



13º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS



NATAL - RN
18 a 22 de outubro de 2015

UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA ELABORAÇÃO DE BIONANOCOMPÓSITOS BASEADOS EM CELULOSE BACTERIANA E HIDROXIAPATITA

Eden B. Duarte¹, Bruna S. das Chagas¹, Fábiana K. Andrade², Ana I. Brígida³, Maria F. Borges², Celli R. Muniz², Men de Sá M. Souza Filho², João P. S. Morais⁴, Judith p. A. Feitosa¹, Morsyleide F. Rosa^{2*}

1 – Universidade Federal do Ceará – UFC, Campus do Pici, Fortaleza - CE

2 - Embrapa Agroindústria Tropical – Planalto do Pici, Fortaleza – CE, morsyleide.rosa@embrapa.br

3 - Embrapa Agroindústria de Alimentos – Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro - RJ

4- Embrapa Algodão – Centenário, Campina Grande – PB

Resumo: Questões ambientais têm suscitado o interesse por fontes renováveis e os resíduos agroindustriais tornaram-se uma importante matéria prima para a produção de novos materiais. Este trabalho apresenta o uso de resíduos agroindustriais na obtenção de celulose bacteriana (CB) para posterior preparo de nanocompósitos com hidroxiapatita (HA). A obtenção de CB se deu por cultivo em meio *Hestrin & Schramm*, suco de caju e resíduo líquido de sisal, sob condições estáticas. Após o período de incubação, as membranas de CB foram purificadas e os nanocompósitos preparados por imersão sucessiva das membranas purificadas em soluções de Cloreto de Cálcio (CaCl_2) e Fosfato de Sódio (Na_2HPO_4), seguida de secagem e posterior caracterização. As membranas de CB e os materiais nanocompósitos obtidos foram caracterizados por Análise Termogravimétrica (ATG) e Difração de Raios X (DRX). Adicionalmente, foram realizados testes *in vitro* para os nanocompósitos. Os resultados mostraram que houve produção de celulose a partir dos três substratos estudados, sem a necessidade de suplementação adicional ou alteração do pH. Por meio das caracterizações, foi possível verificar que as películas obtidas apresentaram estrutura e comportamento típicos de celulose bacteriana. Os compósitos apresentaram bioatividade e capacidade de adsorção de proteínas, aspectos que servem de indicativo para a biocompatibilidade desses materiais.

Palavras-chave: Resíduos Agroindustriais, suco de caju, resíduo líquido de sisal, celulose bacteriana, hidroxiapatita.

Use of agro-industrial waste in the preparation of nanocomposites based on bacterial cellulose and hydroxyapatite

Abstract: Environmental issues have supported the interest in renewable sources and agroindustrial residues became a significant resource for the production of new materials. The present work presents the use of agroindustrial residues to obtain bacterial cellulose (BC) for further elaboration of nanocomposites with hydroxyapatite (HA). The production of BC membranes occurred in *Hestrin & Schramm* medium, cashew juice and sisal liquid waste cultivated under static conditions. After the incubation period, the BC membranes were purified and nanocomposites prepared by successive immersion of the purified membranes in solutions of Calcium Chloride (CaCl_2), and Sodium Phosphate (Na_2HPO_4), followed by drying and subsequent characterization. The materials obtained were characterized by Thermogravimetric Analysis (TGA) and X-ray Diffraction (XRD). Additionally, *in vitro* tests were performed for nanocomposites. The results showed the production of cellulose from the three substrates studied, without the need for further supplementation or pH change. In all characterizations, structure and typical behavior of bacterial cellulose were found. The composites showed bioactivity and the adsorption capacity of proteins, which lead to potential biocompatibility of these materials.

Keywords: *Agro-industrial waste, cashew juice, sisal waste, bacterial cellulose, hydroxyapatite.*

Introdução

O interesse crescente por materiais poliméricos que produzam melhor desempenho ambiental tem impulsionado diversos estudos sobre novas fontes inseridas no conceito de química verde. Entre os materiais mais estudados, encontra-se a celulose bacteriana (CB). A CB possui uma estrutura reticulada ultrafina naturalmente nanométrica e quimicamente pura, o que a distingue da celulose obtida a partir de fontes vegetais, usualmente associada à lignina e hemicelulose [1].

