

PRODUÇÃO DE MILIESFERAS DE CELULOSE BACTERIANA E COMPÓSITOS DE CELULOSE BACTERIANA COM ACEMANANA

J. C. S. LOBE¹, K. CESCA¹, R. A. N. PÉRTILE¹, F. V. BERTI¹, L. M. PORTO¹

Universidade Federal de Santa Catarina,
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos
E-mail para contato: {joao_lobe, luismar}@intelab.ufsc.br

RESUMO – Linhagens da bactéria do gênero *Gluconacetobacter* produzem hidrogéis de celulose com características e formatos distintos, como esferas, em diferentes condições hidrodinâmicas, esse hidrogel pode ser incorporado a outros polissacarídeos ou compostos bioativos, produzindo biomateriais diferenciados ampliando sua utilização em aplicações biomédicas e de engenharia tecidual. A acemanana (ACE) é um polissacarídeo de fácil extração encontrado na planta *Aloe vera*, é muito relatado na literatura devido a suas excelentes propriedades imunomoduladoras. Este trabalho tem o objetivo de desenvolver e caracterizar miliesferas de celulose bacteriana (CB) e CB-ACE para utilização como *scaffold* na engenharia de tecidos ou modelos tumorais in vitro. Cápsulas de CB foram produzidas variando condições de cultivo, tais como: volume reacional, fonte de carbono e linhagem bacteriana, a partir dos dados obtidos por estes ensaios, estabeleceu-se padrões para a produção de miliesferas de CB com ACE em frações de 40 e 60 % (v/v). Os ensaios mostram que conforme aumenta-se o volume reacional aumenta também o diâmetro das esferas; entretanto, diminui-se o número de esferas formadas, nota-se que amostras com ACE promoveram a produção de esferas e também um aumento na eficiência em carbono.

1. INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos sempre buscou materiais biocompatíveis que possam ser usados como *scaffolds* para o desenvolvimento de tecidos biológicos artificiais. Neste sentido, a celulose é uma boa escolha. A celulose pode ser obtida tanto de plantas como de bactérias; quimicamente elas possuem as mesmas propriedades, entretanto algumas características fazem da celulose bacteriana um biomaterial mais promissor, como: maior entrelaçamento de fibras, estrutura mais fina (menos de 10 nm de largura), a não necessidade de separação da lignina (Cannon e Anderson, 1991) o controle do formato macroscópico, visto que o hidrogel molda-se ao dispositivo de cultura, e a capacidade de retenção de líquidos em seu interior. A celulose bacteriana pode ser produzida em meio de cultura padrão ou com mistura de outros polissacarídeos, criando compósitos inovadores da interface celulose-polissacarídeo

de interesse, ampliando sua utilidade na engenharia biomédica, engenharia de tecidos e modelos de drug delivery (Amin *et al.*, 2012).

Muitos gêneros de bactéria são produtores de celulose, mas nem todas podem ser produzidas em escala industrial. Um dos gêneros superprodutores de celulose é a *Gluconacetobacter* (Tonouchi *et al.*, 1995). As espécies de *Gluconacetobacter* mais relatadas na literatura são a *G. hansenii* e a *G. xylinus*; ambas as espécies conseguem produzir tipos diferentes de celulose apenas variando a condição cinética no qual a bactéria está sendo cultivada (Czaja *et al.*, 2004). Em condições de cultura estática, o hidrogel resultante é uma membrana que se forma na interface ar-líquido e adquire o formato do frasco em que está inserido o inóculo (Hu e Catchmark, 2010). Em condições de cultura com agitação, dentro de determinadas velocidades rotacionais, podem ser obtidas esferas de CB, as quais podem variar de tamanho e quantidade produzidas, dependendo da fonte de carbono do meio de cultura, quantidade volumétrica no frasco e outras propriedades físicas como temperatura, pH e outros (Czaja *et al.*, 2004; Hu e Catchmark, 2010, 2013).

