

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA OBTIDA A PARTIR DO LÍQUIDO DE SISAL

Helder S. L. Lima¹, Elígenes Nascimento¹, Ana. I. Brígida², Fábila. K. Andrade³, Maria. F. Borges³, João. P. S. Morais⁴, Morsyleide. F. Rosa³,

1 - Universidade Federal do Ceará, Curso de Doutorado em Engenharia Química, helderlevi@gmail.com, eligenessampaio@hotmail.com

2 - Embrapa Agroindústria de Alimentos, ana.iraiddy@embrapa.br

3 - Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, fatima.borges@embrapa.br; morsyleide.rosa@embrapa.br; fabiakarine@gmail.com

4 - Embrapa Algodão, joao.morais@embrapa.br

Resumo

O objetivo do presente trabalho consistiu em avaliar a produção de celulose bacteriana (CB) utilizando líquido de sisal como substrato, no cultivo de *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 sob condições estáticas. Para tal, avaliou-se o efeito da concentração de açúcares, pH, suplementação do meio com fontes de nitrogênio e a relação volume /área na produção de CB. A eficiência da purificação e o grau de cristalinidade da CB obtida também foram estudados. A maior produção de CB (3,61 g/L) foi obtida após cultivo estático da bactéria durante 10 dias, utilizando o líquido de sisal suplementado com 7,5 g/L de extrato de levedura, pH 5 e com uma relação volume de meio por área de cultivo de 1,2 mL/cm². Quanto às caracterizações térmicas (ATG e DSC), Raio-X, FTIR e MEV, a CB obtida a partir do líquido do sisal apresenta perfis semelhantes à CB obtida em meio padrão.

Introdução

A Celulose bacteriana (CB) é um polímero natural biodegradável de fácil obtenção e grande potencial, apresentando alta resistência mecânica, alta cristalinidade, biocompatibilidade, alta porosidade e alta capacidade de absorção de água. Tais características tornam a CB um material versátil e adequado para aplicações na área biomédica, nas indústrias de papel e de alimentos e como dispositivos biotecnológicos. A CB apresenta a grande vantagem de ser naturalmente livre de lignina e hemiceluloses e pode ser facilmente obtida pelo cultivo de bactérias do gênero *Gluconacetobacter* em meio contendo açúcares e nitrogênio orgânico, apresentando-se sob a forma de uma película quando o processo fermentativo ocorre estaticamente [2].

No Nordeste do Brasil a produção de sisal (*Agave sisalana*) se destaca tanto pela sua importância econômica como pela quantidade de resíduos gerados em seu beneficiamento. Durante o processo de beneficiamento das fibras do sisal, que correspondem a apenas 4% da biomassa obtida, cerca de 15% de resíduos sólidos são gerados e o restante corresponde ao líquido de sisal (água e sólidos solúveis), rico em açúcares, minerais e outros compostos orgânicos. Poucos trabalhos têm sido desenvolvidos no âmbito de agregar valor a este resíduo e atualmente ele é desperdiçado no campo gerando a contaminação do solo [1]. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho consiste em avaliar a produção de CB utilizando o líquido do sisal como substrato alternativo.

Experimental

Caracterização do líquido de sisal

O líquido de sisal foi gerado em sistema produtivo de sisal, localizado em Pocinhos – PB/ Brasil, e fornecido pela Embrapa Algodão. O mesmo foi caracterizado quanto à sua composição de açúcares (HPLC), pH e nitrogênio total pelo método de Kjeldahl [7].

Otimização da produção de CB utilizando o líquido de sisal

Para avaliar o potencial do líquido de sisal como meio fermentativo na produção de CB, a bactéria *G. hansenii* ATCC 23769, foi cultivada estaticamente a 30°C (B.O.D) em diferentes condições. Utilizou-se inóculo de 3% (v/v) preparado após ativação e incubação da bactéria em caldo manitol. No preparo dos meios, após diluição, ajuste de pH e suplementação do líquido de sisal (quando necessário), procedeu-se à esterilização (121°C por 15 minutos). Avaliou-se o efeito da concentração inicial de açúcares (2,5 a 15 g/L), pH inicial (3 a 8), suplementação com fontes de nitrogênio, tempo de cultivo (0 a 22 dias) e relação volume/área (0,6 a 3,6 mL/cm²) na produção de CB (g/L) e rendimento (%). A suplementação do meio com as fontes de nitrogênio foi avaliada através de um planejamento experimental 2² completo com ponto central e axial. A faixa estudada foi de 0 a 15 g/L de extrato de levedura e 0 a 10 g/L de sulfato de amônio. Em todas as etapas, após as fermentações, as películas de CB foram recolhidas e os meios fermentados submetidos às análises de pH e açúcares totais [5]. A CB foi purificada por tratamento alcalino, através da imersão das películas em solução de NaOH 1N + H₂O₂ 1% (v/v) por uma hora à 80°C. Posteriormente as películas foram lavadas com água destilada até neutralização. A massa seca de CB foi determinada através de secagem e pesagem da película purificada em balança de infravermelho (170°C).

