



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**KENYA KARLA FELICÍSSIMO GONÇALVES**

Desenvolvimento de Biomateriais de Origem Microbiológica Visando  
à Produção de Placa Miorrelaxante e Outras Aplicações Industriais

Salvador  
2015

**KENYA KARLA FELICÍSSIMO GONÇALVES**

Desenvolvimento de Biomateriais de Origem Microbiológica Visando à  
Produção de Placa Miorrelaxante e Outras Aplicações Industriais

Tese apresentada à Renorbio, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

Orientador: **Paulo Fernando de Almeida**

Co-orientadora: **Elinalva Maciel Paulo**

Salvador  
2015



## Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal da Bahia - UFBA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Av. Reitor Miguel Calmon s/n – Vale do Canela  
40100-000, Salvador-BA



Telefone: (71) 3283-8921 - E-mail: [renorbioba@ufba.br](mailto:renorbioba@ufba.br)

---

### TERMO DE APROVAÇÃO

A Tese:

#### "DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS DE ORIGEM MICROBIOLÓGICA VISANDO À PRODUÇÃO DE PLACA MIORRELAXANTE E OUTRAS APLICAÇÕES INDUSTRIAIS"

Elaborada por:

**KENYA KARLA FELICÍSSIMO GONÇALVES.**

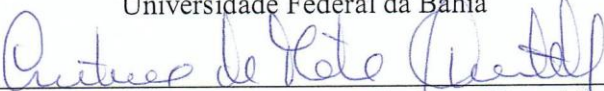
Foi aprovada por todos os membros da banca examinadora e aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Renorbio como requisito parcial à obtenção do título de DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA.

Salvador, Bahia, 01 de outubro de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Paulo Fernando de Almeida**  
(Orientador)

Universidade Federal da Bahia

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Cristina Maria Assis Lopes Tavares da Mata Hermida Quintella**


Universidade Federal da Bahia

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Nádia Mamede José**

Universidade Federal da Bahia

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Celso Carlino Maria Fornari Junior**

Universidade Estadual de Santa Cruz

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Marcelo Massayosshi Ueki**

Universidade Federal de Sergipe

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Gesil Sampaio Amarante Segundo**

Universidade Estadual de Santa Cruz

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio (in memoriam) e Marlene, que me fizeram compreender o significado do amor e me transmitiram a fé. A Leandro, pela compreensão e companheirismo. Aos meus irmãos, irmãs, cunhados e sobrinhos, pela presença em minha vida!

## AGRADECIMENTOS

O maior desafio neste momento sublime é o de não esquecer alguém, o de reconhecer a contribuição de todos. Todas as minhas conquistas foram sempre divididas com pessoas especiais. Dessa forma, me desculpem os que não forem citados, mas a exaustão física neste momento é imensa.

A parte mais especial foi conquistar uma querida amiga, Aldinéia. Agradeço seu apoio incondicional, saiba que a sua participação foi fundamental para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida, pela colaboração.

À Profa. Dra. Cristina Quintela pelo acolhimento e pelas sábias palavras ditas.

O presente trabalho foi apoiado pela CAPES - coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior.

Aos meus parceiros de trabalho e aos amigos, pela minha ausência durante a execução deste trabalho.

A todos os professores consultados e sempre prontos a orientar e contribuir.

Aos técnicos de laboratórios utilizados por mim para a realização de todo o trabalho, por tantas análises de caracterização.

Aos engenheiros Joao Tan e Luiz Henrique, pelo apoio principalmente na interpretação e organização dos dados.

À minha família, que amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.

À minha tia Carol, Ir Elizabeth e Ir Lilian, vocês sempre me apoiaram e fizeram parte dessa fase tão gostosa e difícil da minha vida.

A todos os meus colegas do RENORBIO e da graduação em Biotecnologia da UFBA, que fizeram parte dessa fase da minha vida.

À Profa. Dra. Elinalva M. Paulo, por sua ajuda nos momentos mais críticos, por acreditar no futuro deste projeto e contribuir para o meu crescimento profissional.

Aos Profs. Drs. Celso Carlino Maria Fornari Junior e Milton Ricardo de Abreu Roque, por terem me acolhido e me ajudado no momento decisivo para o desenvolvimento deste trabalho.

E o meu agradecimento especial só poderia ser dedicado a Leandro Barreto, que esteve ao meu lado incondicionalmente, nos momentos mais difíceis, que não foram raros neste último ano, e me mostrou a grandiosidade do nosso relacionamento.

Obrigada a todos!

**Aos laboratórios:**

- **BIOPROPECTOR** - LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA APLICADA E BIOPROSPECÇÃO, NO INSTITUTO DE CIÊNCIA DA SAÚDE-UFBA.
- **CAPES** - COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR.
- **GECIM** - LABORATÓRIO DO GRUPO DE ENERGIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, NO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UFBA.
- **LABAREMN** - LABORATÓRIO BAIANO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.
- **LABCAT** - LABORATÓRIO DE CATÁLISE E MATERIAIS, NO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UFBA.
- **LABORATÓRIO DE ALERGIA E ACAROLOGIA** - NO INSTITUTO DE CIÊNCIA DA SAÚDE-UFBA.
- **LABORATÓRIO DE CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS** – IFBA.
- **LAMASP** - LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA APLICADA A SAÚDE PÚBLICA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA.
- **LAMUME** - LABORATÓRIO MULTIUSUÁRIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA, NO INSTITUTO DE FÍSICA DA UFBA.
- **LAPOS** - LABORATÓRIO DE POLÍMEROS E SISTEMAS (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ, no DCET – DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS).
- **CACAU** - CENTRO DE ARMAZENAMENTO DE DADOS E COMPUTAÇÃO AVANÇADA DA UESC (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ).

