

## PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA A PARTIR DE DIFERENTES SUBSTRATOS

**Regina Vasconcellos Antônio<sup>1</sup>, Derce Oliveira Souza Recouvreux<sup>2</sup>, Ana Carla Nazario<sup>3</sup>, Diego Timboni<sup>4</sup>, Eduarda Ferrarini<sup>5</sup>, Giovana Pascoali Rodowanski<sup>6</sup>, Maria Tereza Cauduro<sup>7</sup> e Samira da Silva Peres<sup>8</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Santa Catarina/ Campus Araranguá/ rantonio@mbox1.ufsc.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Santa Catarina/ Campus Joinville/ dercer@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Santa Catarina/ Curso de Fisioterapia/ anacarlanaazario@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Universidade do Extremo Sul Catarinense/Curso de Odontologia/ diegotimboni@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Santa Catarina/ Curso de Fisioterapia/ duferrarini@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Santa Catarina/ Curso de Fisioterapia/ gio\_pascoali@hotmail.com

<sup>7</sup>Universidade Federal de Santa Catarina/ Curso de Fisioterapia/ mariacauduro@hotmail.com

<sup>8</sup>Universidade Federal de Santa Catarina/ Curso de Engenharia de energia/  
samira\_dasilvaperes@hotmail.com

**Resumo:** A celulose bacteriana em biopolímero com características especiais que o torna aplicável na manufatura de artefatos de aplicação médica, bem como suporte estrutural para a engenharia de tecidos. O presente trabalho objetivou avaliar a produção de celulose bacteriana por *Gluconoacetobacter hansenii* a partir de três substratos carbônicos, glicose glicerol e manitol. Para isto a bactéria foi cultivada em meios contendo cada um dos substratos separadamente, na concentração de 25 g/l. A produção de celulose foi avaliada a partir da pesagem do biopolímero que cresceu na superfície do caldo de cultivo, foi acompanhada durante 14 dias. Os resultados mostraram que houve produção de celulose a partir dos três substratos estudados, sendo esta que na presença de glicerol ocorreu a maior conversão de substrato em produto, com um rendimento de 36 g de celulose/ 100g de substrato. Os resultados são promissores tendo em vista que atualmente o glicerol é um substrato de baixo custo o que contribui para o decréscimo do custo de produção final deste biopolímero com diversas aplicações biomédicas.

**Palavras-Chave:** Celulose bacteriana, *Gluconacetobacter hansenii*, glicerol, manitol, glicose

### 1 INTRODUÇÃO

Embora se tenha obtido muitos avanços científicos na engenharia de tecidos, a ciência ainda encontra desafios para reparo e substituição de tecidos moles do corpo, tais como, tendões, pele, fígado, nervos cartilagem e ligamentos. Os tratamentos convencionais cujo objetivo é buscar a reconstrução dos tecidos e órgãos lesados têm limitações tais como a compatibilidade de doadores e por vezes rejeições (HORNUNG, et al., 2006). Assim, há a necessidade da busca de materiais com estruturas adequadas para promover o estímulo à construção ou a substituição de órgãos e tecidos. Na engenharia, de tecidos são desenvolvidas matrizes para darem suporte às células, promover sua diferenciação e proliferação e conseqüentemente a formação de um novo tecido. Tais estratégias permitem estruturas híbridas que podem ser implantadas em pacientes para promover a regeneração tecidual ou substituir um órgão com mau funcionamento. Para atender a todos os requisitos necessários ao sucesso desta estratégia a escolha de polímeros e os fatores que afetam a interação célula/tecido- material deve ser investigada. O material polimérico ideal requer uma rigidez mecânica, e uma estrutura tridimensional que possa promover a interação máxima com as células e os fluidos corpóreos, além de ter uma

nanoestrutura superficial que permita a adesão celular. Neste sentido os polímeros naturais oferecem grande vantagem, pois são similares às macromoléculas biológicas com as quais o organismo está preparado para reconhecer e interagir metabolicamente. Além de possuírem certa similaridade com os componentes de matriz extracelular, os polímeros naturais podem minimizar o estímulo à inflamação crônica ou reações imunológicas e toxicidade, frequentemente detectada com materiais sintéticos (HORNUNG, *et al.*, 2006). Devido à nanoestrutura e propriedades únicas a celulose bacteriana (CB) é um candidato natural para aplicações médicas e para a engenharia de tecidos.

