Raios-X e as curvas de DTG foram expressas em unidades arbitrárias para fim de comparação dos perfis gráficos.

### Resultados e Discussão

Os perfis de degradação térmica (A, B), FTIR (C), e Raios-X (D) das diferentes celuloses obtidas apresentaram boa similaridade entre si (Fig.1). Nas análises de TG verifica-se a existência de três etapas distintas de perda de massa características de CB (Fig. 1A). O primeiro evento, que vai da temperatura ambiente ( $\cong 30^\circ\text{C}$ ) até aproximadamente  $100^\circ\text{C}$ , é responsável pela perda de massa relacionada à evaporação de água residual do processo de secagem. Na segunda fase ( $250$  a  $400^\circ\text{C}$ ), as amostras sofrem uma acentuada perda de massa, relacionada à degradação da celulose (desidratação e decomposição das unidades glicosídicas). A terceira e última fase se estende até  $500^\circ\text{C}$  e corresponde à degradação termo-oxidativa da celulose. Na CBMC e CBMA verifica-se que a temperatura inicial de degradação no início da segunda fase de perda de massa inicia-se a uma temperatura um pouco mais elevada do que para a CBHS e CBMS. Tal diferença pode estar associada a ligações de hidrogênio intra e intermoleculares mais fortes. Porém tal diferença pode ser considerada mínima tendo em vista o erro relacionado ao método. Em todas as celuloses as temperaturas iniciais e máximas de degradação térmica ocorreram ao redor de  $215$  e  $330^\circ\text{C}$  respectivamente (Tabela 2, Fig.1B). Este comportamento térmico está em concordância com os resultados obtidos por Wong e colaboradores [10], que observaram uma máxima de degradação térmica (DTG) da CB no intervalo de  $300$  a  $350^\circ\text{C}$ . As temperaturas iniciais e máximas de degradação (Tabela 2) da CB e os eventos de degradação observados estão em concordância com outros resultados relatados na literatura [7]. Presume-se que as celuloses obtidas nos diferentes meios apresentam estabilidade térmica semelhante. A CB é um material que pode alcançar uma faixa maior de aplicações quando compara-se com a celulose vegetal uma vez que pode ser aquecida até  $350^\circ\text{C}$  antes de começar a se degradar.

**Tabela 2** - Algumas características das celuloses obtidas no presente trabalho

Meio	Temperatura Inicial de degradação ( $^\circ\text{C}$ )	Temperatura máxima de degradação - DTG pico ( $^\circ\text{C}$ )	Cristalinidade (% - $R^2: 0,98$ )	Umidade (%)
MS	204	319	96	97
MC	211	333	93	99
MA	218	336	91	97
HS	210	339	96	99



**Figura 1** - Perfis: Degradação térmica - TGA (A), DTG (B), Espectros de FTIR (C) e Raios-X (D) das celuloses bacterianas obtidas no presente trabalho

Na análise se Raios-X, os índices de cristalinidade estão bastante próximos com maiores valores para CBMS e CBMHS. Todos os índices encontram-se acima de 90% estando assim em concordância com a literatura para CB. Além disso, esses valores são superiores quando comparados com a celulose vegetal [8]. A cristalinidade é uma característica de grande importância para a CB pois guarda uma relação direta com as propriedades mecânicas do material. Os dois picos predominantes encontrados nas análises permitem avaliar a presença de celulose tipo I e II. Em análises de raios-X, a celulose tipo I é caracterizada por picos de  $18^\circ \leq 2\theta \leq 19^\circ$  na região amorfa e  $22^\circ \leq 2\theta \leq 23^\circ$  na região cristalina. A celulose tipo II apresenta picos de  $13^\circ \leq 2\theta \leq 15^\circ$  na região amorfa e  $18^\circ \leq 2\theta \leq 22^\circ$  na região cristalina. A presença de celulose tipo I e II é característica da celulose bacteriana enquanto que a vegetal apresenta apenas celulose tipo I [1,2].

