

EXTRATO DE ALGAROBA COMO FONTE ALTERNATIVA PARA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA

E. S. NASCIMENTO¹, H. S. L. LIMA¹, F. K. ANDRADE², A. I. S. BRÍGIDA³, M. F. ROSA²,
M. F. BORGES²

¹Universidade Federal do Ceará – eligenessampaio@hotmail.com

²Embrapa Agroindústria Tropical – fatima.borges@embrapa.br;
morsyleide.rosa@embrapa.br

³Embrapa Agroindústria de Alimentos – ana.iraiddy@embrapa.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o extrato de vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*) como fonte alternativa para produção de CB através de fermentação por *Gluconacetobacter hansenii*. O extrato foi caracterizado quanto à quantidade de açúcares, pH e sólidos solúveis. Foram realizados testes de influência da concentração inicial de açúcares, influência do pH e efeito da variação da suplementação com fonte de nitrogênio sobre a produção de CB. A melhor produção foi proveniente da fermentação do extrato de algaroba diluído a uma concentração de açúcares de 30 g/L, pH 4,0 e suplementado com 10 g/L de extrato de levedura. As películas obtidas do extrato com condições melhoradas foram secas em estufa e caracterizadas por, DSC, TGA, DRX, FTIR e MEV apresentando resultados típicos de celulose bacteriana quando comparados à CB produzida no meio de referência HS.

Palavras-chave: Celulose Bacteriana; Algaroba; Fermentação; Biomassa

1 INTRODUÇÃO

O crescente interesse por materiais poliméricos biodegradáveis vem alavancando estudos que insiram fontes renováveis como matéria-prima para uma produção dentro do conceito de química verde e dentre estas fontes renováveis encontra-se a algaroba, fruto da algarobeira, planta do gênero *prosopis*, rica em carboidrato fermentescível, com energia bruta comparável a do milho (STEIN *et al.*, 2005; OLIVEIRA, 2011). Os avanços tecnológicos inserem a celulose bacteriana (CB) no campo dos biomateriais de alto potencial por ser uma forma pura de celulose secretada por bactérias pertencentes, principalmente, ao gênero *Gluconacetobacter*. Trata-se de um material com propriedades únicas, incluindo altas hidrofiliidade e cristalinidade, alta resistência à tensão, rede de fibras ultrafinas e a possibilidade de ser moldada em estruturas tridimensionais e nanométricas (3D) durante a sua síntese (ANDRADE *et al.*, 2010).

A espécie *G. hansenii* é gram-negativa, tolerante a condições ácidas, cresce em uma faixa de temperatura entre 15°C - 35°C e utiliza diversas fontes de carbono para produzir, de forma estática ou agitada, celulose bacteriana que devido as suas características físicas e mecânicas possui um papel bastante promissor para aplicações em diversas áreas (CHAWLA *et al.*, 2009; TROVATTI *et al.*, 2011).

Nesse contexto, o presente trabalho investigou a potencialidade do uso do extrato de algaroba como fonte de nutrinetes, na produção de CB utilizando a bactéria *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23765.

2 EXPERIMENTAL

As vagens de algaroba, provenientes da região do Trairi, CE (TR) e Campina Grande, PB (CG). Os extratos obtidos foram caracterizados quanto ao teor de sólidos solúveis, pH e densidade do extrato de algaroba seguindo as normas do Instituto Adolf Lutz (IAL, 2008). A quantificação de açúcares foi medido por cromatografia líquida de alto eficiência (CLAE) e pelo método do ácido dinitrosalisílico (DNS) (MILLER, 1959). O nitrogênio total foi quantificado empregando-se o método micro-Kjedahl (AOAC, 1995).

O inóculo foi previamente ativado utilizando bactéria *G. hansenii* CCT 1431 em caldo HS proposto por Hestrin e Schramm (1954) esterilizado (121°C / 15 min) e incubado a 30°C por 72 horas.