Tradicionalmente, ela é produzida a partir de meios de cultura sintéticos, resultando em custo de produção muito elevado, o que limita o seu uso para aplicações diversas [2]. O uso de fontes de carbono e nutrientes de baixo custo, como resíduos da agroindústria, é uma estratégia interessante para superar esta limitação [3]. No processo de beneficiamento da fibra de sisal, por exemplo, gera-se um líquido que responde por mais de 90% do peso da planta, conhecido como suco de sisal. Esse resíduo líquido é totalmente descartado no campo. Até 2009, a quantidade estimada de desperdício já alcançava a marca de dois bilhões de litros anuais, segundo dados da FAPESP. Problemas associados às perdas no campo também envolvem o pedúnculo do caju. Estima-se que 80% do pedúnculo são desperdiçados, valores que chegam a quase 1,5 milhões de toneladas anuais. Essa quantidade do pedúnculo, hoje perdida, representa uma fonte de açúcar e nutrientes, com potencial para ser utilizada como meio de cultura para o desenvolvimento de celulose bacteriana. A celulose bacteriana apresenta uma estrutura altamente cristalina, o que permite seu emprego na obtenção de nanocompósitos com materiais variados, como, por exemplo, hidroxiapatita [4]. As propriedades biológicas da hidroxiapatita sintética são bem documentadas na literatura, sendo utilizada para a reconstrução e preenchimento de falhas ou defeitos ósseos e revestimento de componentes metálicos para fixação óssea [5]. Em geral, compósitos obtidos a partir de celulose bacteriana e hidroxiapatita (CB-HA) também apresentam potencial para aplicação em engenharia de tecido ósseo em razão de características como elevadas propriedades mecânicas, excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade ajustável [4].

Experimental

Elaborou-se um protocolo padronizado de obtenção e purificação de CB, conforme segue. Os substratos foram inoculados [*G. hansenii* (CCT 1431)] com 3% de inóculo (v/v) e mantidos à temperatura de 30°C por pelo menos 168h, em cultivo estático. Posteriormente, realizou-se tratamento térmico com hidróxido de sódio 1 mol/L à temperatura de 80°C por 30min, para a remoção da película formada.

O preparo do compósito foi baseado no proposto por Hutchens et al. [6], segundo a adoção de ciclos de imersão, de 24h cada, em soluções de cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 - 11 \text{ g.L}^{-1}$) e fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 8,52 \text{ g.L}^{-1}$), à temperatura ambiente. Foram realizados seis ciclos.

A fim de se verificar o grau de purificação das películas, a transmitância foi avaliada por meio de medidas em amostras dos detectores plásticos utilizando um Espectrofotometro UV-visível, modelo Cirrus 60ST. As medidas foram efetuadas nos comprimentos de onda de 220 a 850nm.

A análise termogravimétrica foi realizada no equipamento Shimadzu, modelo TGA STA 6000, conduzida sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 40 mL/min, taxa de aquecimento de 10°C/min e temperatura final de 950°C.

Os difratogramas de Raios X foram obtidos no difratômetro da marca Rigaku modelo DMAXB, empregando-se tubo de cobre. O intervalo angular (em 2θ) utilizado foi de 10 a 70° com uma velocidade de varredura de 0,5°/min.

Para o teste de bioatividade, realizado em soluções de SBF (*simulated body fluid*), as amostras foram avaliadas segundo diferenças de massa tomadas antes e depois do experimento.

Estudou-se a adsorção, a 37°C, de albumina de soro bovino, BSA, (Albumin bovine fraction V, pH 7.0) ref. 11930 da Sigma, uma das macromoléculas presentes no líquido sinovial, aos compósitos CB-HA.

Resultados e Discussão

Transmitância

A película, na sua forma natural, recém-extraída do meio de cultivo, não é adequada para caracterização, pela presença de resíduos do meio de cultivo e bactérias. Por isso, adotaram-se procedimentos de purificação e secagem visando à melhoria de suas propriedades. A Fig. 1 apresenta as medidas de transmitância, nos comprimentos de onda de 220 à 850nm, das amostras

secas de celulose não purificadas e após serem submetidas ao processo de purificação. Quanto maior a transmitância, mais o feixe de luz consegue atravessar uma dada amostra, fornecendo indícios sobre sua homogeneidade e pureza. Comparativamente, observa-se que os valores de transmitância das amostras purificadas foram superiores aos das amostras antes de serem submetidas ao tratamento com NaOH, indicando a eficácia da etapa de purificação realizada.

