



PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE NANOCELULOSE BACTERIANA A PARTIR DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Palavras-Chave: NANOCELULOSE BACTERIANA, RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS, BIOSÍNTESE

Autores(as):

GABRIELLA SOARES ANTUNES, FEA - UNICAMP

Prof.^a Dr.^a ROSANA GOLDBECK (Orientadora), FEA - UNICAMP

DANIELLE MATIAS RODRIGUES (Co-Orientadora), FEA - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Ao longo dos últimos anos, a procura por produtos sustentáveis vem ganhando um crescente interesse por parte das indústrias, e nesse sentido, pesquisas voltadas a este tema vêm ganhando destaque. Por esse motivo, é de grande interesse pesquisas que desenvolvam materiais substitutos de polímeros derivados de petróleo e polímeros naturais de extração nociva ao meio ambiente, sendo necessário que estes biopolímeros possuam características semelhantes aos polímeros sintéticos. Nesse viés, a nanocelulose bacteriana surge como um biopolímero de estrutura semelhante à celulose de origem vegetal com a vantagem de não conter hemicelulose e lignina, não sendo necessária dessa forma a extração destes compostos utilizando processos dispendiosos e que geram resíduos químicos que precisam de tratamento para o seu descarte (COSTA et al, 2017). A nanocelulose bacteriana é biosintetizada por diferentes cepas de bactérias, destacando-se a *Gluconacetobacter xylinus* que utiliza glicose como fonte de carbono na biossíntese de membranas de nanocelulose bacteriana. As cepas podem utilizar resíduos lignocelulósicos com alta disponibilidade de glicose como fonte de carbono para os seus processos metabólicos.

Para ocorrer a biosíntese de nanocelulose a partir dos substratos já citados são realizadas algumas etapas. A primeira etapa consiste no pré tratamento das biomassas para expor a celulose presente na parede vegetal, a segunda etapa é a da hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos, a qual quebra a celulose, um polissacarídeo, e a transforma em glicose e celobiose, mono e dissacarídeos (SOARES et al., 2013). A terceira etapa consiste na fermentação destes carboidratos, etapa na qual por meio da via das pentoses fosfato a bactéria utiliza glicose para sintetizar celulose, que é externalizada para o meio por meio de mecanismos exportadores (RODRIGUES et al., 2010). Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo produzir membranas de nanocelulose bacteriana

sintetizada por cepas da bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, utilizando como substratos resíduos agroindustriais lignocelulósicos como bagaço de cana e serragem de eucalipto. A membrana de nanocelulose produzida foi caracterizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

METODOLOGIA:

Biomassas Lignocelulósicas

Neste trabalho foram utilizados resíduos lignocelulósicos como bagaço de cana (cedido pela empresa Raízen) e serragem de eucalipto grandis (cedido pela empresa ABT). Ambos os resíduos foram previamente pré-tratados hidrotérmicamente a 190°C, 1 atm, durante 10 minutos (ALMEIDA, 2013).

Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar e da serragem de eucalipto seguiu a metodologia proposta por (GOLDBECK et al., 2014) com adaptações. Para os ensaios foi utilizada uma carga de sólidos de 2% aplicando o coquetel enzimático Cellic CeTec3 da Novozymes® diluído em tampão acetato 0,05 M, pH 5,0 a uma concentração final de 20 FPU/g de celulose, sendo posteriormente incubadas em agitador orbital do tipo shaker a 50 °C e a uma agitação de 200 rpm, durante 120 horas para o bagaço de cana e 216 horas para a serragem de eucalipto. Foram coletadas alíquotas a cada 24 horas, sendo posteriormente centrifugadas a uma velocidade de 3000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi recolhido para posterior quantificação de açúcares produzidos. A eficiência da hidrólise enzimática foi calculada conforme a Equação 1.

$$Eficiência\ de\ Hidrólise\ (\%) = \frac{concentração\ de\ glicose\ (\frac{g}{L})}{concentração\ de\ celulose\ da\ amostra\ (\frac{g}{L})} \times 100\%$$

(Equação 1)

Após a determinação do melhor tempo de hidrólise enzimática os hidrolisados foram concentrados três vezes em rota-evaporador Marconi MA (120 06030340) conectado a bomba de vácuo Marconi TE – 058 (919358) e a um banho refrigerado Tecnal TE – 084 (00088). A temperatura de trabalho do rota-evaporador foi de 50° C. Após a concentração o hidrolisado foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 0,5 atm (HENDIRA, 2010).