No FTIR várias bandas relevantes características da CB foram encontradas em todas as amostras, muitas delas relacionadas com as ligações OH e CH. Bandas referentes à nitrogênio, estruturas proteicas, ou possíveis contaminantes (1535, 1730-1735, 3150-3220) não foram encontradas, sendo indicativos de pureza nas amostras de CB [9]. O tratamento alcalino empregado na purificação visa apenas a remoção de células bacterianas e outros compostos orgânicos remanescentes do

metabolismo celular após fermentação do meio de cultivo. O alto grau de pureza obtido após o tratamento alcalino é característica da CB que é naturalmente livre de lignina em sua estrutura.

As umidades da CBMS e CBMA apresentaram valores ligeiramente inferiores (97%) quando comparadas com umidades da CBMHS e CBMC (99%). Os resultados estão de acordo com dados da literatura onde mencionam que a CB geralmente apresenta umidade variando de 95 a 99% [5]. A alta capacidade de absorção de água torna a CB ideal para aplicações como curativos e substitutos temporários de pele no tratamento de queimaduras [6].

### Conclusões

Suco de caju, extrato de algaroba e suco de sisal são fontes agroindustriais capazes de produzir CB com boas propriedades térmicas. A utilização de tais meios alternativos para a produção de CB não prejudicou a cristalinidade das películas obtidas.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, Funcap, Finep, Capes, Projeto MPI Rede Agronano – Embrapa e Universidade Federal do Ceará.

### Referências Bibliográficas

1. I. A. N. Donini; D. T. B. De Salvi ; F. K. Fukumoto ; W. R. Lustri ; H. S. Barud ; R. Marchetto; Y. Messaddeq; S. J. L. Ribeiro. *SciELO*. 2010, 35, 165 - 178.
2. P.R. Chawla; I.B. Bajaj; S.A. Survase; R.S. Singhal. 2009. *Food Technol. Biotechnol.* 47, 107-124.
3. A. Kurosumi; C. Sasaki; Y. Yamashita; Y. Nakamura. *Carbohydr. Polym.* 2009, 76, 333-335.
4. S. Hestrin; M. Schramm. *Biochem. Journal.* 1954, 58, 345-352.
5. É. Pecoraro; D. Manzani; Y. Messaddeq S.J.L. Ribeiro. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources.* 2008, 372.
6. W. Czaja; A. Krystynowicz; S.R. Bielecki; M.J. Brown. *Biomaterials.* 2006, 27, 45-151.
7. J. George; K.V. Ramana; S. N. Sabapathy; J.H. Jagannath; A. S. Bawa. *Int. J. Biolog. Macromolec.* 2005, 37, 189-194.
8. H.S. Barud; C.A. Ribeiro; M.S. Crespi; M.A.U. Martines; J.D. Ghys; R.F.C. Marques; Y. Messaddeq; S.J.L. Ribeiro. *J Thermal Anal. Calorim.*, 2007, 87, 815–818.
9. S. Gea; T.C. Reynolds; N. Roohpour; B. Wirjosentono; N. Soykeabkaew; E. Billotti; T. Peijs. *Bioresour. Technol.* 2011, 102, 9105-9110.
10. S.S. Wong; S. Kasapis; Y. M. Tan. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 77, 280-287.
11. J. Siva; R. Toledo; L. Albino. *Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia*, 2001, 38, 891-892.
12. A. Branco; J.D.G. Santos; M.A.M. Pimentel; T.A. Juan; L. S. Lima; J.M. David. *Indust. Crops and Prod.*, 2010, 32, 507-510.
13. D.W.F Oliveira; Í.W.L. França; A.K.N. Félix; J.L. Martins; M.E.A. Giro; V.M.M. Melo; L.R.B. Gonçalves. *Col. Surf. B: Biointerf.*. 2013, 101, 34 - 43.