



13º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS



NATAL - RN
18 a 22 de outubro de 2015

AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA DE SUCO DE CAJU

Helder L. Lima¹ (D), Maria J. M. Carneiro¹ (IC), Eligenes S. Nascimento¹ (D), André L. S. Pereira¹ (D), Matheus de O. Barros² (IC), Maria K. A. Barroso¹ (IC), João P. S. Morais⁴, Maria F. Borges³, Morsyleide F. Rosa³

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

2 – Instituto Federal do Ceará - IFCE, Campus Fortaleza, Fortaleza – CE

3- Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza - CE

4 - Embrapa Algodão, Campina Grande, PB

Resumo: No presente trabalho, avaliou-se a produção de películas de celulose bacteriana (CB) obtidas por cultivo de bactéria super produtora (*Gluconacetobacter hansenii* ATCC 53582) em suco de caju puro (em pH 5). As películas obtidas em suco de caju apresentaram boas propriedades térmicas, pureza, cristalinidade e capacidade de absorção de água. A produção de CB foi de 2,28 g/L correspondendo a 49% da produção em meio sintético padrão, sendo bastante expressiva quando comparada com alguns resultados da literatura para meios não suplementados.

Palavras-chave: Biotecnologia, Polímero natural, Fontes agro-industriais

PRELIMINARY EVALUATION OF BACTERIAL CELLULOSE PRODUCTION FROM CASHEW JUICE

Abstract: In present work, bacterial cellulose (BC) films production was evaluated. BC was obtained by superproducer bacteria cultivation (*Gluconacetobacter hansenii* ATCC 53582) using cashew juice (pH 5). The BC films from cashew juice presents good thermal properties, purity, crystallinity and water absorption capacity. BC production was 2.28 g/L and, corresponds to 49% when compared with synthetic medium. This production is very significant when compared with literature results for not supplemented media.

Keywords: Biotecnology, Natural polymer, Agro-industrial sources

Introdução

A celulose (C₆H₁₀O₅)_n, polímero de maior abundância na natureza, não é encontrada apenas em plantas; outros seres vivos como bactérias são capazes de produzi-la [1,2]. A celulose sintetizada por bactérias, conhecida como celulose bacteriana (CB), possui propriedades físicas e químicas bastante singulares, como alta pureza (livre de lignina, pectina e hemicelulose), alta cristalinidade, excelente biodegradabilidade, biocompatibilidade, elevada capacidade de absorção de água e alta resistência mecânica [2].

Bactérias do gênero *Gluconacetobacter* são comumente utilizadas para produções significativas de CB [1,3]. Algumas linhagens desse gênero são conhecidas como bactérias "super produtoras" por apresentarem naturalmente uma grande capacidade de sintetizar celulose, gerando estruturas de grande espessura quando comparadas com outras linhagens da mesma espécie que também são utilizadas para produzir CB. A linhagem *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 53582 destaca-se nesse grupo sendo bacilos gram-negativos, estritamente aeróbios e não patogênicos. Desde a descoberta da CB autores investigam a possibilidade de utilização de meios de cultura alternativos para a produção e em muitos casos a substituição de meios sintéticos é viável [4,5]. Novas fontes de carbono de baixo custo ainda são investigadas.

No Nordeste a cultura do caju se destaca pela sua importância econômica e quantidade de resíduos gerados em seu beneficiamento. Na produção do caju, cujo principal produto de interesse é a

castanha, há um desperdício de 90% de todo o pedúnculo gerado, que por sua vez representa 90% do peso total do caju. Atualmente, o suco de caju tem sido estudado em processos fermentativos por ser rico em nutrientes e apresentar uma alternativa viável para a produção de biossurfactantes, proteínas unicelulares, oligossacarídeos e outras substâncias [6,7]. A agregação de valor ao suco de caju pode ser obtida 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.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho consiste em avaliar a produção e caracterizar películas de CB produzidas por *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 53582 em suco de caju como fonte alternativa de carbono.

Experimental

Produção e purificação das películas de CB

As películas de CB foram produzidas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Embrapa Agroindústria Tropical, após o cultivo estático da bactéria *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 53582 em meio padrão HS (pH 5) (Hestrin e Schramm) [8] e em suco de caju puro (pH 3,7). Após esterilizados (autoclave, 121 °C, 15 minutos) e inoculados (3% v/v), os meios foram incubados a 30°C por 10 dias em frascos Schott de 250mL contendo 70 mL de meio. Após o processo fermentativo, as películas formadas foram purificadas através de tratamento alcalino em solução de NaOH 4% (m/v) + H₂O₂ 1% a 80 °C por 1 hora. As películas foram lavadas em água destilada até pH neutro. A produção de CB (g/L) foi determinada após secagem da película em balança de infravermelho (170°C) e o rendimento $Y_{X/S}$ (%) calculado após divisão da produção de CB (g/L) pelo consumo de açúcares (g/L), sendo a fração expressa em porcentagem. O teor de açúcares do extrato fermentativo (meio residual após remoção da película da superfície) foi determinado pelo método de DNS [9] e o pH final do extrato foi obtido por leitura direta em pHmetro.