Caracterização dos Hidrolisados

As concentrações de glicose presentes nos hidrolisados foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando cromatógrafo modelo Accela da Thermo Scientific® e separação por coluna modelo HPX mantida à 37 °C. A fase móvel foi uma solução de H2SO4 (0,1mM), pH 2,6, com vazão de 0,6 mL/min.

Meio de Cultivo

O meio de cultivo sintético Hestrin & Schramm (HS) foi preparado contendo 20 g/L de glicose, 5 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de levedura, 2,7 g/L de fosfato de sódio e 1,15 g/L de ácido cítrico dissolvidos em água destilada, sendo posteriormente autoclavado 121°C, 1 atm, durante 20 minutos (RODRIGUES et al., 2010). A reativação da cepa bacteriana *Gluconacetobacter Xylinus* foi realizada utilizando o meio

complexo Hestrin Schramm em erlenmeyer de 250 mL com agitação de 150 rpm por 48 horas. Após esse período o inóculo foi preparado a partir da centrifugação das células a 9.000 RPM durante 10 minutos e posteriormente lavadas com água destilada. A concentração de células do inóculo foi padronizada para uma leitura de 0,1 de densidade óptica a 600 nm (OD 600 nm) (JANICE, et al. 2011).

Produção de Nanocelulose Bacteriana

A fermentação estática para a produção de nanocelulose bacteriana foi realizada em placas de cultivo de células de 6 poços. Os cultivos foram preparados a partir da adição de 9 mL de meio (Hestrin Schramm) e 1 mL de inóculo em incubadora BOD a 28°C durante 10 dias. O cultivo agitado foi realizado em frascos erlenmeyer de 50 mL contendo 18 mL de meio de cultivo e 2 mL de inóculo sob agitação de 200 rpm durante 10 dias. A cada 48 horas alíquotas foram coletadas para a avaliação do crescimento bacteriano, quantificação de açúcares e formação das membranas.

Caracterização das membranas

Para a caracterização das membranas, foram analisadas três amostras, cada uma com 8 dias de cultivo, produzidas a partir de diferentes substratos: bagaço de cana, serragem de eucalipto e meio sintético HS. A caracterização foi realizada utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura de Alta Resolução (MEV) da marca TermoFisher Scientific, modelo Quattro S, equipado com Detector de Energia Dispersiva (EDS) da marca Thermo Scientific UltraDry, modelo ANAX-60P-B. Para o preparo da amostra, esta foi fixada em porta amostra com fita adesiva dupla face de carbono, metalizada com ouro e, posteriormente, submetida à análise no equipamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Cinética de Crescimento e Produção de Nanocelulose Bacteriana

De acordo com a Figura 1, foi possível observar as cinéticas de crescimento bacteriano e por conseguinte a determinação do período de máxima produção de membranas em condições estática e agitada (meio sintético) além da avaliação da produção de nanocelulose bacteriana a partir dos hidrolisados de bagaço de cana e serragem de eucalipto. Nos ensaios em cultivo estático é possível observar o declínio de concentração de glicose à medida que a produção da membrana de nanocelulose cresce, enquanto que para o crescimento em meio agitado o consumo da glicose promoveu um elevado crescimento das células.