A celulose é o biopolímero mais abundante encontrado na natureza, sendo o principal componente estrutural de plantas e de grande importância na economia mundial. Além de plantas, algas, fungos, algumas bactérias são também capazes de produzir celulose (ROSS *et al.*, 1991; BROWN JR., 1998; RECOUVREUX *et al.*, 2008; RECOUVREUX, 2004). A CB é um biopolímero que tem sido utilizado há muito tempo como um material biomédico e é ainda hoje utilizado em uma forma modificada como membrana de hemodiálise e como carreador de fármacos de liberação controlada. As diferentes fontes de celulose não têm sido plenamente exploradas, como por exemplo, a celulose bacteriana deve possuir propriedades necessárias para algumas aplicações biomédicas muito específicas. A CB difere consideravelmente das de outras fontes e sendo assim, ainda requer muito estudo para a sua potencial aplicação (BODIN *et al.* 2011).

As bactérias do gênero *Gluconacetobacter* (anteriormente *Acetobacter*) são bactérias não patogênicas, comumente encontradas em frutas e vegetais, apresentam a capacidade de produzir nanofibras de celulose pura (BROWN, 1986). A CB pode ser sintetizada a partir de uma variedade de fontes de carbono. Todas as bactérias produtoras de celulose são capazes de converter glicose à celulose como parte de seu metabolismo. Neste caso, a glicose atua não somente como fonte de energia, mas também como precursora da biossíntese do biopolímero (ROSS *et al.*, 1991). No entanto, o uso da glicose como substrato para a produção de CB encontra limitações pelo seu custo elevado quando se pensa em elevação da escala de produção.

Assim, neste estudo, foi avaliada a produção de celulose por *G. hansenii*, a partir de três substratos glicose, manitol e glicerol.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Micro-organismo empregado

A bactéria utilizada nesse estudo foi a *Gluconacetobacter hansenii*, ATCC23769, anteriormente denominada *Acetobacter xylinus*, armazenada em temperatura ambiente no meio de cultivo com a seguinte composição: manitol (25,0 g·l<sup>-1</sup>), extrato de levedura (5,0 g·l<sup>-1</sup>), peptona (3,0 g·l<sup>-1</sup>).

### 2.2 Meio de cultivo

Meio de cultivo utilizado foi composto de (g·l<sup>-1</sup>): extrato de levedura (5,0), peptona (3,0), e uma das três fontes de carbono (25,0). Foram testadas três fontes de carbono sendo estas: glicerol, glicose e manitol.

### 2.3 Condições de cultivo

Foram realizadas três séries de experimentos, em duplicata, sendo cada série para os substratos: glicose, glicerol e manitol. Para cada série de experimentos, foram preparados 12 frascos erlenmeyers de 125 ml, contendo 20 ml de meio de cultivo descrito acima, previamente esterilizado em autoclave, por 15 minutos a 121°C, 1 atm, aos foram adicionados 0,1 ml de caldo de cultivo contendo *G. hansenii*, previamente crescida por 24 h. Após inoculação o erlenmeyer foi incubado em estufa a 30° C, sem agitação. De cada série, dois frascos foram coletados nos tempos de incubação 2, 5, 7, 10, 12 e 14 dias de incubação. A celulose crescida na superfície do caldo de cultivo de cada frasco foi lavada com água destilada, para remover o caldo de cultivo remanescente e transferido para 5 ml de NaOH, 0,5 mol/l. A celulose coletada foi deixada na solução de NaOH por pelo menos 2 dias. Após este período a celulose coletada foi novamente lavada abundantemente com água destilada para remover restos celulares bacterianos e o excesso de NaOH, e levada à secagem em estufa a 50° C, até peso constante. Cada amostra foi pesada para a determinação da massa de celulose pesada e cálculo da produção de celulose (g/l de meio de cultivo).