Hidrogéis de celulose bacteriana são conhecidos como bons *scaffolds* para a cultura de células. A esfera de celulose bacteriana é uma nova plataforma de estudo na engenharia de tecidos e devido a sua característica tridimensional permite uma interação celular e expressão gênica em níveis mais confiáveis e próximos do que ocorre *in vivo* (Luca *et al.*, 2013). Adicionalmente, esferas de CB podem ser aplicadas como modelos de *drug delivery*. Sua estrutura porosa e simetria permitem a difusão de fármacos de interesse em todas as direções, o que resulta numa melhor plataforma de estudo.

O uso do hidrogel de CB em uma interface com outro polissacarídeo de interesse amplifica a abrangência de suas aplicações. Este é o caso da acemanana, que é um polissacarídeo muito conhecido por suas propriedades imunomoduladoras. A acemanana é um composto extraído da babosa (*Aloe arborescens*), que permite uma melhor cicatrização e regeneração tecidual no local aplicado (Saibuatong e Phisalaphong, 2010).

Esse trabalho tem como objetivo produzir e caracterizar esferas de celulose bacteriana sintetizadas pela *G. hansenii* e *G. xylinus*, em diferentes fontes de carbono e quantidades volumétricas de meio de cultura inoculado no erlenmeyer. Caracterizou-se também o biomaterial resultante da adição de acemanana ao meio de cultivo, formando um hidrogel composto de celulose e acemanana. Adicionalmente, procurou-se caracterizar as esferas produzidas quanto ao seu diâmetro, número de esferas formadas, peso úmido e rendimento.

2. METODOLOGIA

2.1. Cepas e condições de cultura

Gluconacetobacter hansenii ATCC 23769 foi mantida em meio de cultura denominado manitol, composto por 25 g.L⁻¹ de fonte de carbono, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 3 g.L⁻¹ de peptona com pH ajustado para 6,5 (Müller *et al.*, 2011).

Gluconacetobacter xylinus ATCC 53582 foi mantida em meio Hestrin Shramm com a composição de 25 g.L⁻¹ de fonte de carbono, 5 g.L⁻¹ de peptona, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 2,7 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄, 1,2 g.L⁻¹ de ácido cítrico com pH ajustado para 6,5.

Para a produção de esferas de CB, foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 100 mL com volume útil de 60 e 80 mL. Em cada quantidade volumétrica, as fontes de carbono, glicose, glicerol ou manitol foram adicionados na concentração de 25 g.L⁻¹ e mantidas a 30 °C, sob agitação de 120 rpm, durante 6 dias.

2.2. Produção das miliesferas de CB e CB-ACE

As esferas de CB foram produzidas pela adição de 90 % (v/v) do meio de cultura e 10 % (v/v) do inóculo contendo a bactéria *G. hansenii* ou *G. xylinus*.

As esferas de CB-ACE foram produzidas a partir de uma solução de fração polissacarídica de acemanana (40 % e 60 % (v/v)) no meio de cultivo 90 % (v/v) e 10 % (v/v) do inóculo contendo a bactéria *G. hansenii* ou *G. xylinus*. Foram padronizadas a fonte de carbono (manitol) e a quantidade volumétrica (60 ml) com base nos dados de rendimentos obtidos do experimento anterior.

Após o período de incubação, as esferas de CB foram retiradas do meio de cultura e lavadas com água destilada para o processo de purificação. A purificação foi realizada utilizando 100 mM NaOH a 50 °C por 24 horas, seguidas de sucessivas lavagens com água destilada, depois ajustado o pH para 7,0. Os hidrogéis foram esterilizados por autoclave a 121°C por 20 minutos.

2.3. Medidas dos resultados

Realizou-se uma contagem total do número de esferas produzidas, e caracterizou-se o hidrogel quanto ao diâmetro, a massa média das esferas e a eficiência na conversão de carbono disponível inicialmente no meio de cultivo em carbono constituinte da celulose produzida, variando o volume reacional e a fonte de carbono.