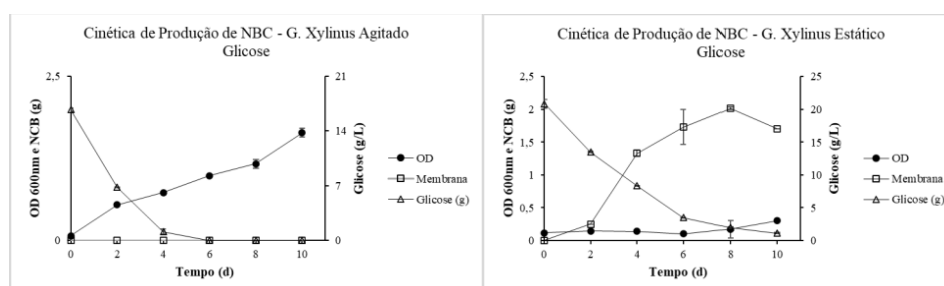


Figura 1 – Cinética de produção de nanocelulose bacteriana em cultivo agitado (A) e estático (B) no meio Hestrin Schramm.

No cultivo estático em meio sintético foi obtido uma máxima produção de membrana no oitavo dia de cultivo obtendo uma concentração de 2,01 g/L apresentando formação na interface ar/líquido como uma membrana semirrígida de alta resistência. Observou-se que no cultivo em meio sintético sob agitação não foram produzidas membranas de nanocelulose bacteriana, mas sim uma suspensão de fios fibrosos, corroborando com os estudos de (COSTA et al, 2017). Por esse motivo o cultivo aplicando os hidrolisados de resíduos lignocelulósicos foi realizado apenas em modo estático.

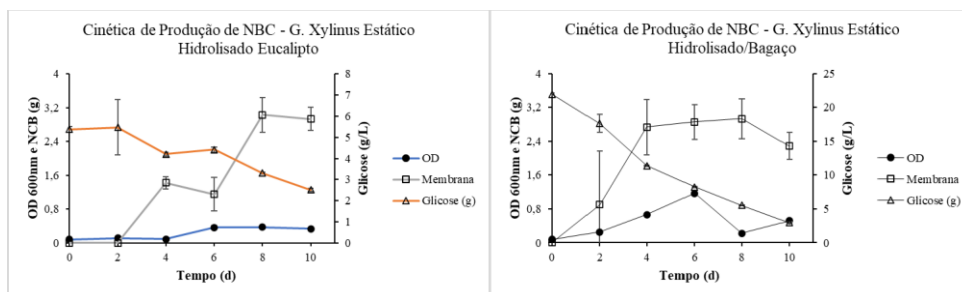


Figura 2 – Cinética de produção de nanocelulose bacteriana a partir do hidrolisado de serragem de eucalipto (A) e bagaço de cana (B).

A partir da figura 2 podemos observar que foi obtido uma maior produção de membrana de nanocelulose bacteriana no oitavo dia de cultivo para ambos hidrolisados lignocelulósicos. Para o bagaço de cana foi obtido uma concentração de 2,93 g/L enquanto que para a serragem de eucalipto foi observado uma produção de 3,03 g/L. O aumento da produção das membranas de nanocelulose bacteriana dos hidrolisados lignocelulósicos em relação à produção do meio sintético possivelmente ocorreu devido a presença do ácido acético em ambos os hidrolisados agindo como potencial indutor da síntese das membranas (HUANG et al., 2014).

Caracterização das membranas de nanocelulose bacteriana

Por meio das imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), foi possível observar diferenças significativas na estrutura das membranas de nanocelulose biosintetizadas a partir do bagaço de cana e serragem de eucalipto. As membranas de nanocelulose sintetizadas a partir do bagaço de cana apresentaram uma estrutura composta por fibras entrelaçadas e poros abertos. Por outro lado, as membranas de nanocelulose sintetizadas a partir da serragem de eucalipto exibiram uma superfície lisa, de textura rugosa e não apresentaram poros visíveis.

