

PRODUÇÃO DE BIOPLÁSTICO A PARTIR DE RESÍDUOS DE CAFÉ E SEU USO COMO MATRIZ DE LIBERAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS¹

Graziela dos Santos Paulino²; Júlia Santos Pereira³; Andréa de Oliveira Barros Ribon⁴; Eveline Teixeira Caixeta⁵; Tiago Antônio de Oliveira Mendes⁶

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Pesquisa Café

² Doutoranda em Bioquímica Aplicada, UFV, Viçosa-MG, Brasil, graziela.dsp@gmail.com

³ Mestranda em Bioinformática, UFMG, Belo Horizonte-MG, Brasil, julia.spereira05@gmail.com

⁴ Professora do Departamento de Bioquímica UFV, Viçosa-MG, Brasil, abribon@ufv.br

⁵ Pesquisadora da Embrapa Café, Viçosa-MG, Brasil, eveline.caixeta@embrapa.br

⁶ Professor do Departamento de Bioquímica UFV, Viçosa-MG, Brasil, tiagoamendes@ufv.br

RESUMO: Cada vez mais tem-se buscado desenvolver produtos sustentáveis, dada a grande preocupação com a disposição de rejeitos no meio ambiente. O objetivo desse trabalho foi desenvolver um bioplástico de amido reforçado com microfibras de celulose extraídas do café e incorporado com ampicilina, para avaliação do mesmo como matriz de liberação de ampicilina. Para a fabricação do bioplástico, utilizou-se uma mistura de frutos cereja, boia e verde e o antibiótico testado para liberação controlada foi a ampicilina. Foram utilizados dois protocolos diferentes para a extração das microfibras de celulose, os resultados preliminares mostraram que o protocolo 1 foi mais eficiente. Além disso, todos os biofilmes foram capazes de liberar ampicilina, resultando na inibição do crescimento de *Escherichia Coli* BL21 em placa. Em estudos futuros pretende-se obter nanocelulose a partir da hidrólise ácida das microfibras para a criação de um bioplástico de celulose pura, que posteriormente será funcionalizado para aplicação na indústria de alimentos.

PALAVRAS-CHAVE: Biofilme, amido, café, microfibras de celulose, nanocelulose, ampicilina.

BIOPLASTIC PRODUCTION FROM COFFEE WASTE AND ITS USE AS ANTIMICROBIAN RELEASE MATRIX

ABSTRACT: Increasingly, efforts have been made to develop sustainable products, given the great concern with the disposal of tailings in the environment. In this sense, this work developed a starch bioplastic reinforced with cellulose microfibre extracted from coffee, and the ability of this polymer for controlled release of antibiotic was tested. To make the bioplastic, a mixture of cereja, boia and green fruits was used and the antibiotic tested for controlled release was ampicillin. Two different protocols were used for the extraction of cellulose microfibers and preliminary results showed that protocol 1 was more efficient. Moreover, all biofilms were able to release ampicillin, resulting in growth inhibition of *Escherichia Coli* BL21 in plate. In future studies we intend to obtain nanocellulose from the acid hydrolysis of microfibers, to create a pure cellulose bioplastic, which will later be functionalized for application in the food industry.

KEY WORDS: Biofilm, starch, coffee, cellulose microfibers, nanocellulose, ampicillin.