GONÇALVES, Kenya Karla Felicíssimo. Desenvolvimento de Biomateriais de Origem Microbiológica Visando à Produção de Placa Miorrelaxante e Outras Aplicações Industriais. Xx f. 2015. Tese (Doutorado) - Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

## RESUMO

Com o avanço da biotecnologia, aumentou muito o interesse pelos produtos de origem microbiana. Alguns dos fatores que motivam a utilização de produtos microbianos em substituição às fontes convencionais são as possibilidades dos controles automatizados, a disponibilidade de matéria-prima renovável e independência de variações climáticas. Os polímeros de origem bacteriana, também chamados biopolímeros, têm sido objeto de muitos estudos, em especial os exopolissacarídeos, devido às suas bem-sucedidas aplicações industriais. As bactérias ácido-láticas possuem numerosos gêneros produtores de biopolímeros, a exemplo dos exopolissacarídeos. Quase todos os biopolímeros apresentam algumas propriedades importantes para sua aplicação, e alguns possuem pouca rejeição por parte dos tecidos corporais, a exemplo das dextranas que possuem grandes aplicações na indústria farmacêutica e alimentícia. Estas qualidades da dextrana foram decisivas para a sua utilização neste trabalho, que consiste no desenvolvimento de um biomaterial para a produção em escala industrial de uma placa miorrelaxante e um protetor de esporte. Nos últimos anos, vem ocorrendo uma necessidade de se utilizar materiais naturais e não nocivos ao meio ambiente, e a borracha natural volta a ter importância perdida para a borracha sintética. As instituições de pesquisa são as responsáveis pela geração do conhecimento necessário para garantir a competitividade do setor. Algumas delas, como a Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária, e a ESALQ – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, têm sido pioneiras nas pesquisas de melhoramento. A fibra de coco constitui uma alternativa por ser biodegradável e reciclado; o biopolímero dextrana também, já que é biodegradável. Isso economiza cargas a base de petróleo (negro de fumo) e inorgânicas (carbonato de cálcio ou argilas) na formação de materiais, diminuindo os impactos ambientais causados pela disposição inadequada de seus resíduos. Assim, com intuito de melhorar as propriedades do látex não vulcanizado, adicionou-se fibra de coco e dextrana como agentes de reforço, resultando em dois novos compósitos. Realizou-se a caracterização dos compósitos e de cada um dos elementos que fazem parte da constituição. Estudou-se suas características mecânicas do compósito em função da quantidade dos agentes. E conseguiu-se desenvolver um protótipo do produto final, a placa miorrelaxante-SLEEPCONFORT.

Palavras chave: dextrana insolúvel, caracterização mecânica, látex, fibra de coco, compósitos

GONCALVES, Kenya Karla Felicíssimo. Development Microbiological Origin Biomaterials order to board production muscle relaxant and Other Industrial Applications. Xx f . 2015. Thesis (Ph.D. ) - Northeast Biotechnology Network, Federal University of Bahia, Salvador, 2015

## ABSTRACT

Together with the advances in biotechnology, the interest in microbial products increased. Some of the reasons that motivate the usage of microbial products instead of conventional sources are: the possibility of automated controls; renewable raw material availability and independence of climatic variations. Polymers of bacterial origin (Biopolymers) have been long studied, exopolysaccharides in particular, due to the success in industrial applications. Acid lactic bacteria have several biopolymers producers' genders; the exopolysaccharides is one of the polymers produced. Almost all the biopolymers have some properties that can be applied. Dextran is widely used in pharmaceutical and food industries; it is one of the biopolymers that are not rejected by the body tissues (Vidal, 2011). Due to the dextran qualities mentioned above, this polymer was chosen to be used in this project. The project consists on the development of a biomaterial to produce (in industrial scale) an protector for the teeth to bruxism and a Sports Mouth Guards. In the last years, there has been a need to use sustainable natural materials. The natural rubber regained the importance it lost against the synthetic rubber. There are many research institutions that supply the necessary knowledge to guaranty the productivity of those sustainable materials in the market. In Brazil, Embrapa-Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária e a ESALQ- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz have been pioneers researching the sustainable materials improvements. As dextran, coir fiber is a biodegradable and recycled alternative. Coir constitutes an alternative reinforcing filler. Coir's usage save oil based fillers (lampblack) or inorganics (calcium carbonates or clays) when forming materials, decreasing the environmental impacts caused by improper disposal of their waste. Therefore, in order to improve the properties of unvulcanized latex, coir fiber and dextran are added as reinforcing fillers resulting in two new composites. The characteristics were studied in relation with the quantity of agents they have it was also characterized each component separately and the developed composites. Studied mechanical characteristics of the composite according to the number of agents and it had developed a prototype of the final product, myorelaxant-SLEEPCONFORT.

Keywords: insoluble dextran, structural characterization, rubber latex, coir fiber, composites



# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRAFICA</b>	<b>11</b>
2.1	Biopolímero	11
2.2	Exopolissacarídeo	13
2.3	Dextrana	15
2.4	Estrutura da Dextrana	16
2.5	Gênero <i>Leuconostoc</i>	17
2.6	Processos de produção	18
2.7	Processo fermentativo convencional	19
2.8	Produção por via enzimática	20
2.9	Meio de cultivo para a produção da dextrana	21
2.10	Estabilidade enzimática e mecanismo de ação da dextranasacarase	22
2.11	Caracterização	25
2.12	Otimização	26
2.13	Blendas de polímeros	27
2.14	Inovação	28
2.15	Patente: Produção de Exopolissacarídeo Insolúvel	28
2.16	Produto	29
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADO E PRODUTOS GERADOS</b>	<b>33</b>
4.1	MANUSCRITO 1: Produção e caracterização da dextrana solúvel e insolúvel produzida pela linhagem nativa de <i>Leuconostoc pseudomesenteroides R2</i>	33
4.2	MANUSCRITO 2: Obtenção e caracterização de compósitos de látex com fibra de coco e dextrana	64
4.3	PATENTE: Produção de exopolissacarídeo insolúvel	88
4.4	PRODUTO: Placa Miorrelaxante	104
<b>5</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>105</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>106</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>107</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>119</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A necessidade de reduzir a quantidade de materiais plásticos desperdiçados e descartados no meio ambiente (DA RÓZ, 2003; SOARES, 2002) é tema de discussão atual que envolve ambientalistas, poder público, pesquisadores, empresários e a comunidade. Esta preocupação também faz parte do dia a dia das empresas brasileiras que exportam ou tem interesse em exportar seus produtos para a Europa. Esses problemas ambientais têm impacto econômico direto, pois alguns países com legislação mais rígida exigem algum tipo de certificação de que os produtos e suas embalagens não agridam o meio ambiente (AGERON, 2012; IASEVOLI, 2012; BRITO, 2010; SEURING, 2008; JARDIM, 2000; BESNAINOU, 1996). No Brasil, apesar do incentivo à reciclagem, que depende em grande parte da coleta e seleção do produto, os municípios brasileiros que possuem algum tipo de coleta seletiva não atingem a totalidade de recicláveis (ALMEIDA, 2008; DA RÓZ, 2003).

