

Produção e modificação química de nanocelulose bacteriana e estudo preliminar para ligação de metais e biomoléculas

Production and chemical modification of bacterial nanocellulose and preliminary study for binding metals and biomolecules

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo inicial a produção da membrana de nanocelulose bacteriana (NCB), através do cultivo estático em meio de cultivo Hestrin & Schramm (HS). A cepa utilizada foi *Gluconacetobacter xylinus*. As membranas foram produzidas em tempo médio de 7 dias, mantidas à temperatura de 30°C, até atingirem a espessura de 2mm. Posteriormente, a purificação foi realizada com 1M de NaOH. Por fim, sucedeu-se um estudo comparativo entre os agentes plastificantes PEG 600 (polietilenoglicol) e a glicerina bidestilada, que têm como função torná-las mais maleáveis. Para tanto, foram selecionadas 16 membranas no experimento inicial. Em seguida, foram introduzidas em soluções de 50ml nas concentrações de 1%, 2%, 4% e 6%. Em um segundo experimento, analisou-se apenas os resultados com o agente plastificante PEG 600. Como resultado, a glicerina bidestilada se mostrou mais eficaz.

PALAVRAS-CHAVE: Nanocelulose bacteriana. Secagem. Agente plastificante..

ABSTRACT

This work had as initial objective the production of the bacterial nanocellulose membrane (NCB), through the static cultivation in Hestrin & Schramm culture medium. The utilized strain was the *Gluconacetobacter xylinus*. The membranes were produced in average time of 7 days, kept in 30°C temperature until reaching 2mm thickness. Afterwards, the purification was made with 1M of NaOH. Lastly happened an comparative study between the plasticizers agents PEG 600 (Polyethylene glycol) and the bidistilled glysterine, wich aims to make them more malleable. So, there where selected 16 membranes in the initial experiment. Then, introduced in 50mL solutions in 1%, 2%, 4% and 6% concentration. In a second experiment, the result was analyzed with only the plasticizer PEG 600. As a result, the bidistilled glycerine turned out to be more effective.

KEYWORDS: Bacterial nanocellulose membrane. Plasticizer agent.

Juliana Heimbecher Arias
julianaarias@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Gustavo Henrique Couto
ghcouth@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

A celulose é o biopolímero mais abundante do mundo. Tem importância fundamental para a indústria, sendo encontrada em vários setores, como o têxtil e alimentício (GUIMARÃES et al., 2019). Esse biopolímero pode ser produzido por diversos seres vivos, como protozoários, plantas verdes, algas, fungos e procariontes. Entretanto, existem diferenças consideráveis entre essas celuloses, o que torna possível uma subdivisão em celulose complexa e celulose pura, sendo o último grupo onde a celulose, na forma de nanocelulose, produzida por alguns gêneros de bactérias (nanocelulose bacteriana ou NCB) é melhor enquadrada (DONINI et al., 2010).

Os gêneros mais utilizados para a produção da CB (celulose bacteriana) são: *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes* (COLLA et al., 2014). Algumas características da CB a diferencia da celulose vegetal e podem ser extremamente úteis. Ela apresenta grande capacidade de absorver e reter líquidos, além de ser demasiadamente pura, resistente, não alergênica e apresenta grande durabilidade. Além disso, é possível mudar as suas propriedades durante a síntese (FISCHER et al., 2017). Atualmente, a NCB tem sido muito estudada por acreditar-se que suas propriedades são de grande utilidade, principalmente na área da saúde. A NCB é biocompatível e tem a capacidade de reter líquidos, o que a torna um material excelente no meio médico.

Estruturalmente, a NCB pode ser compreendida como um polímero linear fortemente associado por ligações de hidrogênio, que ocorrem de maneira intramolecular e intermolecular, formando uma rede de nanofibras ligadas por pontes de hidrogênio. As ligações intramoleculares são responsáveis pela formação da fibra, e as intermoleculares, pela rigidez (MILANEZ et al., 2015). Tal característica a torna muito mais resistente à tração e possibilita a modificação química ou não (nos grupos hidroxila), para a ligação de moléculas ou associação a compostos/materiais para obtenção de biocompósitos (DONINI et al., 2010).

A produção tradicional de NCB é feita em bandejas rasas contendo a cepa produtora em meio de cultivo, que permanecem cobertas por 7-20 dias. Quando a película da membrana atinge a superfície, é removida e tratada, inicialmente para remoção das células e meio de cultivo das membranas seguido ou não por posterior secagem (DONINI et al., 2010).

O tratamento de processamento posterior da NCB também pode impactar as características finais do material. O processo de secagem afeta as propriedades da NBC e a adição de agentes plastificantes pode conferir a esse material novas propriedades. Portanto, a utilização de agentes plastificantes é indispensável, visto que sua ação resulta em uma membrana resistente e maleável. Dois agentes plastificantes que se destacam são o glicerol (material biocompatível), e o Polietilenoglicol (material biocompatível sintético) (ZUN et al., 2018).