Caracterizações das películas de CB

As películas purificadas foram caracterizadas por Análise Termogravimétrica (TGA), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), raios-X, umidade, espessura e capacidade de absorção de água. As análises termogravimétricas foram realizadas em analisador termogravimétrico Shimadzu modelo TGA-50 sob atmosfera de nitrogênio. Os espectros vibracionais das amostras foram obtidos, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), em um espectrofotômetro Agilent, modelo Cary 660, com resolução de 4 cm⁻¹ e 25 varreduras. As análises de raios-X (DRX) foram realizadas no Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará, sendo conduzidas em difratômetro da marca Rigaku modelo DMAXB, com tubo de cobre. O índice de cristalinidade foi estimado pelo método de Segal [10], usando a Eq. 1.

$$IC = \frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \times 100 \quad (1)$$

A umidade foi calculada por secagem em balança de infravermelho (170°C). A espessura das películas úmidas foi obtidas em micrômetro digital (Mitutoyo). Para determinar a capacidade de absorção de água das películas de CB produzidas, imergiram-se as películas liofilizadas em água destilada e após períodos de tempos a massa destas foi medida até se atingir massa constante. O percentual de água absorvida ($W\%$) foi calculado pela Eq. 2 onde m_h é massa da película úmida e m_s massa da película seca.

$$W(\%) = \frac{m_h - m_s}{m_s} \times 100 \quad (2)$$

Resultados e Discussão

Na Fig. 1 são apresentadas fotos das películas de CB obtidas. Alguns parâmetros fermentativos são apresentados na tabela 1. A produção de CB no meio alternativo foi de 2,28 g/L correspondendo a 49% da produção em meio sintético HS. O rendimento do processo foi inferior 6,1% já que houve consumo de grande quantidade de açúcares (35 g/L) e menor conversão em celulose. O pH final do processo foi inferior ao inicial nos dois meios indicando que houve produção de ácidos orgânicos durante a síntese de CB. Tal fato é esperado no cultivo desse tipo de bactéria. Ressalta-se aqui a capacidade de adaptação da bactéria super produtora em ambientes com baixa acidez como observa-se no meio suco de caju onde houve produção de CB em pH abaixo de 4. A literatura reporta que a síntese de CB é favorecida em pH entre 4 e 6, podendo haver paralisação da mesma em ambientes muito ácidos.

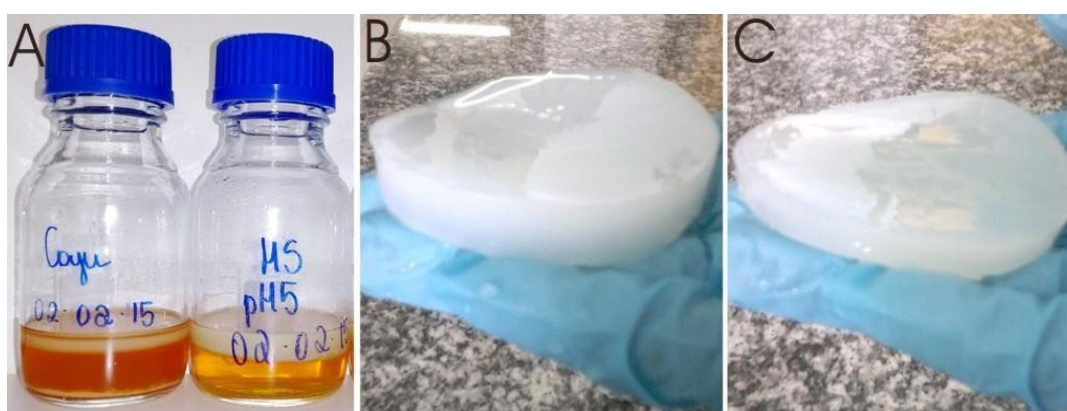


Figura 1 - Películas de CB: Películas impuras no sistema de cultivo (A), película purificada de meio sintético HS (B) e película purificada de meio alternativo suco de caju (C).