INTRODUÇÃO

A crescente preocupação ambiental tem estimulado a busca por produtos renováveis que possam substituir o uso de plásticos derivados do petróleo, cuja degradação é difícil e demorada (GONÇALVES, 2016; BRITO *et al*, 2011). Neste sentido, os bioplásticos desenvolvidos a partir de recursos naturais, tais como celulose, quitina e amido, apresentam-se como um substituto viável dos polímeros não renováveis, possuindo vantagens por serem biodegradáveis, biocompatíveis, e com baixo custo e toxicidade. No entanto, a tecnologia dos biopolímeros não está completamente desenvolvida, alguns parâmetros, como propriedades mecânicas e adaptação aos processos industriais precisam ser melhoradas (MARÍA, 2011; SANTOS & TAVARES;2015). A celulose, polímero natural mais abundante na natureza, pode ser utilizada na forma de fibras ou partículas, nas dimensões micro e nano, como material de reforço dos bioplásticos ou ainda como matéria prima principal dos mesmos (PEREIRA *et al*, 2014; HOSSAIN *et al*,2018). Este composto orgânico é encontrado nas fibras vegetais na forma de fibrilas que se mantêm unidas por uma rede formada por hemicelulose e lignina (MARÍA, 2011). Existem diversos tratamentos químicos, mecânicos e biológicos descritos na literatura para a separação destas fibrilas dos demais componentes da parede vegetal, resultando em partículas ou fibras de celulose de tamanhos nano ou micro (GONÇALVES, 2016). O objetivo desse trabalho foi a obtenção de bioplástico de amido reforçado com microfibras de celulose de resíduos de café e incorporado com ampicilina, para avaliação do mesmo como matriz biodegradável de liberação de antibiótico.

MATERIAL E MÉTODOS

Uma mistura de frutos cereja, boia e verde foi moída e sua granulometria controlada através de peneiras de abertura 2mm, 1mm, 500µm e 425µm (9, 16, 32, 35 mesh, respectivamente), preservando o passante em 2mm e 500µm e o retido em 1mm e 425µm, respectivamente. Além disso, foram testados dois protocolos para a obtenção das microfibras, resultando num total de 4 amostras, detalhadas na tabela 1.

Tabela 1: Granulometrias obtidas em cada protocolo

Granulometria	1-2mm	425-500µm
Protocolo 1	Amostra A	Amostra B
Protocolo 2	Amostra C	Amostra D