Há algum tempo a busca por novas opções para a substituição dos plásticos convencionais vem mobilizando cientistas e ambientalistas. Neste contexto, a biotecnologia tem proporcionado ao mercado a possibilidade de produzir polímeros com menor custo e a via microbiana tem sido destaque. Vários polímeros biodegradáveis, tais como, por exemplo, os polissacarídeos, poli-hidroxicanoatos (PHAs), que são poliésteres de ácidos hidroxialcanoicos ou hidroxialcenóicos, os poli-lactatos (PLAs), os poli-glicolatos (PGAs), os polialcools, as gomas, e diversos novos produtos são benéficos e são frutos da biotecnologia. Muitos deles são aplicados na indústria alimentícia e outros setores mais sofisticados, como na

indústria da biomedicina (implantes odontológicos, tecidos artificiais, fios para sutura etc). Os biopolímeros são materiais fabricados a partir de fontes renováveis (soja, milho, cana-de-açúcar, celulose, quitina, quitosana, soro de leite etc), que têm importância estratégica para o futuro, principalmente os que utilizam a energia renovável em todo seu ciclo de vida. Podem ser biodegradáveis e/ou biocompatíveis, o que lhes conferem vasta gama de aplicações. Os biopolímeros são materiais poliméricos classificados estruturalmente como polissacarídeos, poliésteres ou poliamidas, cuja matéria-prima principal para a sua manufatura é uma fonte renovável de carbono, como cana-de-açúcar, milho, batata, trigo e beterraba; ou óleo vegetal extraído de soja, girassol, palma ou outra planta oleaginosa.

Polímero é uma palavra que originou-se do grego poli (muitos) e mero (unidade de repetição). É constituído de macromoléculas formadas a partir de unidades estruturais menores (os monômeros). O número de unidades estruturais repetidas em uma macromolécula é chamado grau de polimerização. Em geral, os polímeros contêm os mesmos elementos nas mesmas proporções relativas que seus monômeros, mas em maior quantidade absoluta. Dependendo do tipo de monômero (estrutura química), do número médio de meros por cadeia e do tipo de ligação covalente, pode-se dividir os polímeros em três grandes classes: borrachas, plásticos e fibras.

Foi utilizada a cepa isolada do semiárido baiano, a linhagem nativa *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2, referenciada por Paulo, E. M. (2012) para a produção de dextrana solúvel e insolúvel descritas nos manuscritos 1 e 2. Este trabalho teve como objetivos: i) produzir exopolissacarídeos da linhagem nativa de *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2, identificá-los e caracterizá-los, visando utilizá-los com finalidades industriais; ii) produzir compósitos à base de borracha

natural reforçada com fibra de coco e dextrana, para produção de placa miorreaxante e protetor da boca durante atividades esportivas. O objetivo final é inserir no mercado um produto inovador como resultado desse trabalho.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Biopolímero**

Os polímeros de origem bacteriana, ditos “polímeros verdes” ou também chamados de biopolímeros, são materiais poliméricos classificados estruturalmente como polissacarídeos, poliésteres ou poliamidas. Eles têm sido objeto de muitos estudos, em especial os biopolissacarídeos, devido a suas bem-sucedidas aplicações industriais (PADMANABHAN, 2002).

A matéria-prima principal para sua manufatura é uma fonte de carbono renovável, geralmente um carboidrato derivado de plantas comerciais de larga escala, como cana-de-açúcar, milho, batata, trigo e beterraba; ou um óleo vegetal extraído de soja, girassol, palma ou outra planta oleaginosa (PADMANABHAN, 2002). Estes produtos são de grande interesse industrial, principalmente nas indústrias farmacêuticas e de alimentos. O mercado tem aceitado muito bem os biopolímeros, e eles têm sido aplicados na indústria farmacêutica, de biotecnologia e indústria de alimentos (SHAMALA, 1995; TSUCHIYA, 1952). O uso desses

compostos têm aumentado desde a crise financeira de 2008/2009, que afetou a indústria do petróleo e, conseqüentemente, os polímeros derivados dele.

As bactérias podem sintetizar uma diversidade de biopolímeros que, quando ocorrem alterações das variáveis biológicas, mudam-se as características do produto final. Os polímeros têm um papel importantíssimo na sociedade moderna, estando presente em praticamente todos os setores da economia, como: medicina, agricultura, construção civil, embalagens e eletroeletrônicos.

Não é fácil decidir sobre a classificação dos polímeros biodegradáveis, mas uma das classificações foi realizada incluindo polímero natural e dividindo em seis subgrupos. São eles: polissacarídeos; proteínas; lipídios; poliéster produzido por micro-organismos ou plantas; poliéster sintetizado por monômeros; e grupo final de diversos polímeros.

Nos últimos anos, os polissacarídeos mais estudados têm sido os biopolímeros, devido a algumas vantagens na sua obtenção em relação às outras gomas, tais como: produção independente de condições climáticas, possibilidade de utilização de matérias-primas regionais, maior rapidez na obtenção do produto acabado e necessidade de espaço relativamente pequeno. Além dessas vantagens, apresentam a possibilidade de um rígido controle dos parâmetros de fermentação, como pH, temperatura, taxa de aeração, velocidade de agitação, tempo de fermentação e composição do meio de cultura (CAO, 2011). Desta forma, os polissacarídeos microbianos podem ser produzidos em condições controladas e com espécies selecionadas, onde os problemas de variação de estrutura podem ser evitados. Além disso, os polissacarídeos microbianos apresentam alta regularidade estrutural, que é raramente encontrada em polímeros de outras fontes. Entretanto, há necessidade de um rígido controle das condições de fermentação, uma vez que

diferentes parâmetros de produção levam à obtenção de produtos com características heterogêneas (SUTHERLAND, 2001).

Atualmente, há considerável interesse em polissacarídeos obtidos pela ação de micro-organismos. Além disso, os biopolímeros apresentam vantagens também em relação aos polissacarídeos de origem vegetal e animal, tais como: reprodutibilidade e estabilidade das propriedades físico-químicas, custo e suprimento estáveis (TABONEA, et al, 2015; CASTELLANE, et al 2015). Os polissacarídeos microbianos atualmente utilizados em produção industrial são a dextrana, que é uma glucana neutra, e a xantana, um heteropolissacarídeo (SANTOS, 2011; CAPPELLE, LACAZE e WICK, 2007). A produção de polissacarídeos extracelulares é muito comum em muitos gêneros de bactérias. Esses exopolissacarídeos podem formar uma cápsula ao redor da célula ou podem ser excretados para o meio ambiente como um muco (COPLIN e COOK, 1990).