3. RESULTADOS

3.1. Produção de esferas por *G. hansenii*

A Tabela 1 apresenta o número de esferas, o diâmetro, a massa e a eficiência na produção das esferas de celulose bacteriana produzidas pela *G. hansenii*, variando-se a fonte de carbono e a quantidade volumétrica do meio. O número de esferas produzidas pela *G. hansenii* diminui ao aumentar o volume reacional no frasco de cultura. Sendo a *G. hansenii* é uma bactéria estritamente aeróbia (Hu e Catchmark, 2010), a maior presença de oxigênio nos frascos com menor volume reacional resulta em um aumento da biomassa total produzida. A massa e o diâmetro médio apresentaram resultados similares. Ao aumentar o volume de meio no frasco, aumenta-se o diâmetro da esfera formada, e conseqüentemente a massa úmida da mesma.

Tabela 1 – Caracterização das esferas produzidas pela cepa *G. hansenii* nos volumes de 60 e 80 mL

Fonte de carbono	V. reacional (mL)	Nº de esferas	Diâmetro (cm)	Massa(g)	Eficiência (%)
Manitol	60	9,33 ± 2,08	0,51 ± 0,05	0,10 ± 0,06	0,64
	80	3,67 ± 0,58	0,66 ± 0,10	0,18 ± 0,11	0,33
Glicose	60	21 ± 0	0,39 ± 0,04	0,05 ± 0,03	0,75
	80	9 ± 2,65	0,54 ± 0,07	0,09 ± 0,05	0,42
Glicerol	60	31 ± 12,1	0,28 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,14
	80	16,5 ± 4,6	0,34 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,12

A Figura 1 apresenta o perfil do número de esferas produzidas, variando-se a fonte de carbono para cada volume reacional. Observou-se a formação de um maior número de esferas quando o cultivo foi realizado em meio contendo glicerol, entretanto, este apresentou massa média e eficiência menor que as demais fontes de carbono.

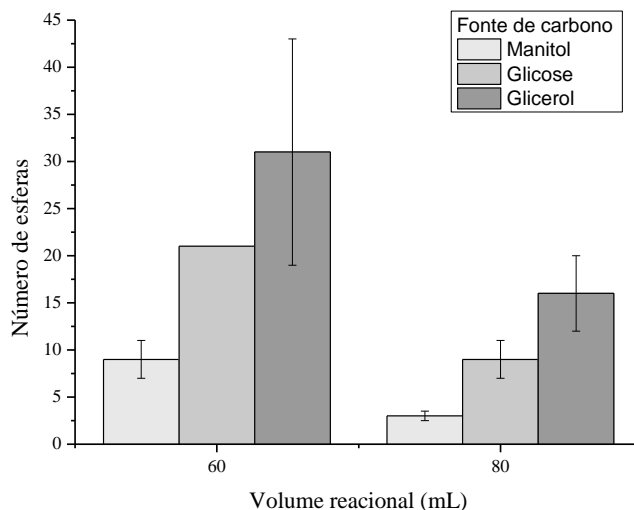


Figura 1 – Quantidade de esferas produzidas por *G. hansenii* variando a fonte de carbono e o volume reacional

A Figura 2 apresenta a distribuição do diâmetro médio das esferas produzidas. Foi possível observar que ao aumentar o volume reacional do meio de cultivo há um aumento no diâmetro das esferas produzidas, evidenciando uma relação inversamente proporcional ao número de esferas. Para a quantidade volumétrica de 60 mL, o meio de cultura contendo manitol apresentou esferas com diâmetro médio superior às demais fontes de carbono, já nos frascos com volume de 80 mL, os meios contendo manitol e glicose apresentaram valores maiores em relação ao meio contendo glicerol, resultados estes que estão de acordo com Mikkelsen *et al.*, (2009) que já mostrava o manitol como fonte eficaz na produção de celulose em massa.

