

AVALIAÇÃO DO USO DE RESÍDUOS DE MILHO COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA

Jayana da Silva¹, Maria Angélica Thiele Fracassi²

1. Aluna do Curso Técnico de Química da Fundação Escola Técnica Liberato S. V. da Cunha
2. Professora da FETLSVC/ Orientadora

Resumo

O uso da biomassa de resíduos agroindustriais como substrato alternativo em bioprocessos se apresenta como uma forma de diminuir custos de produção e agregar valor às cadeias agroindustriais. Nesse contexto, a utilização de um resíduo para a produção de celulose bacteriana (CB) torna-se interessante, considerando as propriedades únicas apresentadas por este biopolímero promissor, como alta pureza, hidrofobicidade e biocompatibilidade. O projeto atual objetiva a produção de celulose bacteriana a partir da bioconversão dos açúcares presentes na fração hemicelulósica de palhas e sabugos de milho pela bactéria *Gluconacetobacter hansenii*. Ao longo do projeto, mostrou-se que a transformação é possível, e o produto foi submetido a testes de Microscopia Eletrônica de Varredura, Espectroscopia no Infravermelho e Análise Termogravimétrica, que demonstraram um bom desempenho do material em comparação à celulose bacteriana obtida em meio padrão.

Palavras-chave: Síntese; Substrato alternativo; Biopolímero;

Apoio financeiro: Feevale / CNPq.

Trabalho selecionado para a JNIC: MOSTRATEC.

Introdução

O projeto tem como temática a síntese de celulose bacteriana através do uso de resíduos de milho como substrato, compreendendo que este material se enquadra como um polímero promissor e oferece uma ampla gama de aplicações especiais em diversas áreas, mas ainda possui custo elevado de produção.

A celulose bacteriana (CB) é um nanomaterial de fórmula química idêntica à da celulose vegetal, porém com fibras em dimensões nanométricas que fornecem propriedades distintas e consideradas melhores (DONINI *et al.*, 2010). Apresenta enorme potencial para a formulação de materiais híbridos, devido a sua porosidade (ARIS *et al.*, 2019). Na área médica já foram relatados estudos para aplicação da CB como vasos sanguíneos artificiais em microcirurgias, arcabouços para engenharia tecidual, substituto de pele e como sistema carreador de fármacos (drug delivery), além de funcionar como barreira contra microrganismos em feridas e queimaduras, o que auxilia no processo de cura, ameniza a dor e reduz o tempo de cicatrização (FISCHER *et al.*, 2017). Estudos envolvendo a produção de CB utilizam açúcares puros como a glicose, manitol, frutose e sacarose como fontes de carbono, além de fontes complexas de nitrogênio e vitaminas, como o extrato de levedura e a polipeptona. Estes substratos acabam tendo um alto valor agregado, o que inviabiliza a produção em alta escala (JUNG *et al.*, 2009).

O Brasil dispõe de uma grande quantidade de biomassa proveniente de resíduos agroindustriais cujo potencial biotecnológico é alto, porém pouco explorado. Tendo em vista que os resíduos de milho se encaixam na classe dos lignocelulósicos e podem ter sua fração sacarídea hidrolisada, pressupõe-se que é possível utilizá-los como substrato para a produção de celulose bacteriana por *Gluconacetobacter hansenii*.

Portanto, o projeto tem como objetivo verificar a capacidade da cepa *G. hansenii* em produzir celulose utilizando hidrolisados hemicelulósicos de sabugo e palha de milho como substratos, bem como estabelecer variáveis de produção e caracterizar as membranas sintetizadas.

Metodologia

Os ensaios deste estudo foram realizados nos laboratórios de Bacteriologia do CIES (Centro Integrado de Especialidades em Saúde) e de Estudos Avançados em Materiais, localizados no campus II da Universidade Feevale, em Novo Hamburgo, RS. Foram realizados com Equipamentos de Proteção Individual, em presença de um Cientista Qualificado.