Desta forma, o presente trabalho buscou testar dois plastificantes (glicerina e PEG), para análise de forma genérica da sua maleabilidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a produção de NCB, foi utilizado o meio de cultura HS, que disponibiliza os nutrientes que os microrganismos necessitam para o desenvolvimento, como uma fonte de carbono, nitrogênio, vitaminas, sais minerais e água. Para o preparo do meio de cultivo, foram utilizados os seguintes componentes (g/L): glicerol em 20g; peptona bacteriológica em 5g; extrato de levedura em 5g; ácido cítrico em 1,15g; e K_2HPO_4 em 2,7g. Após a total dissolução em água destilada, o material passou por um processo de autoclavagem à 127°C durante 15 min a fim de eliminar os microrganismos contaminantes que pudessem interferir no desenvolvimento da cepa pura em estudo.

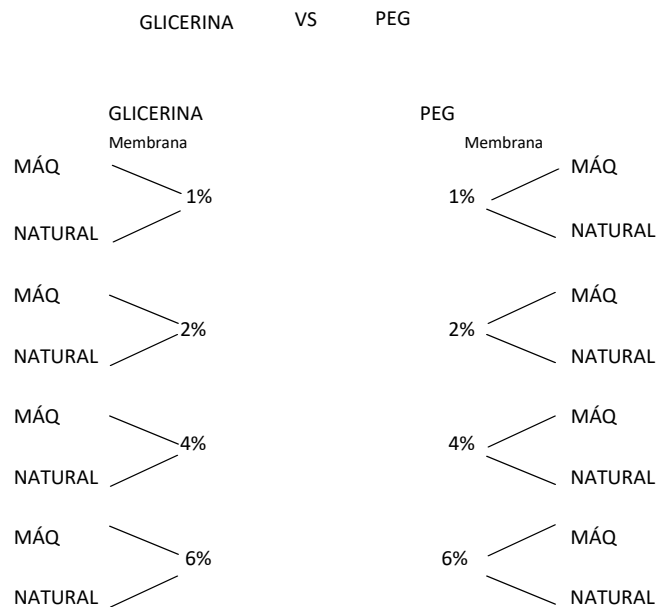
Para produção e purificação da membrana de nanocelulose, é necessário que os instrumentos de trabalhos estejam próximos da chama, com o objetivo de evitar quaisquer contaminações.

A proporção do inóculo foi de 5 mL de uma solução estoque de *G. xylinus* mantida num frasco em estufa, para cada 50 ml de meio HS. Após a inoculação e homogeneização em 5 mL da solução, foram colocados em nas placas de cultivo de células (6 poços). Após, as placas foram armazenadas sob uma temperatura em torno de 30°C durante 7 a 10 dias, até que a membrana de NCB atingisse a espessura de 2mm. Como contaminações aparentes de fungos são comuns nessa fase, é ideal que seja inserida a quantidade de 10 microgramas de antifúngico para cada litro de meio HS.

Para a purificação da membrana, os discos produzidos foram tratados com uma solução 0,1 M de NaOH à 80°C durante 60 min. Para a remoção do álcali, as membranas passaram por sucessivas lavagens com água destilada até que o pH da solução de lavagem estivesse neutro.

Para realizar o experimento de secagem de membranas e plastificação, foram utilizadas 16 amostras de tamanhos e dimensões similares. Dois reagentes foram utilizados: o PEG 600 (Polietilenoglicol 600) e a glicerina bidestilada em diferentes concentrações (Figura 1 e 2). O tempo em solução foi de aproximadamente 24 h e o volume de cada solução foi de 50 ml para 8 membranas testadas. O processo de secagem foi realizado em equipamento *gel dryer* (Promega) durante 30 minutos à temperatura de 81°C, ou em estufa bacteriológica mantida à 30°C (Figura 1).

Figura 1: Planejamento do experimento. “NATURAL” refere-se ao processo de secagem na estufa; “MÁQ” refere-se ao processo de secagem utilizando a máquina; as porcentagens referem-se às concentrações das substâncias “GLICERINA” e “PEG”.



Fonte: Autoria própria.

Figura 2: Esquema do processo descrito. Os círculos representam as membranas; “P” refere-se ao agente “PEG” e “G” refere-se à “GLICERINA”

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Membranas de nanocelulose bacteriana foram produzidas utilizando o meio HS em um tempo médio de 7 dias e tiveram espessura média de 2 mm. Após purificação com NaOH e sua posterior remoção as membranas foram preparadas para o teste com o agente plastificante.

No primeiro ensaio com os agentes plastificantes glicerina e PEG (concentrações 1-6%), seguido pela secagem, as membranas secas à temperatura 30° C necessitaram de mais de 24 horas na estufa. Já aquelas secas na máquina de secagem de géis a 80°C, após 30 minutos estavam completamente secas.

Foi verificado que cerca de ¾ das membranas que foram para a estufa na em temperatura de 30°C grudaram e/ou rasgaram na remoção da superfície em que foram colocadas para secar (plástico ou vidro), apresentando aspecto rígido e quebradiço (amostras P). Já aquelas plastificadas com solução com glicerina apresentaram resultados mais promissores quanto a plastificação, utilizando como critério a maleabilidade (medida qualitativa), principalmente em maiores concentrações (4% e 6%). (Figura 3).