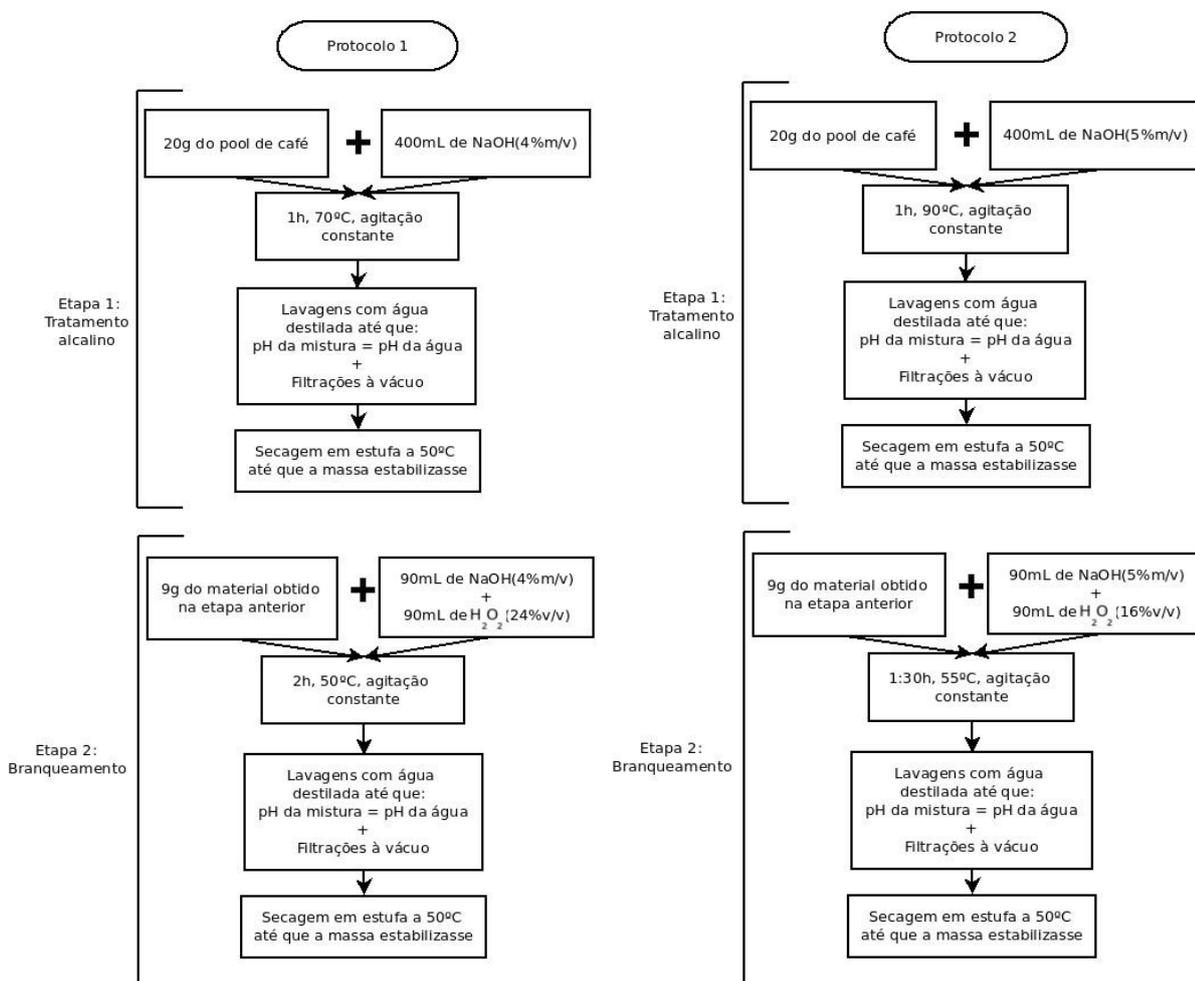


Figura 1: Diagrama esquemático dos protocolos para extração de microfibras de celulose.

Foram preparados 3 tipos de biofilmes: Biofilme 100% amido; biofilme 50% (m/v) de amido e celulose microcristalina comercial Avicel; biofilme 50% (m/v) de amido e celulose extraída da mistura de resíduos agrícola do café. O protocolo foi adaptado de THIRÈ, 2003, o efeito da variação da quantidade do plastificante glicerol de 1-5% (m/v) na produção de biofilme de amido puro também foi estudado, bem como, a influência de duas temperaturas 37°C e 67°C na secagem desses biofilmes. Para a preparação dos biofilmes usou-se 5g de amido ou 5g de amido e microfibras de celulose, dissolvidos em 50mL de água destilada a 25°C e acrescido de 2% glicerol, depois de homogeneizar a solução, foi adicionado 50mL de água destilada a 95°C e a solução final foi fervida por 15 min sob constante agitação. A solução final foi resfriada a 37°C, posteriormente foi adicionado a essa solução o antibiótico ampicilina na concentração de

100µg/µl. Finalmente, 20 mL dessa solução foi vertida em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, e levada a estufa a 37°C por 12h para secagem.

Para avaliar o efeito da liberação do antibiótico ampicilina, foi medido o halo de inibição do crescimento de *Escherichia coli* BL21 em meio sólido LB. Discos de aproximadamente 0,5 mm do biofilme de amido e microfibras de celulose dos resíduos agrícolas de café foram cortados e sobrepostos sobre o meio sólido, contendo a *Escherichia coli* BL21, em seguida, levado a estufa a 37° C por 12 h, após esse tempo o halo de inibição foi medido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento alcalino realizado com solução de hidróxido de sódio nas fibras do café, promove a ionização do grupo hidroxila (OH) a alcóxido, rompendo as ligações de hidrogênio presentes na estrutura das fibras e as deixando mais soltas, além de remover grande quantidade de lignina, cera, óleos e hemicelulose das fibras (BELTRAMI, 2014). Nenhuma dessas alterações na estrutura da fibra é visível a olho nu e por isso, propõe-se caracterizá-las por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Análise de Composição Química, Análise Termogravimétrica (TGA) e Difração de Raio-X (DRX), para analisar, respectivamente, a microestrutura, os componentes químicos residuais, a estabilidade térmica e a cristalinidade, confirmando assim que houve remoção dos constituintes amorfos nesse processo e as fibras de celulose estão mais soltas. Na **Figura 2** são mostradas as 4 amostras após o tratamento alcalino e na **Figura 3** são mostradas as amostras após serem submetidas à etapa de branqueamento.