Inicialmente, preparou-se os substratos para o processo fermentativo. Para isso, sabugos e palhas de milho foram lavados, secos, cortados em pequenos pedaços e então 150g de cada resíduo foi tratado, separadamente, com 15,3 ml de H₂SO₄ 98% em um sistema de refluxo contendo água suficiente para completar 1,5 L, à 100°C por 25 minutos. As misturas finais foram filtradas a vácuo através de um filtro de vidro sinterizado e as soluções brutas foram reservadas. Parte dos hidrolisados brutos foi detoxificada para neutralizar as soluções, remover compostos fenólicos e precipitar metais pesados, a fim de purificá-los para o processo fermentativo. Para tanto, adicionou-se CaO comercial para elevação do pH a 7,0, com posterior abaixamento do pH para 5,5 com adição de H₃PO₄ 85%, bem como adição de 3% de carvão ativado, permanecendo sob agitação magnética por 30 minutos. As soluções, por fim, foram filtradas em membrana

Millipore de 0,45 µm.

Os meios de cultura foram preparados a partir dos hidrolisados. Foram observadas as seguintes variáveis para cada hidrolisado: pH natural da solução x pH em 5,0, meio suplementado (5g/L de extrato de levedura, 3g/L peptona) x não suplementado e solução bruta x solução detoxificada. No total, foram preparados oito meios de cultura com composição variada. Além disso, 100 mL de MYP (25 g/L de manitol, 5g/L de extrato de levedura, 3g/L de peptona) foram preparados e serviram como substrato padrão e controle positivo. Os substratos foram autoclavados a 121 ° C por 15 minutos para eliminar qualquer vestígio microbiano que pudesse interferir na fermentação da celulose.

O pré-inóculo de *G. hansenii*, para ativar as bactérias, foi feito em 100 ml de caldo MYP, a partir da adição de 1 ml da cultura preservada da bactéria. O meio foi mantido em estufa a 28 ° C por 72 horas. Posteriormente, 100 ml de cada substrato foi inoculado com 1 ml de pré-inóculo. Permaneceram 14 dias em estufa a 28 °C. Os filmes resultantes na interface ar-líquido foram limpos, purificados e caracterizados.

Para a determinação do rendimento, em g de celulose/L de meio de cultura, o excesso de água contido na superfície da CB foi retirado, e a massa úmida estabelecida em balança analítica. O teste de MEV foi feito com a CB seca e sobreposta com ouro, para visualização das nanoestruturas. A espectroscopia vibracional no infravermelho (FTIR) identificou a composição do material e foi realizada com a membrana seca, com faixa de 450 a 4000 cm⁻¹. Para a realização da análise termogravimétrica (TGA), foram depositados 5g de CB em suporte de balança com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ a 600 °C e fluxo de ar de 50 ml*min⁻¹.

Resultados e Discussão

Decorridos catorze dias de cultivo bacteriano estático, foi possível observar a formação de uma película de aspecto gelatinoso na interface líquido/ar de todos os meios de cultura, exceto naqueles que continham hidrolisados brutos. Assim, comprovou-se que o processo de hidrólise dos resíduos de milho foi eficaz para a solubilização dos açúcares presentes em suas moléculas, como sugere Medina (2013), que utilizou metodologia semelhante para hidrolisar os açúcares provenientes do bagaço de cana e produzir bioetanol. Observou-se que não houve formação de celulose bacteriana nos meios contendo hidrolisados brutos, somente nos substratos contendo hidrolisados detoxificados, provando que o processo de detoxificação foi eficaz para remover substâncias tóxicas ao microrganismo, como já visto na pesquisa de Lopes *et al* (2015), que utilizou hidrolisados hemicelulósicos de sabugo de milho para produzir bioetanol. O meio composto pelo hidrolisado de sabugo suplementado apresentou película com a maior espessura dentre as formadas, ficando visualmente próxima a espessura da membrana produzida no meio padrão. A formação deste filme representa a evidência qualitativa da formação de celulose.