## 2.2. Exopolissacarídeo

Exopolissacarídeos (EPS) são polissacarídeos de cadeia longa, principalmente secretado por bactérias e microalgas no exterior da superfície celular, durante o crescimento, e que não está permanentemente ligado à superfície da célula microbiana (BUKHARI et al, 2015; BASHARI et al, 2013; AQUINO e FRANCO, 2009). Muitos podem ser de origem vegetal, tais como: algas (alginato, ágar, carragena), sementes (gomas, guar e locusta) ou exsudados de árvores (gomas arábicas e karaya), produtos de biossíntese microbiana (xantana, gelana, dextrana).

Outros, são produzidos por modificações químicas de polissacarídeos naturais, como pectina, gelatina, amido, carboximetilcelulose de sódio (BASHARI et al, 2013; BUKHARI et al, 2015; AQUINO e FRANCO, 2009; SUTHERLAND, 1970).

Em muitas bactérias, a hidrofiliidade da superfície é aumentada pela presença de uma camada de polissacarídeo extracelular (EPS). O EPS pode estar organizado de modo a formar uma camada coesiva e aderente, denominada “cápsula”, ou consistir em um polissacarídeo livre e “mucilaginoso” (slime), com pouca ou nenhuma aderência celular. O termo polissacarídeo extracelular ou exopolissacarídeo pode ser usado tanto para descrever o polissacarídeo mucilaginoso como o capsular (SUTHERLAND, 1970).

Os EPS microbianos podem possuir uma estrutura complexa, sendo possível, inclusive, conter, além de diferentes monossacarídeos, outros compostos químicos, como a goma xantana. Mas também podem ter uma composição simples de um único tipo de monossacarídeo, classificado como homopolissacarídeo (normalmente polímeros compostos de D-glicose), como a goma dextrana (VAN DEN BRINK et al, 2013; PEREIRA et al, 2011; SKILLMAN et al, 1998). Os microorganismos podem produzir uma variedade de gomas hidrossolúveis, que possuem propriedades físicas, estruturais e químicas diferentes. Com esta diversidade em estrutura e propriedades físicas, os polissacarídeos microbianos possuam várias aplicações em indústrias de alimentos, farmacêutica, petrolífera, cosmética, têxtil, de tintas, produtos agrícolas, entre outras. E podem ser utilizados como: emulsificantes, estabilizantes, ligantes, agentes geleificantes, coagulantes, lubrificantes, formadores de filmes, espessantes e agentes suspensores. Esses biopolímeros emergiram rapidamente como uma nova e importante fonte industrial de material polimérico e começaram gradualmente a competir, sob o ponto de vista econômico, com gomas

naturais de algas marinhas e plantas (BUKHARI et al, 2015; AQUINO e FRANCO, 2009).

### 2.3. Dextrana

Historicamente, são datadas de 1813 as primeiras observações empíricas sobre gomas. Na época, constatou-se que os xaropes de cana-de-açúcar e beterraba, nas fases de filtração e cristalização, tomavam uma textura quase sólida, dificultando o processamento do açúcar. Pasteur, em 1861, interpretou esse processo como sendo resultado de fermentação por micro-organismos. A bactéria envolvida foi identificada, em 1878, como *Leuconostoc mesenteroides*; e o produto, em 1878, como sendo uma glucana, que recebeu o nome de dextrana (dextrorrotatória). A dextrana por muito tempo foi o primeiro biopolímero produzido em larga escala (PADMANABHAN, 2003).

A produção de dextrana por bactérias difere da formação da maioria dos outros exopolissacarídeos, em que o processo é essencialmente extracelular. Muitas cepas de bactérias lácticas (BAL) possuem a capacidade de produzir dextrana extracelular quando crescidas na presença de sacarose. Uma determinada espécie ou linhagem de bactéria pode produzir tanto a dextrana solúvel ou insolúvel em água (KWON e AJO-FRANKLIN, 2013; PATEL et al, 2011; SETO et al, 2010).

A dextrana é um polissacarídeo sintetizado extracelularmente pela dextranasacarase, sem que o polissacarídeo penetre no interior da célula, diferentemente de outros que são resultados da conversão catabólica intracelular do



substrato em polímero. A dextranasacarase é excretada pelo micro-organismo no meio de cultura na presença de sacarose, liberando a frutose e transferindo a molécula de glicose para o sítio receptor do polímero (PADMANABHAN, 2003; DOLS, M., 1997).

Inicialmente, a sacarose era o único substrato conhecido capaz de induzir a produção enzimática da dextranasacarase, mas já se sabe de outros açúcares indutores, entretanto com baixa eficiência. A dextranasacarase também pode ser produzida por outras bactérias, como *Streptococcus* e *Lactobacillus*, mas a cepa mais usada em pesquisas é a *Leuconostoc mesenteroides* (PADMANABHAN, 2003).

#### 2.4. Estrutura da Dextrana

Dextrana é o termo usado pela literatura para descrever uma classe de polissacarídeos formados por unidades  $\alpha$ -D-glicopiranosil, contendo em proporções variáveis ligações  $\alpha$ -(1,6),  $\alpha$ -(1,2),  $\alpha$ -(1,3) e  $\alpha$ -(1,4). A maioria das dextranas conhecidas têm uma cadeia principal linear, formada por ligações  $\alpha$ -(1,6), apresentando diversidades quanto às proporções das outras ligações e das ramificações, sendo sintetizadas a partir da sacarose (SHUKLA, 2011; PURAMA e GOYAL, 2008; PADMANABHAN, 2003; DOLS, 1997). O tamanho das moléculas pode variar dependendo da temperatura, concentração de sacarose e presença de outros açúcares durante a reação de síntese. A dextrana nativa apresenta, em média, massa molar entre 40 e 50 milhões de Dalton nas condições industriais atualmente utilizadas (CAO, 2014; MCINTYRE, et al, 2013; SALAČ, 2013;

PURUSHE, 2012; SHUKLA, 2011; SETO, H. et al, 2010; PADMANABHAN, 2003, SABATIE et al, 1988).

A dextrana é um polissacarídeo de origem bacteriana, constituído de unidades monoméricas de glicose, unidas por ligações  $\alpha$ -D-glicopiranosil do tipo  $\alpha$ -1,6 na cadeia linear. Este biopolímero possui aplicações na indústria de alimentos, cosméticos e, principalmente, na indústria farmacêutica. Durante a síntese enzimática de dextrana, a partir de sacarose, ocorre a liberação de frutose (PADMANABHAN, 2003).