Figura 2: Amostras após tratamento Alcalino



Figura 3: Amostras após branqueamento

Por outro lado, o tratamento de branqueamento visa reduzir os constituintes amorfos que possuem grupos cromóforos, responsáveis pela coloração amarelada/amarronzada das fibras; neste caso, a lignina remanescente do tratamento alcalino (BENINI, 2015). Sendo assim, podemos perceber que a etapa de branqueamento foi eficaz, dado o clareamento perceptível das amostras após etapa a 2. Além disso, aparentemente, o branqueamento feito no protocolo 1 foi mais efetivo, já que as amostras A e B mostram-se mais claras que a C e D. Sugere-se também que o material seja caracterizado pelas análises descritas para a etapa de tratamento alcalino, a fim de confirmar as observações feitas.

Foram testadas simultaneamente os efeitos da concentração de glicerol com variações de 1-4% (m/v) e duas temperaturas de secagem 37°C e 67°C nos biofilmes de amido puro. Esses biofilmes produzidos foram avaliados de acordo com a maleabilidade, definida como o grau de fragilidade dos biofilmes. As **Figuras 4 e 5** mostram os efeitos simultâneos da concentração de glicerol e temperatura de secagem sobre biofilmes de amido puro, como podemos notar, os biofilmes secos a 37°C se mostraram menos quebradiços em relação aos biofilmes secos a 67°C, logo, a melhor temperatura para secagem desses biofilmes de amido é 37°C. Avaliando apenas os biofilmes secos a 37°C, podemos ver que o biofilmes com 2% de glicerol, apresentaram maior maleabilidade, ou seja, menos quebradiços, sendo assim, para próximas etapas deste trabalho usaremos glicerol a 2% (m/v) e temperatura de 37°C para a fabricação de bioplástico. Após escolher a concentração de glicerol e a temperatura ideal para o biofilme de amido puro, foi incorporado ao mesmo microfibras de celulose extraída da mistura de resíduos agrícola de café, originando dessa forma um biofilme compósito. A adição de celulose ao biofilme de amido, tem como principal finalidade aumentar a resistência mecânica desse bioplástico, já que, biofilmes de amido apresentam baixa resistência mecânica em relação aos plásticos convencionais (Gáspár, *et al.*,2005), após a adição das microfibras de celulose, os biofilmes tornaram opacos e mais maleável, sendo capaz de ser dobrado manualmente como mostra a **Figura 6**.

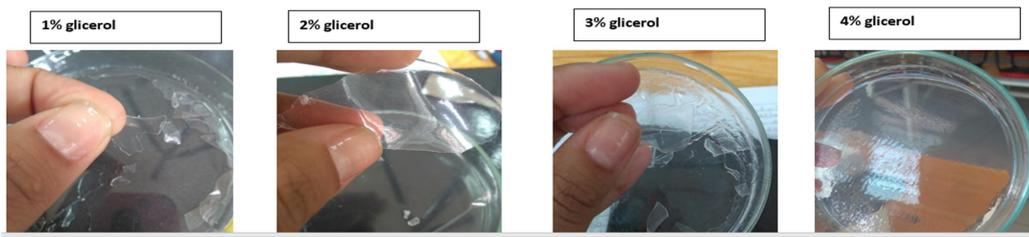


Figura 4: Efeito da concentração do plastificante glicerol no biofilme de amido puro, seco a 37°C

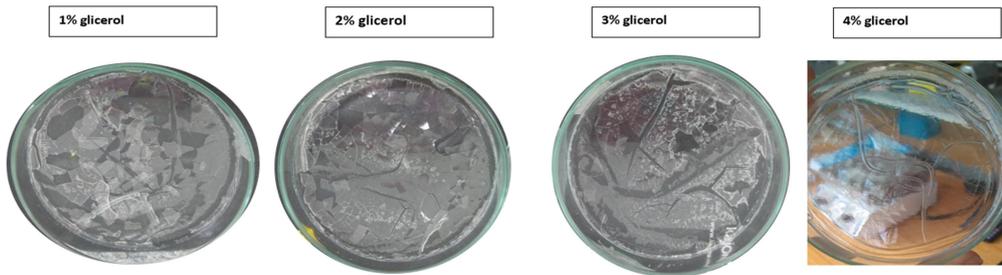


Figura 5: Efeito da concentração do plastificante glicerol no biofilme de amido seco a 67°C