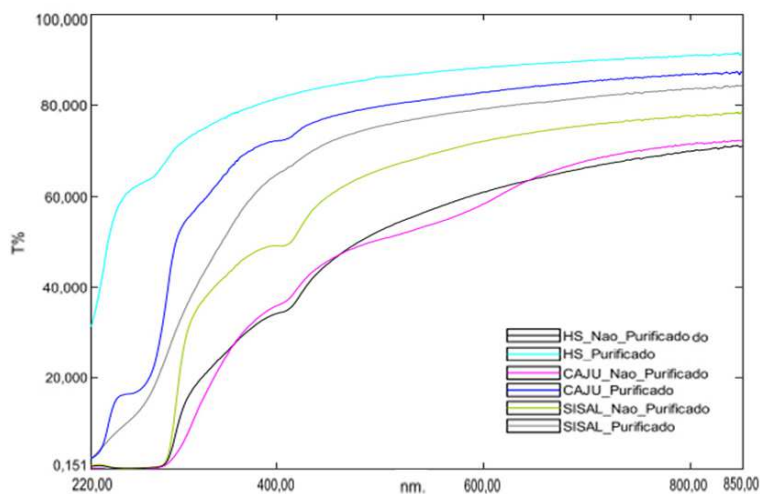


Figura 1 – Curva de transmitância para películas secas purificadas e não-purificadas

Análise Termogravimétrica (ATG)

As curvas termogravimétricas, para as películas, estão representadas na Fig. 2. As três películas apresentaram perfis de degradação semelhantes. Observa-se uma primeira perda de massa (4-8%), aproximadamente a 100°C devido à evaporação de pequena quantidade de água absorvida. Em temperaturas mais elevadas, ocorre outra perda de massa devido aos processos de degradação da celulose, seguida pela formação de resíduos de carbono [7]. Este é o principal evento característico da celulose podendo assumir valores entre 220 e 400°C [7].

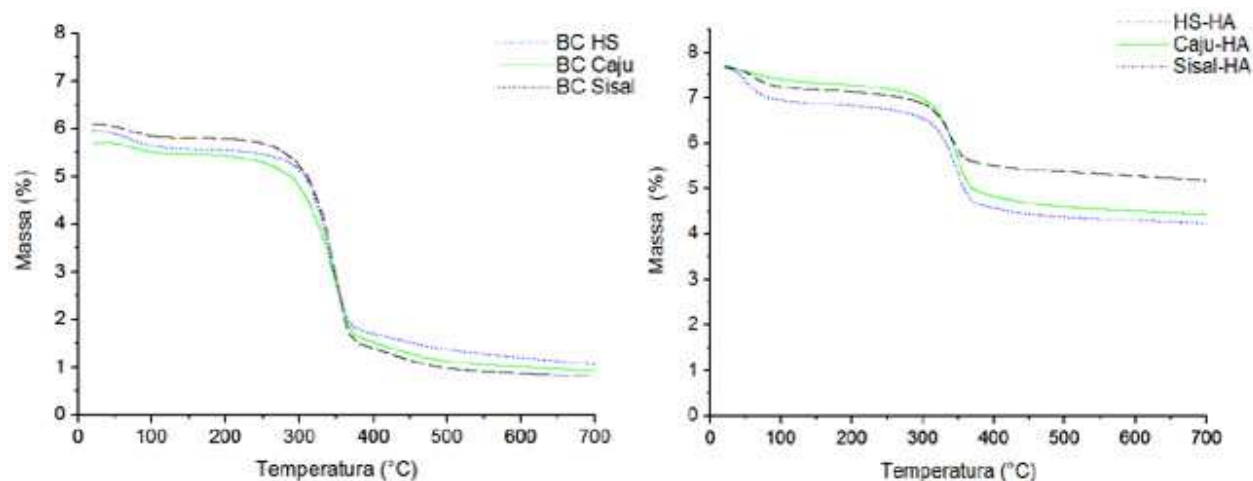


Figura 2 – Curva de ATG para películas e compósitos

A Fig. 2 também mostra os resultados de ATG para os compósitos CB-HA, os quais apresentaram um resíduo de 68,1%, (valor médio) superior ao observado para a membrana de celulose pura, de 24,8%. A quantidade maior de resíduo para os compósitos foi atribuída à presença de hidroxiapatita. Como, em geral, ela apresenta estabilidade térmica na faixa de temperatura considerada (0 - 950°C), a diferença entre esses valores permitiu estimar a quantidade de HA depositada (43,3%).