Caracterização da CB obtida

A película de CB obtida nas condições otimizadas (CB SISAL) e a película obtida em meio padrão HS [4] (CB HS) foram caracterizadas conforme descrito a seguir: ATG (analisador termogravimétrico Shimadzu - atmosfera de nitrogênio), DSC (DSC Q20 dpUnion - atmosfera de nitrogênio), FTIR (espectrômetro Nicolet 800 associado a uma célula MTECH PAS), MEV (amostra revestida com platina - microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM940A), Umidade (secagem à 170°C em balança de infravermelho), Espessura da película (micrômetro digital) e DRX (difratômetro da marca Rigaku modelo DMAXB, com tubo de Cobre). O índice de cristalinidade (IC) foi estimado por deconvolução utilizando-se função Gaussiana. A dimensão das nanofibras foi calculada a partir das análises de MEV.

Resultados e Discussão

O líquido de sisal apresentou as seguintes características físico-químicas: pH (4,48), 15,05 g/L de açúcares totais (82% deles constituídos por glicose, 10% de sacarose e 8% de frutose), 0,62 g/L de nitrogênio total e 3,84g/L de proteína bruta.

A linhagem *G. hansenii* ATCC 23769 apresentou capacidade de sintetizar CB em todo o intervalo da concentração de açúcares estudado com destaque para a concentração de 15 g/L de açúcares totais onde se obteve a maior produção (2,6 g/L). Mesmo com o aumento gradativo na produção de CB, o rendimento permaneceu estatisticamente constante (em torno de 25%) em todas as diluições testadas. A fermentação no líquido de sisal destacou-se bastante uma vez que em 2,5 g/L de açúcares totais a produção de CB (0,66 g/L) foi próxima à obtida em meio padrão HS (0,54 g/L) que é constituído por uma quantidade de açúcares 8 vezes maior. Quanto ao pH inicial da fermentação, a maior produção de CB foi observada nas condições de pH 5 e 6 (2,60 g/L), sendo o melhor rendimento em pH 5 (23,29%). Não houve produção de CB nas condições de pH 3 e 8. Quanto à suplementação do meio com fontes de nitrogênio apenas os efeitos lineares ($\alpha=0,1$) foram significativos, sendo o efeito do extrato de levedura positivo e o efeito do sulfato de amônio negativo. A maior produção (3,38 g/L) foi obtida quando suplementou-se

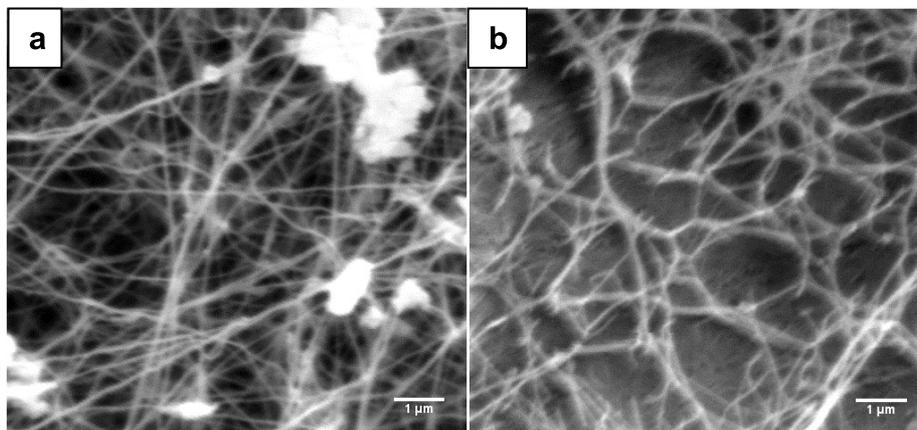
unicamente com 7,5 g/L de extrato de levedura. Nenhuma variável foi significativa para o rendimento. Quanto ao tempo de cultivo, observou-se um aumento da produção de CB com o tempo, acompanhada da redução do teor de açúcares totais, sendo a maior produção obtida no décimo dia. Quanto à relação volume/área, a maior produção (3,61 g/L) foi obtida quando a bactéria foi incubada utilizando uma relação de volume de meio por área de cultivo de 1,2 mL/cm². Houve aumento na espessura da película de 0,08 a 2,85 mm no intervalo de 0,6 a 2,4 mL/cm². Em 1,8 e 2,4 mL/cm² a produção por área foi estatisticamente igual (□ 57 g/m²), porém com variação da espessura de 1,95 para 2,85 mm. Tal resultado relaciona-se com diferenças na porosidade da película obtida. Os dados obtidos acima estão de acordo com a literatura onde as melhores produções de CB são obtidas em meios na faixa de 10 a 20 g/L de açúcares, pH entre 5 e 6 e suplementados com extrato de levedura ou peptona [3].