Figura 6: Bioplástico composto de amido e microfibras de celulose

Em geral, polímeros biodegradáveis e sintéticos são usados como meios de liberação controlada de moléculas utilizados na indústria, principalmente na indústria farmacêutica e alimentícia. Uma vantagem do uso de biopolímeros biodegradáveis como os compostos de amido e celulose para a liberação de moléculas antimicrobianas, é sua biocompatibilidade, o que o torna apto para uso na indústria farmacêutica e alimentícia, um exemplo, são os curativos e embalagens inteligentes que usam, quitosana, celulose e/ou amido, entre outros biopolímeros, como superfície de liberação controlada de moléculas (UGALDE, 2014). Neste trabalho, testou-se a liberação de ampicilina, através de biofilmes compostos de amido e microfibras de celulose extraída dos resíduos agrícolas de café, a liberação de ampicilina foi detectada pelo teste de halo de inibição do crescimento de *Escherichia coli* BL21. Foram testados a liberação de ampicilina, através de 6 biofilmes, os biofilmes de A-D, são biofilmes feitos pela mistura de microfibras de celulosas submetidas a diferentes tratamentos de extração com amido. Foram testadas também a liberação de ampicilina pelo biofilme de amido puro e biofilme de amido com celulose microcristalina comercial AVICEL. Como resultados obtivemos os halos de inibição de crescimento de *Escherichia coli* BL21 descritos na Tabela 2 e ilustrados na **Figura 7**, todos os biofilmes foram capazes de formar halos de inibição bacteriana, os maiores halos de inibição foram obtidos para os biofilmes de amidos composto de Avicel (1,6 cm) e composto A e B (1,5 cm e 1,0 cm). O composto de Avicel teve o maior de inibição de crescimento de *Escherichia coli* BL21, devido a maior liberação de antibiótico, isso pode ser explicado pelo fato do Avicel ser micropartículas de celulose, formando uma malha de biopolímero menos densa do que as malhas formadas por microfibras de celulose, como no caso do composto A, as microfibras são capazes de formar redes poliméricas mais densa e dessa forma liberar mais lentamente a ampicilina, como observamos nos resultados dos bioplástico compostos obtidos a partir das microfibras de celulose dos resíduos de café. Essa liberação lenta, pode ser vantajosa para aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica, já que, uma liberação lenta de antibiótico, pode ser capaz de aumentar a vida útil de prateleira dos alimentos, por exemplo.

Tabela 2: Halo de inibição do crescimento de *Escherichia coli* BL21 devido a liberação de ampicilina pelos biofilmes compostos de amido e microfibras de celulose do café

Biofilmes	Halo de inibição (cm)
A	1,5
B	1,0
C	0,8
D	0,9
Avicel + Amido	1,6
Amido	2,3

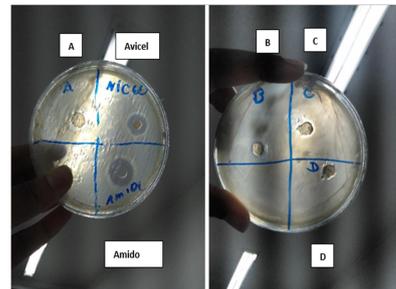


Figura 7: Halo de inibição do Crescimento de *Escherichia coli* por liberação de ampicilina pelos biofilmes de amido e microfibras de celulose.