A solubilidade da dextrana depende do padrão de ligação ramificada. A presença de 95% de ligações  $\alpha$ -(1,6), lineares, faz esta dextrana solúvel em água, o que a torna adequada para várias aplicações. A insolubilidade requer a presença de maior número de ligações  $\alpha$ -(1,3) (SHUKLA, 2011).

## 2.5. Gênero *Leuconostoc*

Bactérias lácticas (BAL) são caracterizadas pela conversão de uma grande parte da sua alimentação de carbono, açúcares fermentáveis, em ácido láctico. No entanto, para além da produção de ácido láctico, as BAL são capazes de desviar uma pequena proporção de açúcares fermentáveis para a biossíntese de expolissacarídeo (EPS), que são independentes do material da superfície celular e da parede celular. Os expolissacarídeos microbianos, quando suspensos ou dissolvido em solução aquosa, fornece espessamento, já que possuem propriedades de gel. Como tal, há um grande interesse em usar EPS a partir de micro-organismos

com grau alimentício (como BAL, que são tradicionalmente utilizados para fermentações de produtos alimentares), para utilização como agentes espessantes (FALCONER et al, 2011; SMITH, 1970).

O gênero *Leuconostoc* é um grupo de micro-organismos em forma de cocos ou coco bacilos, dispostos em pares ou cadeias, Gram-positivo, catalase negativo, não esporulante e anaeróbio facultativo (OGIER et al, 2008). Taxonomicamente, os *Leuconostoc* são eubactérias que pertencem ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales*, família *Leuconostocaceae* (EUZÉBY, 2012). Atualmente, o gênero *Leuconostoc* apresenta 23 espécies e três subespécies. Este gênero é encontrado em plantas frescas que, a partir deste habitat natural, disseminaram para vários nichos, incluindo leite e produtos alimentares refrigerados. Desempenham um importante papel em processos industriais e na fermentação de alimentos, tais com embutidos, produtos vegetais, cereais e lácteos (OGIER, et al, 2008).

## 2.6. Processos de produção

A produção de dextrana pode ocorrer através de dois processos distintos, sendo eles o processo convencional e a produção por via enzimática. No processo convencional de produção de dextrana, esta é produzida durante o crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* em meio de cultura contendo sacarose, extrato de levedura e outros nutrientes, controlando a temperatura, o pH e a aeração (PAULO, et al, 2012). A produção de dextrana por via enzimática é conduzida em duas etapas, produção de enzima e síntese da dextrana. A síntese da dextrana “in vitro”

apresenta potencial econômico enorme, devido ao fato de ser extracelular e não necessitar de energia adicional e da reação ser irreversível (JESIONOWSKI et al, 2014; GUPTA e KAMALAKAR, 1995).

Os polissacarídeos obtidos de micro-organismos são uma alternativa válida, pois possuem propriedades similares aos tradicionais e, em alguns casos mais vantajosos, por possuírem propriedades específicas que o qualificam para o desenvolvimento de novos produtos. As gomas microbianas não dependem de condições climáticas, contaminação marinha ou falha nas colheitas, que prejudicam a oferta das gomas tradicionais e, além disso, são menos suscetíveis à variabilidade em sua qualidade, pois sua produção pode ser controlada cuidadosamente. Além disso, existem técnicas genéticas que permitem obter polissacarídeos com propriedades “sob encomenda” (TSUCHIYA, 1952). A produção comercial pode ser tanto na forma convencional “in vivo” na presença do micro-organismo, ou “in vitro”, via enzima com ausência do micro-organismo.

## 2.7. Processo fermentativo convencional

No processo convencional de produção, a dextrana é produzida durante o crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* em meio de cultura contendo sacarose, extrato de levedura e outros nutrientes, controlando a temperatura, o pH e a aeração (PAULO et al, 2012).

## 2.8. Produção por via enzimática

A dextranasacarase é uma glicosiltransferase extracelular que catalisa a transferência de resíduos D-glicopiranosil da sacarose para a dextrana, liberando moléculas de frutose. Esta via de produção foi proposta com a finalidade de otimizar o processo, com a vantagem de controlar melhor as etapas (KOBAYASHI e MATSUDA, 1980; TSUCHIYA, 1952).

Alguns autores dividem a produção por via enzimática em etapas. Na primeira, a produção da enzima; logo em seguida, na segunda etapa, a enzima bruta ou parcialmente purificada é aplicada e também é responsável pela obtenção da dextrana. A atividade catalítica da dextranasacarase é uma combinação de reações envolvendo os sítios ativos da enzima, o substrato e o receptor. Duas atividades distintas podem ser consideradas na síntese de dextrana a partir da sacarose: a atividade hidrolítica e a glicosiltransferase. A primeira é responsável pela quebra da ligação entre a frutose e a glicose da sacarose, formando o grupo D – glicosil; a segunda, a transferência do grupo glicosil para a cadeia do polímero em formação (DOLS,1997).

A produção de dextrana por via enzimática é conseguida a partir de três fases. A primeira produz a enzima dextranasacarase a partir do sobrenadante da cultura, livre de células, após a centrifugação. Na segunda fase utiliza-se, para a síntese enzimática de dextrana, a solução de sacarose e outros componentes, como: extrato de levedura, uma fonte de fosfato, como um tampão, vestígios de sais de certos metais, tais como Mg, Mn, Fe, e hidróxido de sódio para neutralizar o excesso de ácido formado durante a fermentação. A última e terceira fase consiste

na recuperação da dextrana por meio de precipitação com álcool etílico, lavagem, reprecipitação, secagem e moagem (VIDAL, 2011).

A síntese da dextrana “*in vitro*” apresenta potencial econômico enorme, devido ao fato de ser extracelular e não necessitar de energia adicional e da reação ser irreversível (TSUCHIYA, 1952). A enzima bruta e liofilizada retém a atividade por vários anos, quando estocada à temperatura abaixo de 5°C. Em solução, vários fatores influenciam a estabilidade da enzima, sendo que a temperatura e o pH foram os mais importantes (LEATHERS, 2002; KABOLI, 1980).