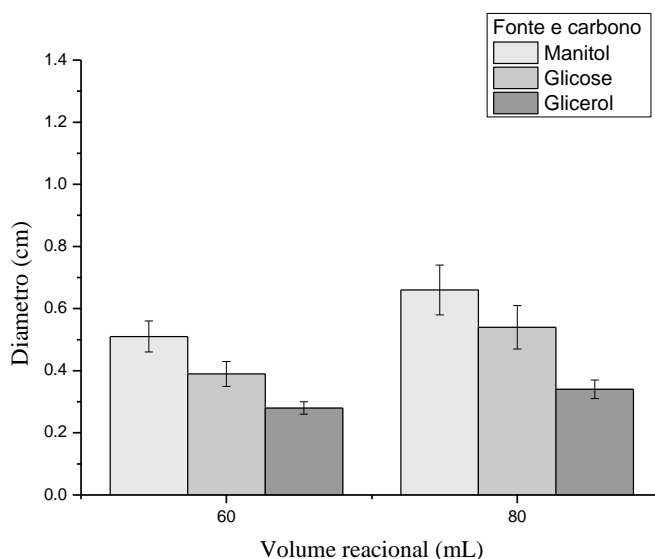


Figura 2 – Diâmetro médio das esferas produzidas por *G. hansenii* variando a fonte de carbono e o volume reacional

O cálculo da eficiência levou em consideração a quantidade total de carbono no meio de cultura em relação a quantidade de carbono convertida em celulose. Nesse aspecto, ao diminuir o volume de meio no frasco aumenta-se a eficiência. A glicose foi a fonte de carbono que apresentou a maior eficiência nesta conversão, mas as maiores esferas foram produzidas a partir de meio manitol.

3.2. Produção de esferas pela *G. xylinus*

A Tabela 2 apresenta o número de esferas produzidas pela *G. xylinus*. Observa-se que o perfil permanece o mesmo do apresentado pela *G. hansenii*. Ao aumentar o volume reacional, diminui-se o número de esferas produzidas. Porém, a *G. xylinus* produz um número de esferas menor que *G. hansenii*.

Tabela 2 – Caracterização das esferas produzidas pela cepa *G. hansenii* nos volumes de 60 e 80 mL

Fonte de carbono	V. reacional (mL)	Nº de esferas	Diâmetro (cm)	Massa(g)	Eficiência (%)
Manitol	60	8	0,81 ± 0,09	0,09	0,93
	80	2	1,08 ± 0,17	0,23	0,49
Glicose	60	9	0,68 ± 0,07	0,05	0,59
	80	3	0,87 ± 0,10	0,11	0,30
Glicerol	60	8	0,80 ± 0,07	0,09	0,82
	80	3	0,99 ± 0,19	0,14	0,34

A Figura 3 apresenta o número de esferas formadas pela *G. xylinus*. As três fontes de carbono (manitol, glicose e glicerol) produziram números de esferas semelhantes, como visto na Figura 3, entretanto, a massa úmida das esferas de glicerol foi significativamente inferior à formada pelas outras fontes de carbono.

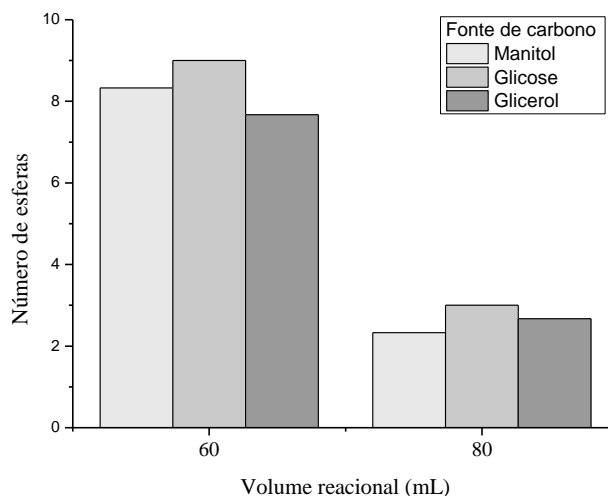


Figura 3 – Quantidade de esferas produzidas por *G. xylinus* variando a fonte de carbono e Volume reacional

A Figura 4 mostra a distribuição do diâmetro médio das esferas produzidas pela *G. xylinus* nas três fontes de carbono analisadas. Os resultados obtidos mostram que as três fontes de carbono se comportam de forma similar quanto ao diâmetro médio, a grande diferença é notada na massa úmida, e na eficiência, que o manitol apresenta resultados mais expressivos.