### 2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura das amostras foi caracterizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Philips, XL-30). Para as observações de MEV, amostras secas foram colocadas sobre um suporte de alumínio e recobertas com ouro.

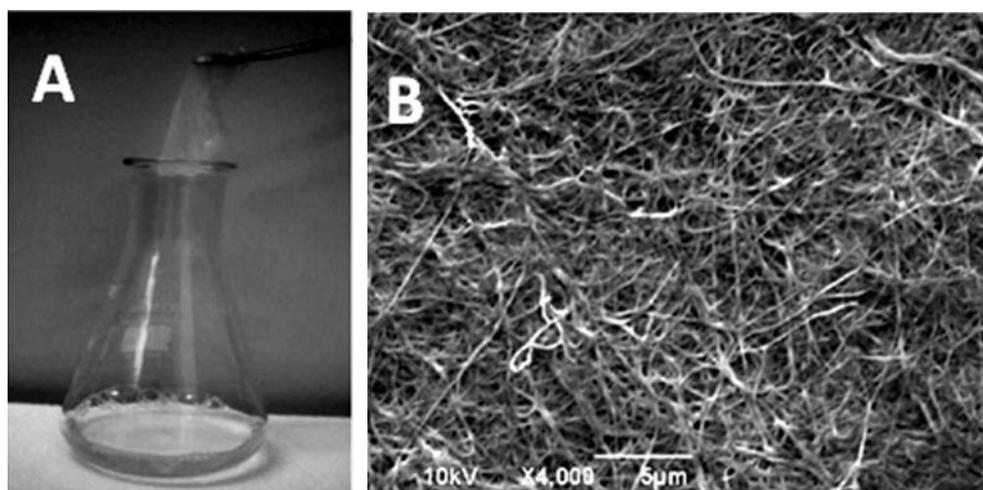
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora a estrutura química da celulose produzida na superfície de meios de cultura líquidos seja idêntica à produzida em culturas submersas (sob agitação), o aspecto do produto dos dois tipos de cultivo é diferente. Em culturas agitadas ou aeradas, submersa celulose se acumula na forma de bolinhas. No entanto, o produto da cultura estática é uma membrana formada na superfície do caldo de cultivo.

Na Figura 1A é apresentada uma fotografia na qual é mostrado o aspecto geral da celulose produzida ao longo dos experimentos. Nota-se que a celulose bacteriana hidratada tem um aspecto gelatinoso, porém apresenta uma estrutura bastante resistente à ruptura. A microscopia eletrônica de varredura realizada na central de microscopia da UFSC, para uma das amostras preparadas neste estudo, é apresentada na Figura 1B. Na Figura 1B nota-se a estrutura fibrilar característica da celulose produzida por *G. hansenii*. Esta estrutura fibrilar de membranas hidratadas de celulose apresenta retenção de água, resistência e porosidade que permitem sua aplicação como uma pele artificial auxiliar no tratamento de grandes lesões de pele, pois isola o ferimento de contaminações ao mesmo tempo em que permite a saída de exudatos e a troca gasosa.

Uma das vantagens do cultivo e produção de celulose conforme realizada neste estudo, em meio líquido não agitado, é que a membrana de celulose pode ser facilmente coletada e cortada em pedaços de tamanhos e espessuras desejadas.