## 2.9. Meio de cultivo para a produção da dextrana

Para avaliar qual a melhor composição de meio de cultura para a produção de dextranasacarase pela linhagem *Leuconostoc mesenteroides* FT045B, os autores realizaram as fermentações em batelada sem controle de pH, avaliando a influência de oito diferentes meios de cultura na produção da enzima, a 30°C, 132 rpm, pH 7,4 e 0,5 vv, em reator de 2L contendo 1L de meio. O melhor meio de cultivo com 2% de sacarose, 0,5% extrato levedura, 2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,001% NaCl, 0,001% MnSO<sub>4</sub> e 0,001% FeSO<sub>4</sub> apresentou atividade enzimática de 5,67 UDS/mL. O pH ao final de 14 horas de cultivo ficou em torno de 4,0-5,0. Foi constatada diminuição na atividade enzimática com o aumento da concentração de sacarose (de 20 g/L para 40 g/L) (CORTEZI, 2005).

A composição do meio foi determinada para maximizar o rendimento da dextranasacarase a partir de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640, utilizando na

abordagem uma variável em um tempo. Curiosamente, o aumento da atividade de dextranasacarase foi significativa (3 vezes), a partir de 5 U / ml e 15 U / ml, com um aumento de sacarose de 2% a 7%. Ao dobrar a concentração de extrato de levedura de 2% a 4%, resulta-se em 10% de aumento à produção da enzima. O aumento  $K_2HPO_4$  de 2% para 3% proporcionou um aumento de 15% da atividade enzimática. A adição de peptona e extrato de carne, separadamente, aumentaram a atividade da enzima em 15%. Os resultados deste estudo mostram que as necessidades de nutrientes não são apenas específicos das espécies, mas também da cepa. Esta cepa do *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640 necessita de maior quantidade  $K_2HPO_4$  e sacarose para uma produção superior de enzimas (PURAMA e GOYAL, 2008).

Foram utilizados quatro meios para isolamento das 290 cepas de bactérias lácticas selecionadas na França e também foi utilizado o PCR. Mas o destaque ficou para a resposta dos *Leuconostoc mesenteroides* (25 isolados), preferencialmente maior que 70% dos *Leuconostoc mesenteroides* foi isolado no meio MRS e o restantes nos outros três meios que foram: MSE, ELLIKER, MRS e MRS m4.5 (ROBERT, 2009).

## 2.10. Estabilidade enzimática e mecanismo de ação da dextranasacarase

Vários autores estudaram condições de estabilidade da enzima dextranasacarase para a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* (SANTOS et al, 2000; KIM e ROBYT; 1996; KOBAYASHI e MATSUDA, 1980; TSUCHIYA, 1952) e outros

demonstraram que a enzima dextranasacarase é menos estável na presença de solventes orgânicos a 30°C que em 4°C. Sua sensibilidade quanto ao pH é bastante grande, apresentando maior estabilidade entre 5,0 e 6,0, coincidindo com a faixa da atividade enzimática máxima (GIRARD e LEGOY; 1999). Para preparações de enzima purificada, alguns autores relatam que a faixa de estabilidade pode se alterar ligeiramente, mostrando que a enzima purificada é mais estável em pH entre 6,0 e 9,0 (KOBAYASHI e MATSUDA, 1980).

Autores realizaram um estudo comparativo da produção de dextranasacarase por duas cepas diferentes de *Leuconostoc mesenteroides*. As duas cepas utilizadas foram NRRL B-1299 e a mais comumente usada em pesquisas, NRRL B-512. Constataram que a regulação do pH e das condições de aeração tiveram pequeno efeito sobre a cultura e a produção de dextranasacarase por NRRL B-1299, ao contrário da cepa NRRL B-512, onde essas condições melhoraram significativamente a produção da enzima (PURAMA e GOYAL, 2005). Outros autores estudaram a produção de dextranasacarase pela cepa de *Leuconostoc mesenteroides* PCSIR-3, utilizando como referência a cepa NRRL B-512F. Os autores trabalharam com a temperatura de 26°C e pH 7,5, sendo que, durante a fermentação, o pH diminuiu para 5,0. Foi observado que a cepa PCSIR-3 produziu uma dextrana diferente da produzida pela cepa NRRL B-512F. Com 18 horas de fermentação e utilizando 2% de sacarose, foram alcançados 0,69 g/100 ml de dextrana e concentração celular de 0,544 g/100 ml pela cepa PCSIR-3. Já para a cepa NRRL B-512F, a produção de dextrana foi de 0,82 g/100 ml e a concentração celular de 0,798 g/100 ml (TSUCHIYA, 1952).

Quando cultivados em meio de glicose ou frutose na ausência de sacarose, *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 produz dois tipos distintos de



dextranasacarase extracelulares, nomeados glicosiltransferase glicose (GGT) e frutose glicosiltransferase (FGT). O nível de produção de GGT e FGT é 10 a 20 vezes menor do que a do glicosiltransferase extracelular sacarose (SGT) dextranasacarase produzida em meio de sacarose (em condições tradicionais de cultura) (DOLS, 1998).

Através da técnica de filtração em gel, foram encontradas várias formas de dextranasacarase (sacarose: 1,6 D-glucana, 6-D-glucosyltransferase EC 2.4.1.5) produzidas por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Dois componentes de enzima, com diferentes afinidades ao gel de dextrana, foram separados por uma coluna de Sephadex G-100. O principal componente obtido a partir da coluna de Sephadex foi tratado com dextranasacarase e purificado para uma eletroforese homogênea (KOBAYASHI e MATSUDA, 1980).

A dextranasacarase EC2.4.1.5 é uma glicosiltransferase extracelular que catalisa a transferência de resíduos D-glicopiranosil da sacarose para a dextrana, liberando moléculas de frutose (DOLS, 1998; KOBAYASHI e MATSUDA, 1980). A atividade catalítica da dextranasacarase é uma combinação de reações envolvendo os sítios ativos da enzima, o substrato e o receptor. Duas atividades distintas podem ser consideradas na síntese de dextrana a partir da sacarose: a atividade hidrolítica e a glicosiltransferase. A primeira é responsável pela quebra da ligação entre a frutose e a glicose da sacarose, formando o grupo D – glicosil; a segunda, a transferência do grupo glicosil para a cadeia do polímero em formação. (FALCONER, et al, 2011).

## 2.11 Caracterização

A baixa solubilidade em água está associada à presença de alta porcentagem de ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3). *L. mesenteroides* NRRL B-1299 é composto por 65%  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) ligações, 30%  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) ligações e 5%  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) ligações ramificadas. *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 é conhecido por produzir a dextrana ramificada com 52%  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) e de 40%  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3). No presente estudo, a dextrana insolúvel em água produzida por dextranasacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 foi purificada por precipitação com álcool. A estrutura da dextrana foi analisada através do infravermelho (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN) e por espectroscopia de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (SHUKLA, 2011).