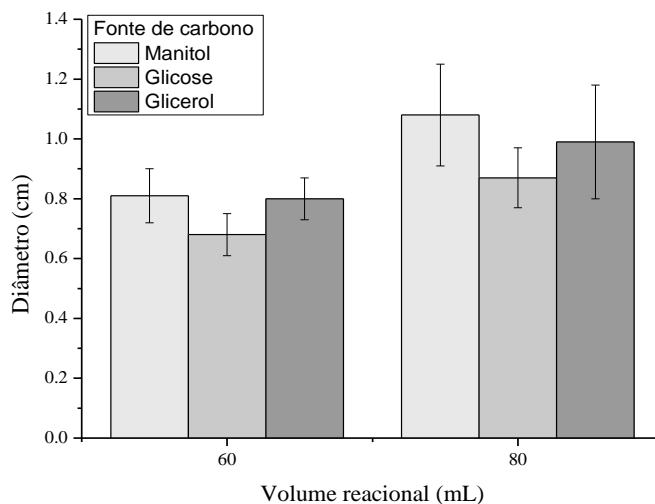


Figura 4 – Diâmetro médio das esferas produzidas por *G. xylinus* variando a fonte de carbono e o volume reacional

Quanto à eficiência na produção de celulose por essas bactérias, a *G. xylinus* apresenta valores mais expressivos do que a *G. hansenii* em ambos os volumes reacionais analisadas (Figura 5). Nota-se

claramente que ao diminuir a quantidade de meio no frasco aumenta-se o rendimento; e este resultado está de acordo com os encontrados na literatura.

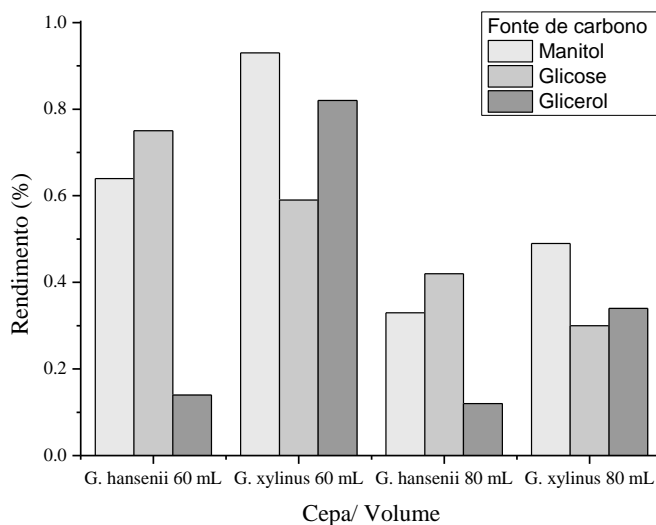


Figura 5 – Rendimento na conversão de carbono inicial do meio de cultura em carbono presente na celulose.

A fonte de carbono que apresentou um maior rendimento foi o manitol (Figura 4) e portanto, estes resultados serviram de base para a opção da esfera a ser produzida em interface com a fração polissacarídica de acemanana. A partir da padronização do volume e do meio de cultura foi possível testar a incorporação de acemanana. Nota-se na Tabela 3 que é possível produzir esferas de CB com acemanana em ambas as porcentagens de fração polissacarídica, sendo que o seu diâmetro médio não variou significativamente com a variação da porcentagem.

Tabela 3 – Quantidade e diâmetro de esferas produzidas, comparando porcentagem de fração polissacarídica em cada espécie de bactéria.