As características da CB obtida no líquido de sisal foram bastante semelhantes à CB obtida no meio padrão HS (Tabela 1, Figura 1) e estão em acordo com a literatura [6].

Tabela 1. Algumas características das películas de CB obtidas

	CB SISAL	CB HS
Índice de cristalinidade - IC (%)	93,2	91
Umidade da película (%)	97,66 ± 0,34	99,18 ± 0,06
Dimensão nas nanofibras (nm)	73,86 ± 16,20	80,39 ± 23,03
ATG - 1ª perda de massa - intervalo (°C)	0 - 100	0 - 100
ATG - 2ª perda de massa - intervalo (°C)	284 - 400	276 - 400
DTG (pico) (°C)	330	328

Figura 1. Micrografias das películas de CB obtidas no aumento de 10000x: (a) CB SISAL, (b) CB HS.



Na análise termogravimétrica observou-se que as películas obtidas (CB SISAL e CB HS) apresentaram perfis de degradação com boa similaridade entre si. Verificou-se a existência de três etapas distintas de perda de massa e máxima degradação 330°C (DTG), sendo portanto característico de CB. No DSC observou-se um pico endotérmico em aproximadamente 100°C referente à perda de água e um aumento do fluxo de calor em torno de 350°C sendo referente à degradação da celulose. A utilização do líquido de sisal como meio alternativo para produção de CB não comprometeu as propriedades térmicas do material resultante. 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°C antes de começar a se degradar. Quanto à análise de Raio-X ambas as amostras apresentaram aspecto semelhante com a presença de dois picos dominantes que permitem avaliar a presença de celulose tipo I e II. Os resultados de FTIR mostraram várias bandas relevantes típicas de CB, muitas delas relacionadas com ligações OH e CH. Bandas referentes à nitrogênio, estruturas protéicas, ou possíveis contaminantes não foram

encontradas, sendo indicativos de pureza das amostras de CB e a eficiência do método de purificação utilizado. Não houve diferença significativa na dimensão da nanofibras observadas na análise de MEV (Figura 1).

Conclusão

O líquido do sisal é um substrato bastante promissor para a produção de CB. A condição que oferece a maior produção de CB pela bactéria *G. hansenii* ATCC 23769 é obtida através do cultivo por 10 dias sob condições estáticas utilizando meio à base de líquido de sisal contendo 15 g/L de açúcares, pH inicial 5, suplementação com 7,5 g/L de extrato de levedura e com uma relação volume de meio/área superficial de cultivo de 1,2 mL/cm². A CB obtida do líquido de sisal apresenta propriedades semelhantes à celulose obtida em meio padrão HS quanto à capacidade de absorção de água, estabilidade térmica, pureza e dimensão das nanofibras.

Referências bibliográficas

1. ANDRADE, R; JORNELAS, J.; BRANDÃO, W. Situação atual do sisal na Bahia e suas novas possibilidades de utilização e aproveitamento. Comunicação. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/sites/default/files/3_comunicacao01v9n1.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2014
2. CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, v. 47, n. 2, p. 107-124, 2009.
3. ÇOBAN, E. P. L.; BIYIK, H. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter lovaniensis* HBB5. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 27, p. 5346-5354, 2011.
4. HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*, v. 58, n. 2, p. 345-352, 1954.
5. MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical chemistry*, v. 31, n. 3, p 426–428, 1959.
6. PECORARO, É.; MANZANI, D.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Bacterial Cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: Preparation, Properties and Applications. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, p. 372, 2008.
7. YASUHARA, T.; NOKIHARA, K. High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n.10, p. 4581-4583, 2001.