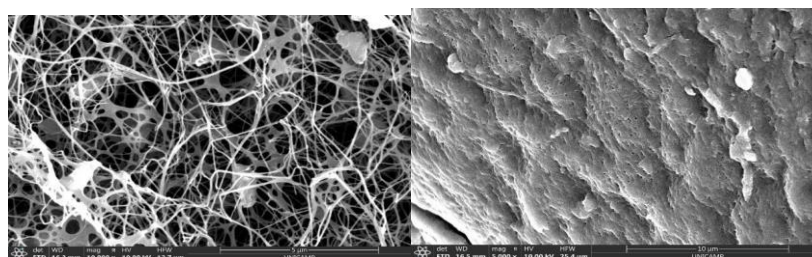


Figura 3 – MEV Imagens das membranas de nanocelulose obtidas a partir do bagaço de cana (A) e serragem de eucalipto (B).

De acordo com os estudos de Macías et al. (2020), a aparência da estrutura da membrana de nanocelulose está diretamente relacionada ao resíduo agroindustrial utilizado, e à temperatura de pré-tratamento. Nesse contexto, a estrutura das fibras de celulose dos resíduos agroindustriais influenciam

significativamente na formação da membrana de nanocelulose biosintetizada. O bagaço de cana apresenta aglomerados de fibras de celulose com características como alta rigidez, aglomerados de fibras curtas e feixes de fibra com entrelaçamento mais fraco, além de poros preenchendo seu interior. Em contrapartida, a serragem de eucalipto possui uma textura mais dura e feixes de fibras entrelaçados de forma mais intensa (WANG et al., 2017).

CONCLUSÕES

Podemos concluir que o bagaço de cana e a serragem de eucalipto são potenciais biomassas lignocelulósicas para utilização em bioprocessos devido à sua disponibilidade de açúcares fermentescíveis, como a glicose. O cultivo estático favorece a formação de membranas de nanocelulose bacteriana, ao contrário do cultivo agitado. A aplicação dos hidrolisados de bagaço de cana e serragem de eucalipto resultou na produção de nanocelulose bacteriana (2,93 g/L e 3,03 g/L, respectivamente). As membranas de nanocelulose produzidas a partir desses materiais mostraram diferenças estruturais distintas, atribuídas às características específicas da celulose presente nesses resíduos lignocelulósicos.

BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA, Fernanda Santos. **Avaliação do pré-tratamento hidrotérmico de palhas de cana-deaçúcar para produção de etanol de segunda geração.** Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2013.
- COSTA A.F. S et al. **Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* Using Corn Steep Liquor as Nutrient Sources.** *Front Microbiol.* 2017 Oct 17;8:2027.
- GOLDBECK R. et al., **Development of hemicellulolytic enzyme mixtures for plant biomass deconstruction on target biotechnological applications.** *Applied Microbiology and Biotechnology.*
- HENDIRA, Ilana Neumann Boeira. **Adaptação de *Levedura spathaspora arborariae* NRRL Y48658 ao hidrolisado de casca de soja e avaliação da capacidade de produção de etanol.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- HUANG, C et al., **Utilization of Corn cob Acid Hydrolysate for Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter xylinus*.** *Applied Biochemistry and Biotechnology,* 2014
- JANICE, L.S et al., **Characterization of Pellicle Inhibition in *Gluconacetobacter xylinus* 53582 by a Small Molecule, Pellicin, Identified by a Chemical Genetics Screen.** *PubMed Central,* 2011.
- MACÍAS-ALMAZÁN, A., LOIS-CORREA, J. A., DOMÍNGUEZ-CRESPO, M. A., LÓPEZ-OYAMA, A.B., TORRES-HUERTA,
- SAVIGNON, Livia Tristão. **Estudo de viabilidade técnica e econômica da produção de nanocelulose.** Niterói, 2016.
- SOARES, B.G. et al. **Mechanical and thermal properties of poly (lactic acid)/starch blends: effect of glycerol and clay incorporation.** *Applied Polymer Science,* v. 130, no. 2, p. 1138-1145, 2013.
- WANG, Y., WEI, X., LI, J., WANG, F., WANG, Q., ZHANG, Y., KONG, L. **Homogeneous isolation of nanocellulose from eucalyptus pulp by high pressure homogenization,** *Industrial Crops and Products.* Volume 104, Pages 237-241, 2017.