A *Weissella cibaria* CMGDEX3 isolada a partir de couve em meio contendo DeMan, Rogosa e Sharpe agar (MRS) produziu exopolissacarídeo. A atividade da dextranasacarase teve rendimento encontrado em 7,1 ml MRL-1 e 2,4 g de dl-1, respectivamente. A caracterização estrutural do EPS purificados realizada por FTIR, e espectroscopia de  $^1\text{H}$  RMN  $^{13}\text{C}$ , demonstrando que *W. cibaria* CMGDEX3 sintetiza linear dextrana, que predominantemente teve  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  6) ligações glicosídicas com apenas alguns de 3 a 4% de  $\alpha$ (1  $\rightarrow$  3). A determinação da massa molecular mostrou que possui elevado peso molecular, com uma média > 2.000.000 Da. Este foi o primeiro relato sobre o isolamento de síntese de dextrana *Weissella* gênero a partir do Paquistão (AHMED, et al; 2012).

## 2.12. Otimização

PADMANABHAN (2003) descreve que a melhor produção de dextrana foi com 15% de sacarose. Ele compara os dois métodos de produção de dextrana solúvel e insolúvel. No artigo, a melhor produção foi de dextrana insolúvel. A produção de dextrana por bactéria difere da formação de todos os outros expolissacarídeos no processo, pois este é essencialmente extracelular e não requer um monossacarídeo para ativar. Mas há uma exigência quanto ao substrato, que deve possuir um mínimo de sacarose e um oligossacarídeo.

A combinação das três variáveis de concentração de dextranasacarase, sacarose e temperatura foi utilizada para controlar a síntese de dextrana com variação do peso molecular. Com quatro concentrações de enzima (50, 10, 1,0 e 0,1 U / mL), cinco concentrações de sacarose (20, 50, 100, 200 e 1000 mM) e duas temperaturas (20<sup>0</sup>C e 30<sup>0</sup> C), a linhagem selecionada para o estudo foi *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC. Conclui-se que o melhor método para obtenção de dextrana de diferentes pesos moleculares (baixo, médio e alto) é controlando a síntese da dextranasacarase pelo B-512FMC. Mostrou-se naquele estudo que os pesos moleculares das dextranas sintetizadas são inversamente proporcionais à concentração de dextranasacarase e diretamente proporcionais à concentração de sacarose e à temperatura (FALCONER et al, 2011).

### 2.13. Blendas de Polímeros

O mercado exige cada vez mais produtos com características específicas. Desta forma, as blendas poliméricas passaram a ser uma opção para suprir esta demanda. Através da formação de blendas poliméricas, é possível obter uma sinergia das propriedades individuais de cada material, além da possibilidade de melhorar ou controlar suas propriedades mecânicas finais pela interação entre as os componentes.

As blendas são obtidas através da mistura, física ou mecânica, de pelo menos dois polímeros, de forma que só exista interação intermolecular secundária entre as cadeias moleculares dos polímeros, sem que haja reação química entre eles (WIEBECK e HARADA; 2005).

O importante e talvez uma das fases de maior desafio no desenvolvimento de blendas poliméricas seja ultrapassar a barreira para encontrar sistemas miscíveis. O termo miscível está diretamente relacionado com a solubilidade, ou seja, os polímeros são miscíveis quando se dissolvem mutuamente, apresentando uma única fase (PAUL e NEWMAN, 1978). Também, e não menos importante, a preocupação em conseguir blendas compatíveis. As blendas são ditas compatíveis quando apresentam propriedades úteis ou satisfatórias. (AKCELRUD, 2007; PAUL e NEWMAN, 1978).

## 2.14. Inovação

Cada inovação necessita ser avaliada por completo antes mesmo de ser inserida ao mercado. Alguns pontos precisam ser respondidos antes, durante e depois do desenvolvimento do produto: Qual a inovação? Qual a utilidade? Quais seus diferenciais? Como será apresentado ao mercado?

As inovações fruto desse trabalho são:

1- patente: do processo da produção de EPS insolúvel em pH de 8,5

2- compósitos de látex com dextrana e látex com fibra de coco, com alta estabilidade térmica (descrito no manuscrito 1)

3- placa miorreloxante, utilizada para proteger os dentes durante hábito parafuncional, o bruxismo. Realizou-se simulação para avaliação mecânica do produto com o programa COMSOL Multiphysics®. Foi desenvolvida a embalagem e meios para lançamento do produto.

## 2.15. PATENTE: Produção de exopolissacarídeo insolúvel

A dextrana tem sido muito utilizada como expansor volumétrico de sangue, na indústria farmacêutica, e na indústria alimentícia. Com caráter não iônico, tem boa estabilidade em condições normais de operação (PADMANABHAN, 2003).

A importância econômica de bactérias lácticas (BAL) tem aumentado a partir dos trabalhos que já foram realizados e certificam que elas podem ser exploradas por seres humanos em uma série de formas benéficas. Os recentes avanços na

pesquisa microbiana criaram um grande impacto em diversos processos industriais e têm melhorado o rendimento de muitos produtos biotecnológicos, valorizando a utilização de diferentes espécies de BAL. Atualmente, eles são utilizados para a produção de biopolímeros, enzimas, vinhos e muitos outros produtos de importância comercial. Dextrana tem amplas aplicações em várias indústrias de biotecnologia e causaram impacto enorme no mundo da biotecnologia (AMAN et al, 2012).

O depósito da patente no NIT-UFBA com o título: **PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO INSOLÚVEL** - anexo II, foi resultado deste trabalho. A patente requereu a produção do EPS insolúvel no pH de 8,5 não relatado na literatura.

## 2.16. Produto

Durante o desenvolvimento deste produto, surgiram algumas dúvidas: Qual a inovação? Qual a utilidade? Quais seus diferenciais? Como será apresentado ao mercado? A inovação fruto desse trabalho é uma placa miorelaxante, utilizada para proteger o esmalte dos dentes do desgaste que ocorre durante hábito parafuncional, o bruxismo.

O bruxismo é uma patologia complexa e os esforços para a compreensão dos mecanismos que envolvem a sua possível etiologia são demonstrados pelos inúmeros trabalhos científicos publicados anualmente, não somente na área da odontologia, mas também na área médica. O grande interesse por este tema talvez é explicado pela sua alta prevalência na população e o efeito deletério que acarreta ao sistema estomatognático e ao paciente em âmbito geral.