O efeito da concentração inicial de açúcares (2,5 a 30 g/L), do pH inicial da fermentação (4 a 8), concentração de extrato de levedura (E.L) (0 a 15 g/L) como fonte de nitrogênio e do tempo de fermentação (0 a 15 dias) na produção e rendimento de CB (g/L), foram avaliados. O extrato de algaroba estéril (121°C / 15 min) foi distribuído, adicionando 100mL em placas de Petri com 14,5cm de diâmetro e 3% (v/v) de inóculo e em triplicata, incubadas em estufa (30°C / 5 dias). Após o período de incubação, as películas foram purificadas em solução de NaOH 4% (m/v) (80 °C / 30 min.) e o extrato fermentado foi separado para análises posteriores. Foi utilizado o meio comercial Hestrin e Schramm (HS) como referência (HESTRIN; SCHRAMM, 1954). Após a purificação as películas foram lavadas em água destilada até pH neutro, secas em estufa a 100 °C por 15 min e caracterizadas por termogravimetria (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC), difração de raios X (DrX), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Para a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) as películas foram liofilizadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de CB: Estudo dos parâmetros

Os teores de açúcares totais dos extratos variaram de 93,7g/L (TR) a 89,8 g/L (CG), sendo a frutose o principal constituinte. Esse carboidrato compõe em torno de 38% (m/v) o extrato de algaroba do Trairi e 35% (m/v) o extrato de Campina Grande, seguido de celobiose com 33 e 32%, respectivamente e glicose contribuindo com cerca de 28% (TR) e 31% (CG). Oliveira (2011), avaliando a composição de açúcares redutores das vagens da algaroba encontrou um total de 43,5 g/L. O teor de nitrogênio dos extratos variou de 1,1 g/L (TR) a 2,0 g/L (CG), sendo similares ao encontrado no HS (1,2 g/L), meio sintético de referência para produção de CB.

O resultado das avaliações realizadas do estudo da concentração de açúcar, pH, suplementação com extrato de levedura e tempo utilizando extrato de algaroba como fonte alternativa são apresentados na Figura 1. A concentração de açúcar de 30 g/L apresentou um maior ganho de massa de CB, com um rendimento de 7%, sendo, portanto selecionada como a melhor condição inicial de açúcar para a produção de CB a partir do extrato de algaroba.

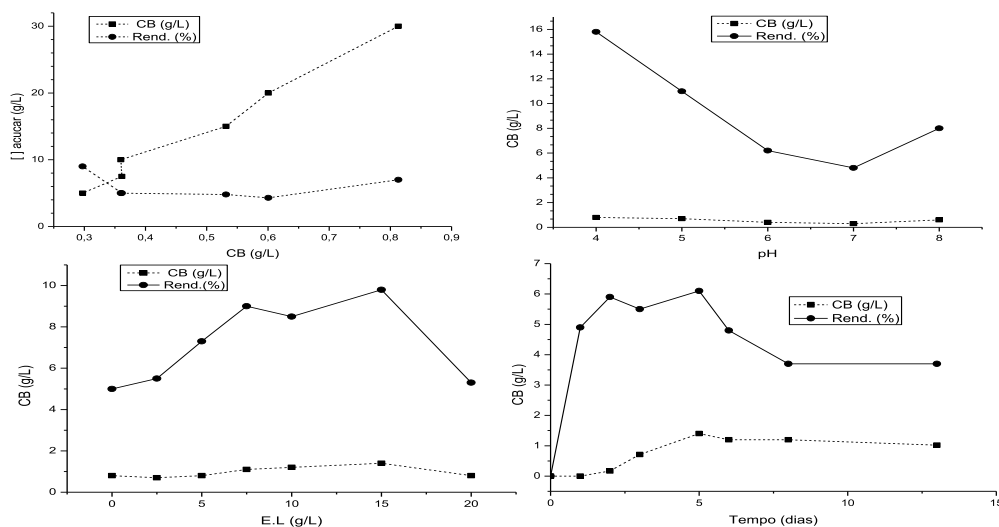


Figura 1 - Efeito da concentração inicial de açúcar (a), pH (b), suplementação com E.L(c) e tempo (d) na produção e rendimento de CB por *G. hansenii*, utilizando extrato de algaroba da região do Trairi como fonte alternativa. Em relação ao pH inicial da fermentação, os melhores rendimentos (15

e 11%) e a melhor produção de CB (0,8 e 0,7 g/L) foram obtidos em pH's 4,0 e 5,0 respectivamente, e não apresentaram diferença significativa a nível de 95% de confiança. Um aumento de 75% da produção de CB foi observado quando substrato sem suplementação ($\Delta\text{CB} = 0,8 \text{ g/L}$) é comparado ao substrato suplementado ($\Delta\text{CB} = 1,2 \text{ g/L}$).