Difração de Raios X (DRX)

Através do DRX, foram identificados picos característicos de cristais CB-HA (Fig. 3). Para todos os compósitos, a mais alta cristalinidade da hidroxiapatita promoveu redução da intensidade das reflexões dos picos da celulose. Esta diminuição da intensidade dos picos, em comparação com o padrão obtido a partir de membrana de celulose pura, ocorre em função da deposição de HA sobre as nanofibrilas de CB [8]. Picos de difração em $2\theta = 15^\circ$ e $22,5^\circ$ foram atribuídos às fases Ia e Ib da celulose, ao passo que os principais picos de difração característicos da HA foram observados em $2\theta = 31,7^\circ$, $32,2^\circ$, relativos aos planos [211], [112] da rede cristalina.

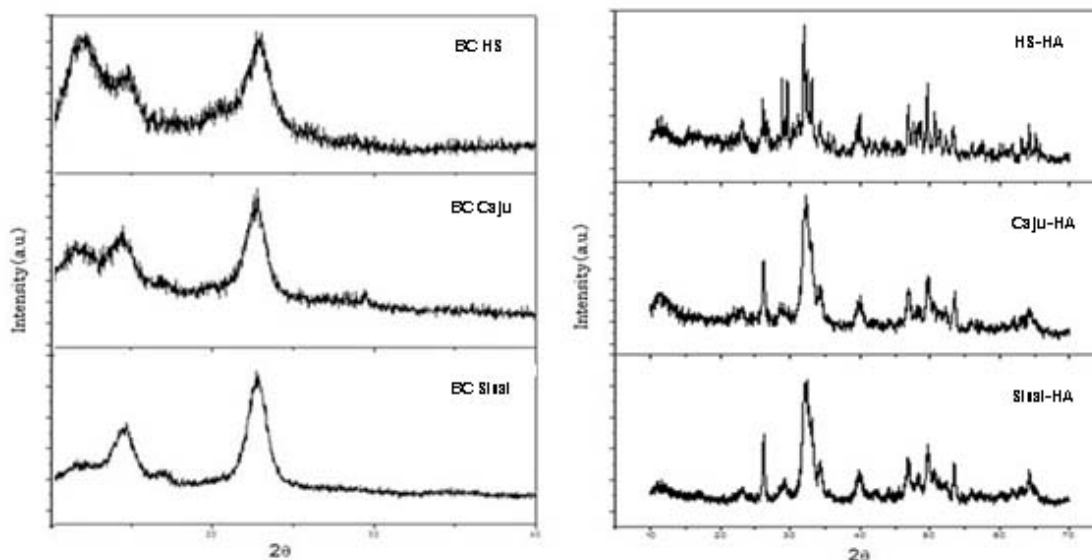


Figura 3 – Difratogramas para películas (BC HS, BC Caju, BC Sisal) e compósitos (HS-HA, Caju-HA, Sisal-HA).

Bioatividade

Os compósitos obtidos foram observados quanto à habilidade de induzir a nucleação de apatita, quando submetidos ao teste de bioatividade em fluido corpóreo simulado (SBF). Em geral, a precipitação de HA na superfície de um material exposto à solução SBF *in vitro* fornece uma indicação se o material é bioativo [9]. A Tabela 1 apresenta as massas iniciais e as massas finais para cada compósito em estudo. A diferença entre as massas final e inicial, correspondem à quantidade de HA depositada. Para as películas puras (CB HS, CB Sisal e CB Caju), que foram utilizadas como controle, também ocorreu deposição, porém em menor extensão.