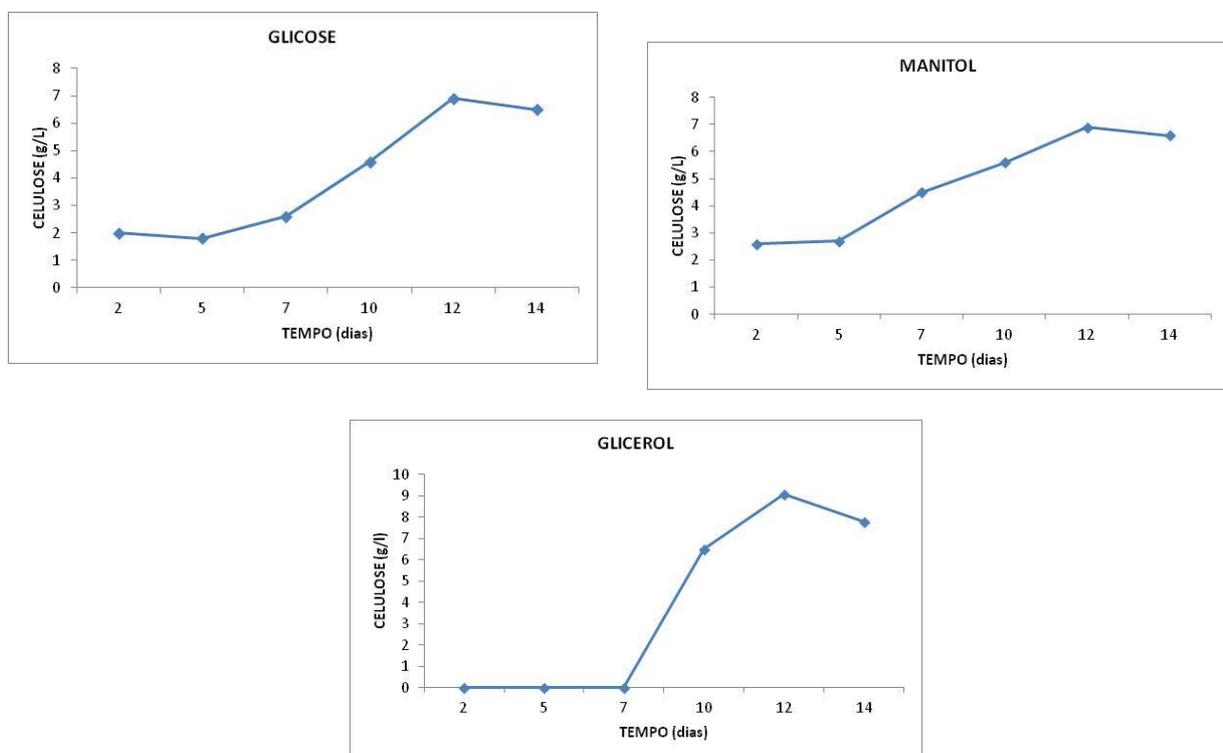
**Figura 1** (A) Fotografia ilustrativa da membrana de celulose produzida por *G. hansenii* sobre a superfície do caldo cultivo.(B) Micrografia da varredura da superfície de uma membrana de celulose (amplificação 4.000 vezes).



O curso temporal da produção de celulose pela bactéria *G. hansenii*, nos três substratos testados, neste estudo são apresentados na Figura 2. Observa-se um comportamento bastante similar entre os três substratos testados. Na presença de glicose e manitol, foi observado alguma produção de celulose já nos primeiros 5 dias de cultivo. No entanto, o início da produção de celulose, quando glicerol foi testado, só foi detectável a partir do sétimo dia de cultivo. Considerando-se a produção ao final de 12 dias de cultivo, observa-se que embora tenha se iniciado tardiamente a produção de celulose na presença do glicerol, esta atingiu a maior produção. Enquanto, no final de 12 dias a produção de celulose foi igual a 6,9 g/l, para glicose e manitol, esta foi igual a 9,0 g/l, quando glicerol foi o substrato utilizado.

Na Tabela 1 está apresentada a produção de celulose após 12 dias de cultivo e o correspondente rendimento ou percentual de conversão de substrato em celulose, considerando-se que cada um dos substratos foi utilizado na concentração inicial de 25 g/l. Novamente observa-se que o glicerol foi o substrato cujo percentual de conversão a produto (celulose) foi o maior dentre os substratos testados.