Tabela 1 - Parâmetros fermentativos do processo produtivo de CB após 10 dias de cultivo da bactéria *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 53582

Meio	Teor de açúcares redutores (g/L)	Nitrogênio total (g/L)	Produção(g/L)	Consumo de açúcares (%)	Rendimento - $Y_{X/S}$ (%)	pH inicial	pH final do extrato fermentado
HS	20	0,95	4,63 ^a	62,3 ^a	36,1 ^a	5,00 ^a	4,12 ^a
Suco de Caju	103*	0,4*	2,28 ^b	34,2 ^b	6,1 ^b	3,73 ^b	3,23 ^b

Letras diferentes na coluna representam valores com diferença significativamente pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$)

*Dados obtidos após caracterização prévia - Nitrogênio total pelo método de Kjeldal [13] e açúcares por DNS [9].

O suco de caju puro apresenta alta concentração de açúcares, baixo teor de nitrogênio e pH inferior a 5, fatores que podem ser responsáveis pela produção inferior de CB quando comparada a obtida com o meio sintético. Entretanto convém ressaltar que ainda assim essa produção de 2,28 g/L é bastante expressiva quando se compara com resultados da literatura. Em estudos da produção de CB utilizando sucos de frutas (laranja, abacaxi, maçã, pêra japonesa e uva) como fonte de carbono atingiu-se produções inferiores a 2 g/L ao utilizar os sucos sem suplementação e produções bem mais elevadas (1,8 a 5,9 g/L) ao suplementar o meio com fonte de nitrogênio [5].

Quanto às caracterizações das películas obtidas, os perfis de degradação térmica apresentaram boa similaridade entre si com existência de duas etapas distintas de perda de massa características de

Celulose bacteriana. As temperaturas iniciais e máximas de degradação (Tabela 2) e os eventos de degradação observados estão em concordância com os resultados relatados na literatura [14], sendo o primeiro deles relacionado com a perda de água, o segundo à decomposição da cadeia polimérica. As celulosas obtidas nos diferentes meios apresentam estabilidade térmica semelhante (Fig. 2).

Tabela 2 - Características físicas e químicas das celulosas obtidas.

Celulose	Temperatura Inicial de degradação (°C)	Temperatura máxima de degradação - DTG (pico) (°C)	Cristalinidade (% - R ² : 0,98)	Umidade (%)	Capacidade de absorção de água (%)	Espessura da película úmida (mm)
CB HS	265	347	81	98,9 ^a	5971	8,8 ^a
CB CAJU	298	354	74	99,1 ^a	8140	5,5 ^b

Letras diferentes na coluna representam valores com diferença significativamente pelo teste de tukey ($\alpha=0,05$)

Os espectros (FTIR) da CB HS e CB CAJU (Fig. 2) apresentaram bandas características de celulose bacteriana [11,12] como 3328 e 2872 (vibrações de estiramento O-H e C-H), 1626 cm⁻¹ (vibração de O-H de moléculas de água absorvida), 1400 cm⁻¹ (deformações de HCH e OCH), 1141 cm⁻¹ (estiramento C-O-C e deformação de CH), 1096 cm⁻¹ (vibração C-C das unidades glicosídicas da celulose) e 1036 cm⁻¹ (deformações C-O de C-OH de carboidratos). Bandas referentes a nitrogênio de proteínas (1535, 1730-1735, 3150-3220) ou de contaminantes não foram encontradas nos espectros confirmando a eficiência da etapa de purificação das películas. O alto grau de pureza obtido após o tratamento alcalino é característica da CB que é naturalmente livre de lignina e hemicelulose em sua estrutura.

As duas celulosas apresentam alta cristalinidade sendo a CB CAJU um pouco inferior e estão em concordância com o esperado para CB que naturalmente apresenta valores superiores à celulose vegetal [3] (Fig. 2). A umidade não foi afetada pelo uso do suco de caju para produzir CB e as películas apresentaram elevada capacidade de absorver água, sendo capazes de absorver mais de 5000 vezes o valor da sua massa inicial ao final de 30 horas de imersão. Em 15 min as celulosas apresentaram absorção de água de 3000%. A alta capacidade de absorção de água torna a CB ideal para aplicações como curativos e substitutos temporários de pele no tratamento de queimaduras [15]. A espessura das películas úmidas apresentaram diferenças (Tabela 2) sendo a película obtida com o caju de menor espessura (5,5 mm) quando comparada com o meio padrão (8,8 mm). Películas obtidas em diferentes espessuras podem direcionar para aplicações específicas