Tabela 1 – Dados de bioatividade

	Teste de Bioatividade		
	Massa (mg)		
	CB HS	CB Sisal	CB Caju
Inicial	4.8 ± 0.1	4.3 ± 0.1	3.9 ± 0.1
Final	8.6 ± 0.1	7.7 ± 0.3	6.8 ± 0.1
	HS-HA	Sisal-HA	Caju-HA
Inicial	51.8 ± 1.6	39.1 ± 6.2	37.7 ± 2.0
Final	61.0 ± 2.1	47.5 ± 5.4	46.4 ± 2.0

Adsorção de Proteínas (BSA)

A albumina (BSA) é a proteína predominante do plasma e é conhecida como “passivante” das superfícies prevenindo a adesão celular e reduzindo a resposta inflamatória ao material implantado. Daí, sua importância, como fator relevante na biocompatibilidade do material em estudo. Para

determinação da quantidade de BSA adsorvida em cada compósito, procedeu-se inicialmente à elaboração de uma curva padrão partindo-se de concentrações variadas de BSA (0,1-0,5 mg/mL). A quantidade adsorvida nos materiais compósitos foi calculada por diferença entre as concentrações inicial e final de BSA, tomando por base a curva padrão obtida. Observou-se uma diminuição da quantidade estimada de BSA em solução (comparativamente à quantidade inicial), a qual foi atribuída à adsorção nos compósitos CB-HA. A Tabela 2 sumariza os valores calculados.

Tabela 2 – Dados de adsorção proteica para os compósitos CB-HA

	Adsorção de Proteínas		
	Massa (mg)		
	HS-HA	Sisal-HA	Caju-HA
Inicial	-	-	-
Final	47.7 ± 5.1	59.5 ± 3.8	43.4 ± 2.0

Conclusões

Comprovou-se, através das caracterizações realizadas, que suco de caju e resíduo líquido de sisal podem ser empregados como substratos naturais para a formação de celulose bacteriana, sem a necessidade de qualquer suplementação auxiliar.

Demonstrou-se a habilidade da celulose bacteriana em fornecer um “*template*” adequado à formação ordenada de hidroxiapatita, através da elaboração de compósitos. A deposição de hidroxiapatita ocorreu com certa regularidade, ocupando espaços entre as fibras dos biopolímeros, e apresentou comportamento cristalográfico bem próximo à apatita natural ou biológica.

Realizaram-se ainda testes *in vitro* dos materiais compósitos simulando as condições do meio fisiológico, através dos quais se verificou sua capacidade de absorção de proteínas e a bioatividade. Nesta avaliação preliminar, todos os biocompósitos testados mostraram-se aptos ao desenvolvimento de estruturas do tipo *scaffold* para aplicações biomédicas, no que diz respeito à biocompatibilidade e bioatividade.

Agradecimentos

Embrapa Agroindústria Tropical, Universidade Federal do Ceará, Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências Bibliográficas

1. Z. Shi; Y. Zhang; G. O. Phillips; G. Yang *Food Hydrocolloid* 2014, 35, 539.
2. F. P. Gomes; N. H. C. S. Silva; E. Trovatti; L. S. Serafim; M. F. Duarte; A. J. D. Silvestre; C. P. Neto; C. S.R. Freire *Biomass Bioenergy* 2013, 55, 205.
3. A. Cavka; X. Guo; S. Tang; S. Winstrand; L. J. Jönsson; F. Hong *Biotechnol. Biofuels* 2013, 6, 25, 2013.
4. C. J. Grande; F. G. Torres; C. M. Gomez; M. C. Baño *Acta Biomater.* 2009, 5, 1605.
5. 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. *Eclética Química* 2010, 35, 4.
6. S. A. Hutchens; R. S. Benson; B. R. Evans; H. M. O'Neill; C. J. Rawn *Biomaterials* 2006, 27, 4661.
7. J. George; K. V. Ramana; S. N. Sabapathy; J. H. Jagannath; A. S. Bawa *Int. J. Biol. Macromol.* 2005, 37, 4.
8. S. Saska; H. S. Barud; A. M. M. Gaspar; R. Marchetto; S. J. L. Ribeiro; Y. Messaddeq *Int J Biomaterials* 2011, 2011, 1.
9. T. Kokubo; H. Takadama *Biomaterials* 2006, 27, 15.