CONCLUSÕES

Microfibras de celulose foram extraídas de um pool de frutos do café Boia, Cereja e Verde, com a finalidade de atuarem como agentes de reforço numa matriz de bioplástico de amido. Os resultados preliminares mostraram que o tratamento alcalino e o branqueamento das fibras foram eficazes no sentido de remover os componentes amorfos (lignina, hemicelulose, dentre outros) presentes neste material, expondo assim as microfibrilas de celulose, para que cumpram o seu papel de reforço no compósito. Mostrou-se também que esses bioplásticos compostos tem capacidade de liberar ampicilina, podendo ser utilizados futuramente pelas indústria de alimento e farmacêutica. Nas próximas etapas desse trabalho as microfibras serão caracterizadas por MEV, TGA, DRX e análise de composição química, além disso, a liberação de outros compostos de interesse serão estudadas. Como perspectivas futuras, planeja-se obter a partir da hidrólise ácida das microfibras de celulose, uma solução de nanocelulose, para a produção um bioplástico de nanocelulose pura originaria dos resíduos de café.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELTRAMI, Lilian Vanessa Rossa; SCIENZA, Lisete Cristine; ZATTERA, Ademir José. Efeito do Tratamento Alcalino de Fibras de Curauá sobre as Propriedades de Compósitos de Matriz Biodegradável. Polímeros, Caxias do Sul, 20 maio 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-14282014000300018&script=sci_abstract&tlng=es. Acesso em: 10 ago. 2019.
- BENINI, Kelly Cristina Coelho De Carvalho. Compósitos de nanocelulose/phbv: manta microfibrilica por eletrofiação. 2015. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2016. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/123382?locale-attribute=en>. Acesso em: 10 ago. 2019.
- BRITO, G.F. et al, Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. Revista eletrônica de Materiais e Processos. V.6. n.2.p.127-139.2011.
- GÁSPÁR, M. et al., Reducing water absorption in compostable starch-based plastics. Degradation and Stability. v.90.p563-569.2005.
- GONÇALVES, LUÍSA MARIA NUNES. Preparação e caracterização de celulose a partir do pseudocaule da bananeira por hidrólise ácida. 2016. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Materiais) - Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2016. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/155351>. Acesso em: 28 mar. 2019.
- HOSSAIN, A.B.M.S., et al, Nano-celulose biopolymer based nano- biofilm biomaterial using plant biomass: Innovative plant biomaterial dataset. Data in Brief. v.17.p.1245-1252.2018.
- LENGOWSKI, ELAINE CRISTINA. FORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES COM NANOCELULOSE. 2016. Tese (Doutor em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/47372>. Acesso em: 14 mar. 2019.
- MARÍA, Andrade Mahecha Margarita; RITA, Tapia Blácido Delia; CECILIA, Menegalli Florencia. Filmes Biodegradáveis: Incorporação de Microfibras e Nanofibras de Celulose Obtidas de Fontes Vegetais. Revista Especializada em Ingeniería de Procesos en Alimentos e Biomateriales, [S. l.], ago 2011. Disponível em: <http://oaji.net/articles/2017/5082-1501176442.pdf>. Acesso em: 22 maio 2019.
- PEREIRA, Fabiano Vargas et al. Bionanocompósitos preparados por incorporação de nanocristais de celulose em polímeros biodegradáveis por meio de evaporação de solvente, automontagem ou eletrofiação. Química Nova, [S. l.], 3 abr. 2014.

SANTOS,A.T. Desenvolvimento e caracterização de Bioplástico a base de amido de jaca com incorporação de lizosima. Dissertação. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós Graduação em Engenharias e Ciências de alimentos.2015.

SANTOS,F.A.; TAVARES,M.I.B. Developmetn of biopolymer/celulose/sílica nanostructured Hybrid materials and therir characterisation by NMR relaxometry. Polymer Testing.v.47.p.92-100.2015.

THIRÈ,R.M.S. Obtenção e caracterização de filmes biodegradáveis á base de amido de milho com reduzida sensibilidade água.TESE. Programas de pós - Graduação de engenharia da Universidade do Rio de Janeiro.Março de 2003. Rio de Janeiro. Brasil.

UGALDE,M.L.Biofilemes ativos com incorporação de óleos essenciais. Univeversidade Regional Integrada – URI ERECHIM. Tese. Rio Grande do Sul.2014.