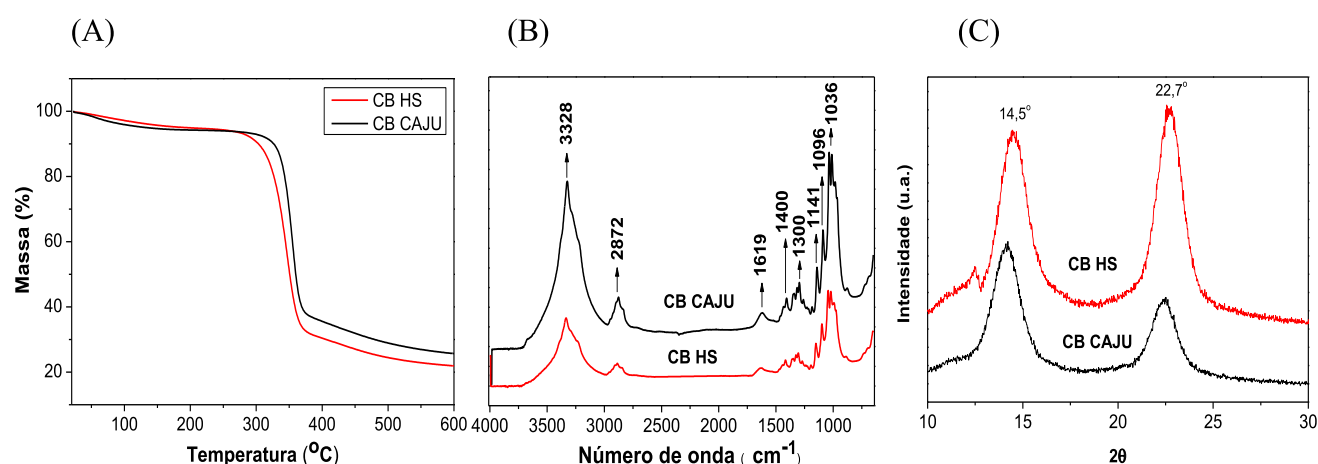


Figura 2 – Perfis de: Degradação térmica (A), Espectros de FTIR (B) e Raios-X (C) das celulosas obtidas.

Conclusões

É possível obter CB com boas propriedades térmicas, pureza, cristalinidade e capacidade de absorção de água utilizando suco de caju como meio alternativo. O uso do suco de caju como fonte de carbono para a produção de CB não comprometeu as características desejáveis esperadas para aplicações tecnológicas da CB. A produção de CB no meio alternativo foi inferior à obtida em meio sintético HS, porém ainda assim pode ser considerada bastante expressiva quando comparada com resultados da literatura que utilizaram meios sintéticos ou outros meios alternativos para a obtenção de membranas de CB em cultivo estático.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, Funcap, Finep, Capes, Projeto MP1 Rede Agronano – Embrapa e Universidade Federal do Ceará.

Referências Bibliográficas

1. P.R. Chawla; I.B. Bajaj; S.A. Survase; R.S. Singhal. 2009. *Food Technol. Biotechnol.* 47, 107-124.
2. I.A.N. Donini; D.T.B. De Salvi ; F. K. Fukumoto ; W.R. Lustrri ; H. S. Barud ; R. Marchetto; Y. Messaddeq; S. J. L. Ribeiro. *SciELO.* 2010, 35, 165 - 178.
3. D. Klemm; D. Schumann; U. Udhardt; S. Marsch. *Progr. Polym. Sci.* 2001, 26, 1561 - 1603.
4. M. Shoda. *Biotechnol. and Bioprocess Eng.* 2005, 10, 1–8.
5. A. Kurosumi; C. Sasaki; Y. Yamashita; Y. Nakamura. *Carbohydr. Polym.* 2009, 76, 333-335.
6. 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. *Coll.Surf. B: Biointerf.* 2013, 101, 34 - 43.
7. C.P.M.L. Fontes; M.A. Silveira; A.A. Guilherme; F.A.N. Fernandes; S. Rodrigues. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2013, 2, 69-75.
8. S. Hestrin; M. Schramm. *Biochem. J.* 1954, 58, 345-352.
9. G.L Miller. *Anal. Chem.*, 1959, 31, 426–428.
10. L. Segal; J.J. Creely; A.E. Martin; C.M. Conrad. *Text Res J.* 1959, 29, 786–794.
11. M.M. Sanz; A. L. Rubio; J. M. Lagaron. *Carbohydr. Polym.* 2011, 85, 228-236.
12. S. Gea; T.C. Reynolds; N. Roohpour; B. Wirjosentono; N. Soykeabkaew; E. Billotti; T. Peijs. *Bioresour. Technol.* 2011, 102, 9105-9110.
13. T. Yasuhara; K. Nokihara. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 4581-4583.
14. J. George; K.V. Ramana; S. N. Sabapathy; J.H. Jagannath; A. S. Bawa. *Int. J. Biolog. Macromolec.* 2005, 37, 189-194.
15. W. Czaja; A. Krystynowicz; S.R. Bielecki; M.J. Brown. *Biomaterials.* 2006, 27, 45-151.