Fração de acemanana (%)	<i>G. hansenii</i>		<i>G. xylinus</i>	
	Nº de esferas	Diâmetro (cm)	Nº de esferas	Diâmetro (cm)
40	119	0,50 ± 0,04	165	0,50 ± 0,06
60	141	0,47 ± 0,06	187	0,47 ± 0,05

Entretanto, ao comparar com a CB produzida sem a presença de acemanana, nota-se um grande aumento no número de esferas resultantes, o que está de acordo com o proposto por Gu e Catchmark (2012), que mostra que ao adicionar um polissacarídeo, a quantidade de celulose formada aumenta. Quanto ao diâmetro, a presença de acemanana foi um fator limitante para as esferas. A *G. xylinus* produziu um número maior de esferas do que a *G. hansenii*.

4. CONCLUSÕES

É possível produzir esferas de CB com todas as fontes de carbono e em todas as condições testadas, entretanto, a eficiência máxima de produção foi obtida em meio manitol, com a diminuição

do volume reacional no frasco. Constatou-se que com o aumento do volume reacional há um decréscimo na quantidade de esferas formadas e um aumento no diâmetro médio das mesmas, mostrando a possibilidade de obter-se um padrão na obtenção destas estruturas. As esferas também podem ser produzidas com a adição de acemanana ao meio manitol, o que promove um aumento no número de hidrogéis formados e na produção da biomassa total.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CANNON, R. E.; S. M. ANDERSON. Biogenesis of Bacterial Cellulose. *Crit. Rev. Microbiol.* v. 17(6) p. 435-447, 1991.
- CZAJA, W., D. ROMANOVICZ.; BROWN, R. M. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose.* v.11(3-4) p.403-411, 2004.
- GU, J.; J. M. CATCHMARK. Impact of hemicelluloses and pectin on sphere-like bacterial cellulose assembly. *Carbohydr. Polym.* 88(2): p.547-557, 2012.
- HU, Y.; J. M. CATCHMARK. Formation and characterization of spherelike bacterial cellulose particles produced by *Acetobacter xylinum* JCM 9730 strain. *Biomacromolecules.* v.11(7) p.1727-1734, 2010.
- HU, Y.; J. M. CATCHMARK. Factors impacting the formation of sphere-like bacterial cellulose particles and their biocompatibility for human osteoblast growth. *Biomacromolecules* v.14(10) p. 3444-3452, 2013.
- LUCA, A. C. S. MERSCH.; PIEKORZ P. Impact of the 3D Microenvironment on Phenotype, Gene Expression, and EGFR Inhibition of Colorectal Cancer Cell Lines. *PLoS. One.* v.8(3), 2013.
- MIKKELSEN, D., B. M. FLANAGAN; G.A. DYKES.; M. G. GYDLEY. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. *J. Appl. Microbiol.* 107(2): 576-583, 2009.
- AMIN. M. C. I.; N. AHMAD.; HALIB. N.; I. AHMAD. Synthesis and characterization of thermo- and pH-responsive bacterial cellulose/acrylic acid hydrogels for drug delivery. *Carbohydr. Polym.* v.88(2): p.465-473, 2012.
- MÜLLER. D.; RAMBO. C.R.; D.O.S. RECOUVREUX.; PORTO. L. M.; BARRA, G.M.O. Chemical in situ polymerization of polypyrrole on bacterial cellulose nanofibers. *Synthetic. Metals*, v. 161, p. 106-111, 2011.
- SAIBUATONG. O. A.; M. PHISALAPHONG. Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis. *Carbohydr Polym* v.79(2) p. 455-460, 2010.
- TONOUCHI. N., N. THARA; TSUSHIDA. T; YOSHINAGA. F.; BEPPU. T.; HORINOUCI. Addition of a Small Amount of an Endoglucanase Enhances Cellulose Production by *Acetobacter-Xylinum*. *Biosci. Biotechnol.Biochem.* v. 59(5): p.805-808, 1995.