Estudos evidenciam que a eficácia do extrato de levedura, utilizado como fonte nitrogênio para produção de CB, é a maior dentre outros compostos, como peptona e milhocina (JUNG, et al 2010; GOTTSCHALK et al 2013). O resultado para o estudo da influência do tempo no rendimento da CB obtida a partir do extrato de algaroba variou de 3,6 a 6,1% m/m, sendo seu maior valor obtido no quinto dia de cultivo, o que se leva a acreditar que nesse tempo a bactéria metabolizou o açúcar contido no substrato favorecendo também a produção visto que o maior resultado (1,4 g/L) foi obtido no quinto dia de cultivo.

De acordo com os resultados analisados a CB pode ser obtida com produção e rendimento melhorados a partir do extrato de algaroba com concentração inicial de açúcar de 30g/L, pH 4,0, suplementada com 10g/L de E.L e fermentação de 5 dias.

3.2 Caracterizações

As curvas das análises de TGA e DSC (Figura 2) apresentaram perfis característico de CB. Nesta etapa todas as análises foram comparadas com o HS, meio sintético padrão. Em ambas as curvas ocorre um primeiro evento na temperatura em torno de 100 °C, característico da perda de umidade, e um segundo evento em temperatura acima de 350°C indicando decomposição e degradação da celulose (ROMAN; WINTER, 2004). Os Índices de cristalinidade (IC) da CB proveniente do extrato de algaroba e meio sintético de referência HS foram de 92 e 91,5%. Esses resultados confirmam que a estrutura da CB obtida a partir do extrato de algaroba não foi alterada no que concerne a uma das mais importantes características da CB, visto que o grau de cristalinidade exerce influência sob algumas características físico-químicas e físicas da película como sua resistência a tração e capacidade de retenção de água (SCHENZEL *et al.*, 2005; KLEMM *et al.* 2005).

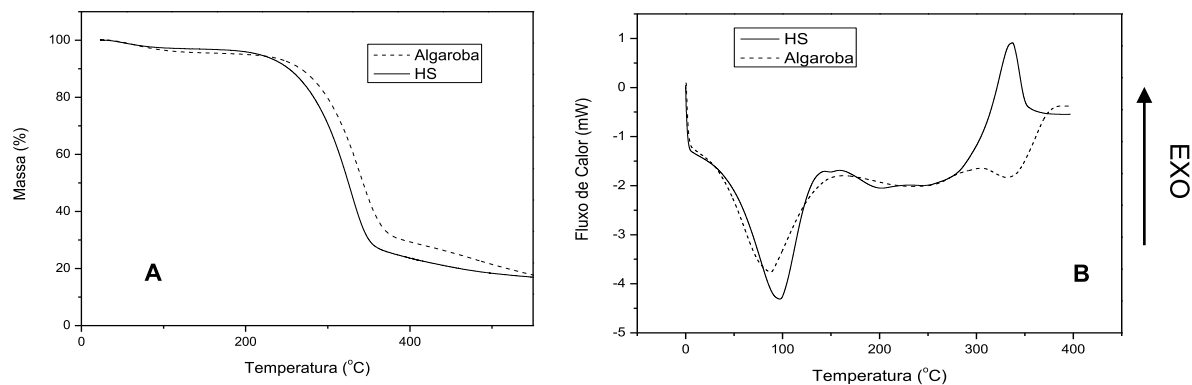


Figura 2 - Termogramas de TGA (a) e DSC (b) das CB's obtidas a partir do extrato de algaroba com condições melhoradas

A técnica de FTIR permitiu verificar e confirmar a efetividade da purificação da celulose bacteriana através de lavagens da película com NaOH 4% (m/v), pois os espectros mostram perfis característicos de CB. A estrutura em rede, composta por um emaranhado e fibras tipicamente nanométricas, é mostrada pelas micrografias das CB's obtidas a partir do extrato de algaroba com condições melhoradas e do meio sintético HS.