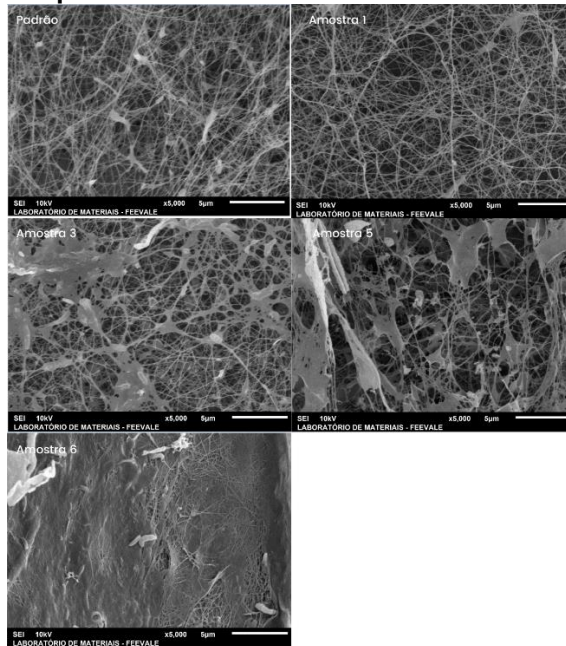
Em uma visão geral, o sabugo de milho teve o melhor desempenho como fonte de carbono em relação à palha de milho, obtendo rendimentos entre 14 g/L e 32 g/L de celulose, em 14 dias de cultivo bacteriano, como mostra o quadro 1. Além disso, o ajuste de pH em 5,0 foi interessante para o meio contendo hidrolisado de sabugo, aumentando seu rendimento em 9 g/L em relação ao pH natural, mas teve uma influência reversa no hidrolisado de palha, diminuindo seu rendimento em 5 g/L. A suplementação com fontes de nitrogênio influenciou no aumento de 9g/L nos meios, mostrando-se uma ótima forma de aumentar a eficácia do processo fermentativo. O rendimento obtido, entretanto, foi muito próximo ao obtido por Hong *et al* (2011), cujos resultados da bioconversão do hidrolisado hemicelulósico da palha do trigo em celulose bacteriana alcançaram a marca de 15,4 g/L de rendimento em 11 dias.

Quadro 1 - Identificação das amostras, composição dos meios de cultura e respectivos rendimentos

Amostra	Composição (100 mL)	Rendimento (g/L)
1	H _{palha}	12
2	H _{palha} + pH em 5,0	7
3	H _{palha} suplementado*	21
4	H _{sabugo}	14
5	H _{sabugo} + pH em 5,0	23
6	H _{sabugo} suplementado *	32
7	H _{palha} bruto	0
8	H _{sabugo} bruto	0
9	MYP padrão	45

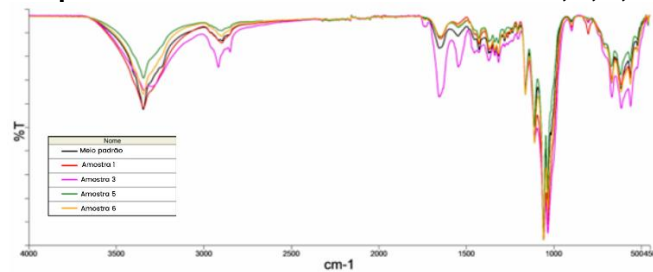
Fonte: a autora, 2020.

As fibrilas de celulose foram medidas usando o software de imagem. Observa-se que as fibrilas obtidas nos meios contendo os substratos alternativos foram bastante semelhantes às do meio padrão. A Figura 1 mostra as imagens. A visualização das fibras de algumas amostras foi dificultada por uma espécie de filme presente na superfície, cuja origem pode ter sido influenciada pela composição do substrato ou pelo tipo de secagem utilizado para preparar a amostra para análise.

Figura 1: Microscopias Eletrônicas de Varredura das amostras de celulose

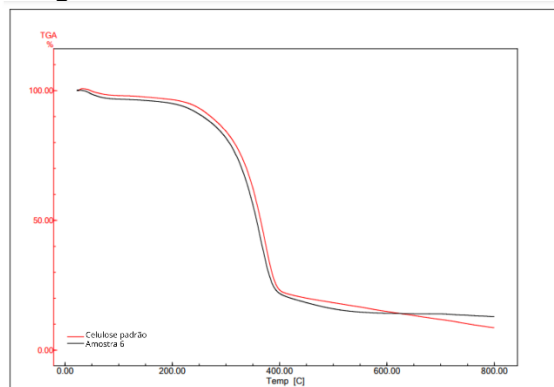
Fonte: a autora, 2020.

Os espectros de FTIR das membranas de CB sintetizadas a partir dos hidrolisados exibiram grupos funcionais semelhantes à celulose padrão, como mostrado na Figura 2. Os picos foram interpretados e analisados com base na literatura disponível anteriormente. O pico em $3300 \sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ exibiu uma banda larga e nítida que inferiu os grupos funcionais hidroxila que exibiram vibrações de alongamento (γ). O pico em 2900 cm^{-1} foi atribuído aos grupos funcionais ($-\text{CH}_3$) e ($> \text{CH}_2$). O pico a 1400 cm^{-1} é um dos principais picos da celulose do tipo $\text{I}\alpha$, que está associado a vibrações de flexão simétricas ($-\text{CH}_2$). O pico em 1100 cm^{-1} atribuído à vibração de flexão C-O ou ligações C-C presentes no monômero de um polissacarídeo. Com base em seus espectros, nenhuma contaminação foi encontrada.