Como no primeiro experimento o PEG como agente plastificante não foi eficaz, pois as membranas permaneceram rígidas ou quebradiças, novos testes

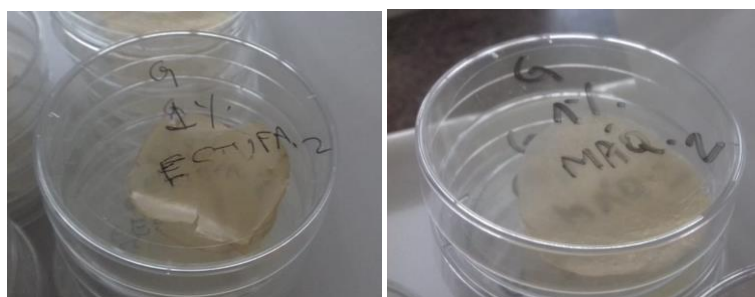
foram realizados utilizando diferentes concentrações dos agentes plastificantes. Assim, foram testadas as concentrações de 0,1%, 0,2%, 0,4%, 0,8%, 1% (Figura 2).

Figura 2: Fotografia de uma membrana de NCB utilizando PEG 600 na concentração de 0,1%.



Fonte: Autoria própria.

Figura 3. Composição comparativa de duas membranas de nanocelulose que passaram pelas mesmas concentrações do mesmo agente plastificante (G- 1%), mas o processo de secagem foi diferente. A figura (A) apresenta visivelmente rasgos causados pela remoção do material e a figura (B) mostra-se com textura e formato mais homogêneos.



(A)

(B)

Fonte: Autoria própria.

Desta forma, agentes plastificantes foram testados com o intuito de quebrar as pontes de hidrogênio intermoleculares entre as fibras de celulose, visando tornar a membrana menos rígida. Um estudo mais detalhado precisa ser realizado para melhor quantificação da maleabilidade, força de tensão, e outros aspectos físicos que podem ser testados.

Uma análise qualitativa permitiu concluir que a glicerina apresentou melhores resultados nas concentrações 6% e 4% passando pelo processo de secagem no equipamento.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi desenvolvido com o apoio de bolsa concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq - Brasil.

CONCLUSÃO

O uso de do glicerol na concentração de 6%, aliado ao método de secagem na máquina de géis foi eficiente para o efeito plastificante nas membranas de nanocelulose bacteriana. Para a utilização do PEG, menores concentrações são mais indicadas, como 0,1%.

O objetivo do trabalho foi atingido a respeito dos experimentos com agentes plastificantes e produção da membrana, porém, devido à crise sanitária causada pela pandemia de SARS-CoV-2, as pesquisas foram interrompidas e demais experimentos foram impossibilitados.

REFERÊNCIAS

COLLA, G., LM PORTO. Desenvolvimento de um reator tecidual muscular de celulose bacteriana. **Blucher Chemical Engineering Proceedings 1.2** (2015): 242-249.

DONINI, Í A. N.; De SALVI, D. T. B.; FUKUMOTO, F. K.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S.; MARCHETTO, R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana **Eclética Química**, vol. 35, núm. 4, 2010, pp. 165-178.

FISCHER, M. R.; GARCIA, M. C. F.; NOGUEIRA, A. L., et al. Biossíntese e caracterização de nanocelulose bacteriana para engenharia de tecidos. **Revista Matéria**, Suplemento, 2017. Disponível em:
<https://www.scielo.br/pdf/rmat/v22s1/1517-7076-rmat-22-suppl-e11934.pdf>
Acesso em: 09 out. 2020.

GUIMARÃES, M. G., EVARISTO, R.B.W., MACEDO, J.L., NASCIMENTO, P.G.B.D., GHESTI, G.F Estudo Prospectivo e Tecnológico da Celulose com Ênfase em Nanocelulose e Catálise. **Cadernos de Prospecção** – Salvador, v. 12, n. 3, p. 576-589, setembro, 2019.

MILANEZ, D. H. **Elaboração de indicadores de ciência e tecnologia para o monitoramento de avanços tecnológicos em nanocelulose**: São Carlos, UFSCar, 2015 187 f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de São Carlos.

RECOUVREUX, D.O.S. **Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos**. Florianópolis. UFSC, Centro Tecnológico, 2008, 145p.

SCHRAMM M, GROMET Z, HESTRIN S. Synthesis of cellulose by *Acetobacter Xylinum*. 3. Substrates and inhibitors. *Biochem J.* 1957;67(4):669-679. Disponível em:
<https://portlandpress.com/biochemj/article-abstract/67/4/669/77420/Synthesis-of-cellulose-by-Acetobacter-xylinum-3?redirectedFrom=fulltext> Acesso em: 07 out. 2020.

SUN, Y., MENG, C., ZHENG, Y. et al. The effects of two biocompatible plasticizers on the performance of dry bacterial cellulose membrane: a comparative study. *Cellulose* 25, 5893–5908 (2018). Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10570-018-1968-z> Acesso em: 09 out. 2020.