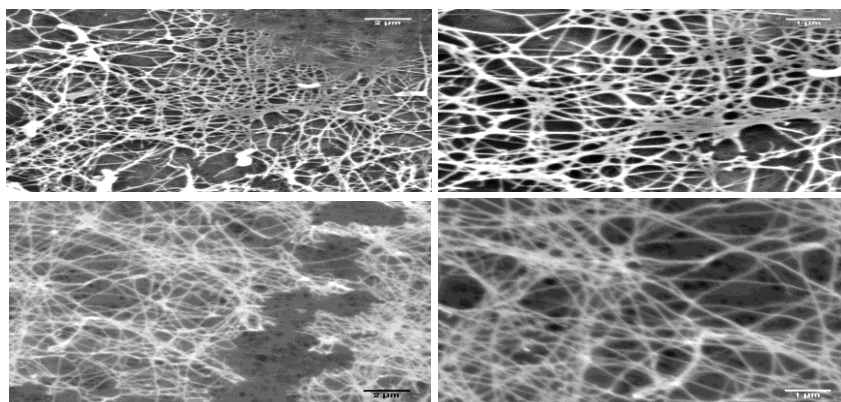


Figura 3 - Micrografias de CB obtidas a partir do extrato de algaroba com condições melhoradas e meio HS sintético. A e B – CB algaroba 5000x e 10000x / C e D – CB HS 5000x e 10000x.

4 CONCLUSÃO

As melhores condições estabelecidas para obtenção de CB utilizando o extrato de algaroba foram: pH 4,0, concentração inicial de açúcar 30 g/L, suplementação com extrato de levedura a uma concentração de 10 g/L, durante cinco dias de cultivo a temperatura de 30°C. As películas de CB produzidas nas condições otimizadas apresentaram-se com aspecto gelatinoso e adequada resistência ao manuseio. As caracterizações térmicas (TGA e DSC) e as análises de Raios-x e FTIR comprovaram ser possível obter películas com características padrões de CB obtidas em escala nanométrica, como alto grau de cristalinidade e termicamente mais estável, utilizando extrato de algaroba como substrato alternativo.

5 REFERÊNCIAS

1. STEIN, R. B. D. S.; TOLEDO, R.L.A.; ALMEIDA, F.Q.; ARNAUT, A.C.; PATITUCCI, L.T.; NETO, J.S.; COSTA, V.T.M. Effects of feeding mesquite pod meal (*Prosopis juliflora* (Swartz) D.C.) for horses. R. Bras. Zootec. v. 34, p. 1240-1247, 2005.
2. OLIVEIRA, N. F. Avaliação Físico-química e funcional da algaroba *prosopis juliflora* proveniente da mesorregião agreste do Rio Grande do Norte. Dissertação de mestrado, Univ. Fed. Rio Grande do Norte - UFRN, Fevereiro, 2011.
3. ANDRADE, F. K.; PERTILE, R. A. N.; DOURADO, F.; GAMA, F.M. Bacterial Cellulose: Properties, Production and Applications. In: LEJEUNE A.; DEPRez, T. (editors). Cellulose: Structure and Properties, Derivatives and Industrial Uses: Nova Science Publishers, Inc. p. 427-458, 2010
4. CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications, Food Technology And Biotechnology, v. 47, p. 107-124, 2009.
5. TROVATTI, E.; SERAFIM, L. S.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. Gluconacetobacter sacchari: An efficient bacterial cellulose cell-factory, Carbohydr.Polym., v. 86, n. 3, p. 1417-1420, 2011
6. LUTZ, I. A. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2008
7. MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analyt. Chem., v. 31, p. 426-428, 1959.
8. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16 ed., Washington. 1995
9. HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. Biochemical Journal, v. 58, p. 345-352, 1954.
10. JUNG, H. I. JEONG, J. H.; LEE, O.M.; PARK, G.T.; KIM, K.K.; PARK, H.C.; LEE, S.M.; KIM, Y.G.; SON, H.J. Production and Characterization of Cellulose by *Acetobacter* sp V6 Using a Cost- Effective Molasses- Corn Steep Liquor Medium. Appl. Biochem. Biotechnol., v. 162, n. 2, p. 486-497, 2010.
11. GOTTSCHALK, L.M.F.; BRÍGIDA, A.I.S.; PENHA, E.M.; SILVA, J.P.L.; SOUZA, E.F.; TERZI, S.C.; VIANA, L.A.N.; OLIVEIRA, E.M.M.; AVALIAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA PELA CEPA *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 1431 EM MEIO SINTÉTICO. IXI Simp. Nacio. Biop. Agosto. 2010. Foz do Iguaçu. PR
12. ROMAN, M.; WINTER, W. T. Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose. Biomacromolecules, v. 5, n. 5, p. 1671-1677, 2004