Figura 2: Espectro FTIR das amostras de celulose 1, 3, 5, 6 e padrão

Fonte: a autora, 2020.

A análise de TGA, cuja curva é ilustrada na figura 3, mostrou que o perfil de degradação térmica de ambas as amostras padrão e 6, produzida com hidrolisado de sabugo de milho suplementado, é muito semelhante, o que mostra que a substituição do meio padrão por hidrolisados de sabugo de milho não altera a composição final do material, além de produzir um rendimento de celulose muito aproximado.

Figura 3: Curvas termogravimétricas das amostras de celulose padrão e celulose 6

Fonte: a autora, 2020.

Conclusões

Através dos resultados obtidos até o momento, conclui-se que a pesquisa atingiu seu objetivo, demonstrando que a síntese de celulose bacteriana por *Gluconacetobacter hansenii* utilizando hidrolisados de resíduos de milho como substrato é possível. Além disso, foi possível produzir, purificar e caracterizar hidrolisados hemicelulósicos de palhas e sabugos de milho, sendo que o processo de hidrólise foi eficaz para a solubilização dos açúcares e a detoxificação foi capaz de purificar os hidrolisados, tornando-os não tóxicos à bactéria. Quanto as variáveis de produção, o sabugo de milho mostrou-se como resíduo mais eficiente para o processo microbiológico, sendo uma boa fonte de carbono, enquanto a suplementação do meio com fontes de nitrogênio e nutrientes aprimorou o processo, rendendo uma massa de celulose maior. Não foi possível, entretanto, estabelecer conclusões sobre a influência do pH, necessitando de estudos posteriores mais aprofundados. As análises de MEV, TGA E FTIR demonstraram que os biopolímeros produzidos nos substratos alternativos apresentaram propriedades muito semelhantes ao da celulose produzida com substrato padrão, o que mostra que a substituição do meio padrão por hidrolisados de sabugo e palha de milho não altera a composição final do material.

Ademais, este estudo apresenta alto grau social, pois busca transformar a biomassa de um resíduo agroindustrial com baixo valor agregado em um produto de extremo potencial biomédico e econômico. O uso de resíduos de milho como fonte de carbono na fermentação da celulose mostra-se como uma alternativa para baratear processos produtivos e agregar valor à sua cadeia agroindustrial. Dessa forma, produzindo celulose via processos fermentativos de baixo custo, seria possível disponibilizar este material de propriedades únicas em escala industrial, atendendo a diversas demandas da sociedade.

Referências bibliográficas

ARIS, Fathin Amila Faisal *et al.* Interaction of silver sulfadiazine with bacterial cellulose via ex-situ modification method as an alternative diabetic wound healing. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 21, 2019. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101332.

DONINI, Ígor A. N. *et al.* Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, São Paulo, v. 35, n. 4, 2010. 14 p.

FISCHER, Michele Roberta *et al.* Biossíntese e caracterização de nanocelulose bacteriana para engenharia de tecidos. **Revista Matéria**, Rio de Janeiro, v. 22, 2017. DOI: 10.1590/S1517-707620170005.0270.

HONG, F. *et al.* Wheat straw acid hydrolysate as a potential cost-effective feedstock for production of bacterial cellulose. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 86, 2011. 6 p.

JUNG, Ho-Il Jung *et al.* Production and Characterization of Cellulose by *Acetobacter* sp. V6 using a Cost-Effective Molasses–Corn Steep Liquor Medium. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 162, 2009. 12 p.

LOPES, M.M. **Avaliação do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho suplementado com proteína de farelo de soja solubilizada para obtenção de bioetanol.** Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Industrial – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

MEDINA, Kelly J. Dussan. **Produção de bioetanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* NRRL Y-7124 e *Candida shehatae* UFMG HM 52.2 visando à aplicação em bioprocessos com campo eletromagnético.** Dissertação (Doutorado em Ciências na área de Microbiologia Aplicada) - Universidade de São Paulo, São Paulo, ago. 2013.