**Figura 2** Curso temporal da produção de celulose (g/L) pelo período de 14 dias de cultivo para os meios contendo glicose, manitol e glicerol nas concentrações iniciais de 25 g/l.



**Tabela 1** Rendimento ou conversão de substrato em celulose, após 12 dias de cultivo

SUBSTRATO	CELULOSE (g/l)	RENDIMENTO (g/100g)
GLICOSE	6,9	27,6
MANITOL	6,9	27,6
GLICEROL	9,0	36

Estes resultados estão de acordo com o obtido por *Sherif e Sameshima (2005)*. Estes autores testaram a eficiência de produção de celulose frente diversos substratos e observou que o glicerol foi o substrato que produziu o maior rendimento de celulose, dentre os testados, incluindo glicose. Estes resultados são interessantes à medida que a glicose e o manitol são substratos relativamente caros e o glicerol, na era da produção do biodiesel é um subproduto deste processo, cujo custo tem se tornado muito baixo. Assim, o aproveitamento do glicerol para a produção de celulose, um biopolímero com características e aplicações médicas torna os custos de produção baixos.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O interesse na celulose de origem bacteriana produzida na superfície de de caldos de cultivo tem aumentado nos últimos anos pro causa de seu potencial para o uso não apenas na medicina, mas na engenharia de tecidos e na cosmética. Contudo, o baixo rendimento do processo de produção, torna a CB comercialmente cara. Assim, a busca por substratos que proporcionem alto rendimento e que seja de baixo custo traz grande contribuição para a disponibilização dos avanços científicos nesta área de pesquisa. Neste estudo, demonstrou ser possível a produção de CB a partir de glicose, manitol e glicerol, sendo este último substrato além de ter proporcionado o maior rendimento é de baixo custo, uma vez que é um subproduto da produção de biodiesel.

#### AGRADECIMENTOS

Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Araranguá.

## REFERÊNCIAS

BODIN, A; BÄCKDAHL, H; PETERSEN, N; GATENHOLM, P, Bacterial Cellulose as Biomaterial. In: Editor-in-Chief: Paul D (ed) *Comprehensive Biomaterials*. Elsevier, Oxford, p 405-410, 2011.

BROWN, A. J. An acetic ferment which forms cellulose. **Journal of Chemical Society**, v.49, p.432-439. 1986.

BROWN JR., M. R. Microbial Cellulose: a new resource for wood, paper, textiles, food and specialty products (<http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown>), 1998.  
HORNUNG, M, LUDWIG, M, GERRARD, AM, SCHMAUDER, HM. Optimizing the Production of Bacterial Cellulose in Surface Culture: Evaluation of Substrate Mass Transfer Influences on the Bioreaction (Part 1) **Engineering Life Science**. 6 (6), 537–545, 2006.

KESHK, S.M.A.S. and SAMESHIMA, K.. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. **African Journal of Biotechnology**; Vol. 4 (6), pp. 478-482, 2005.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiological Review**, v.55, n.1, Mar, p.35-58. 1991.

RECOUVREUX, D. O. S. **Produção de Celulose Bacteriana: Identificação do Operon bcs e Produção de Biofilme Celulósico por *Chromobacterium violaceum*** - Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 124 p. 2004.

RECOUVREUX, D. O. S.; C. A. CARMINATTI; A. K. PITLOVANCIV; C. R. RAMBO; L. M. PORTO; R. V. ANTONIO. Cellulose Biosynthesis by the Beta-Proteobacterium, *Chromobacterium violaceum*. **Current Microbiology**, v.57, n.5, Nov, p.469-476. 2008.

BODIN A, BÄCKDAHL H, PETERSEN N, GATENHOLM P (2011) 2.223 - **Bacterial Cellulose as Biomaterial**. In: Editor-in-Chief: Paul D (ed) *Comprehensive Biomaterials*. Elsevier, Oxford, p 405-410, 2011.

RECOUVREUX, D. O. S. **Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos** - Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 145 p, 2008.