A literatura apresenta-se muito ampla quanto a utilização da placa miorrelaxante. Esta tem sido a forma mais difundida de se tratar o bruxismo noturno e subsequentes consequências crâniomandibulares (HADDAD et al., 1994; SHEIKHOLESLAM et al., 1993). Um aspecto muito importante quanto ao efeito da placa em pacientes com bruxismo noturno foi relatado por SOLBERG et al. (1975) e citado por SHEIKHOLESLAM et al.(1993), mostrando que o nível de atividade eletromiográfica acumulado pelo músculo masseter durante a noite foi reduzido após a inserção de uma placa interoclusal plana, recobrando todo o arco.

A prevalência de bruxismo em crianças varia na literatura de 7% a 88%, e apresenta tendência para persistir na idade adulta, reduzindo na terceira idade. A literatura mostra com estudos longitudinais que 35% a 90% das crianças com bruxismo do sono evoluem com sintomas na idade adulta. Os principais sinais e sintomas de bruxismo são: dor e/ou hipertrofia da musculatura da face, desgaste anormal dos dentes, língua e bochechas marcadas e quebra de restaurações (sem outros motivos). Apesar de o dispositivo ser uma boa maneira para lidar com bruxismo, ele não é uma cura. O dispositivo encaixa-se sobre os dentes superiores e os protege de se triturarem com os dentes inferiores (Simoies-Zenari e Bitar, 2010, Cortese, 2009; Quintero, 2009; Restrepo e Gomez, 2009; Diniz, 2009; Lobbezoo et al, 2008; Barbosa et al, 2008; Macedo,2008; Pizzol, 2006; Aloé,2003; Glaros et al, 2000; Bader e Lavigne 2000; Rugh e Harlan J;1988).

Avaliando a alta porcentagem de pessoas acometidas por esta doença e já prevendo a questão do volume de descarte do produto, o que acarretaria em prejuízo à natureza, foi tomado o cuidado de desenvolver um compósito biodegradável e com aplicabilidade na indústria. O manuscrito 2 deste trabalho descreve as características térmicas e mecânicas do compósito desenvolvido.

Atualmente, o mercado é muito competitivo e exige alguns posicionamentos estratégicos. Neste trabalho, foi adotada a avaliação do produto e suas características mecânicas, antecipando a correção dos pontos necessários. Utilizou-se o sistema para modelagem e simulação com base em elementos finos, com capacidade multifísica (permite resolver numericamente um número arbitrário de aspectos físicos interligados, como: propriedades mecânicas, termodinâmicas, elétricas, etc). O COMSOL Multiphysics®. Este sistema possui uma característica importante: a de permitir a simulação utilizando as características do material que será utilizado no produto. Para melhor avaliação do produto final, utilizou-se o parâmetro de caracterização mecânica dos compósitos descritos no manuscrito 2 e a simulação encontra-se no anexo II.

A embalagem (anexo III) foi outro item avaliado e estudado para que a mesma pudesse fornecer características do produto a ser exposto. Utilizou-se tons de azul: significa tranquilidade, serenidade e harmonia, mas também está associado ao relaxamento e, em conjunto com a imagem de fundo (céu noturno estrelado), remete a uma boa noite de sono. Os detalhes dourados conferem exclusividade e novidade ao produto. A fonte sem serifa, de leitura descomplicada, com bom contraste de fundo, representam facilidade, simplicidade e conforto.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Produzir e caracterizar agentes de reforço e compósitos, para serem utilizados na confecção da placa miorreaxante.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Extrair e purificar dextrana produzida por *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2, para ser utilizado como agente de reforço na formulação do compósito;
- Caracterizar a dextrana produzida;
- Preparar fibra de coco, dextrana e látex para serem utilizados nos compósitos;
- Caracterizar os compósitos produzidos com látex e adição de diferentes porcentagens de cada agente de reforço, fibra de coco e dextrana;
- Produzir placa miorreaxante com o melhor compósito.

## 4. RESULTADOS E PRODUTOS GERADOS

### 4.1. Produção e caracterização da dextrana solúvel e insolúvel produzida pela linhagem nativa de *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2.

Kenya Karla Felicíssimo Gonçalves<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal da Bahia

Contato: [kenyakarla@ig.com.br](mailto:kenyakarla@ig.com.br)

Manuscrito elaborado com resultados da pesquisa de tese do doutorado realizado na Universidade Federal da Bahia, no programa do RENORBIO.

## RESUMO

As bactérias ácido lácticas possuem numerosos gêneros produtores de biopolímeros, a exemplo os expolissacarídeos (EPS). A produção e o emprego na indústria de alimentos, farmacêutica e química dos EPS tem crescido, em especial a dextrana. Neste trabalho, utilizou-se a linhagem *Leuconostoc pseudomesenteroide* R2, visando à produção de dextrana solúvel por via convencional e também a insolúvel em solução aquosa por via enzimática, através da dextranasacarase. A dextrana solúvel foi obtida através do processo convencional, com o crescimento do micro-organismo em condições otimizadas para a produção do EPS, resultando em um rendimento bruto de 73g/L. A dextrana insolúvel foi produzida por via enzimática, apresentando o rendimento de 3 g/L. Em ambos os processos, os exopolissacarídeos foram precipitados com álcool absoluto e tiveram sua caracterização física e química determinada através das seguintes técnicas: TGA,

DSC, FTIR e dextrana produzida pelo método enzimático, que apresentou características sugestiva de insolubilidade.

**Palavras-chave:** dextranassacarase, dextrana solúvel, dextrana insolúvel, exopolissacarídeo, atividade enzimática, polímero.

## ABSTRACT

Production and characterization of soluble and insoluble dextran produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 strain. Acid lactic bacteria have many biopolymers producers' genders, for example the exopolysaccharide (EPS). The production and application of the EPS in the food, pharmaceutical and chemical industries has grown considerably; dextran specially. In this study the native exopolysaccharide strain *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 was used in order to produce soluble dextran by conventional means and also insoluble in aqueous solution by enzymatic means using the dextranassacarase. The soluble dextran was obtained through the conventional process letting the micro-organism to grow in optimized conditions to produce EPS; the gross yield was 73g/L. The insoluble dextran was produced by enzymatic means; the gross yield was 3g/L. In both process exopolissacarídeos were precipitated with absolute alcohol. They had their structural characterization determined by the following evaluations techniques thermogravimetric analysis (TGA), differential scanning calorimetry(DSC), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and dextran by enzymatic showed insolubility characteristics.

**Keywords:** dextransucrase, soluble dextran, insoluble dextran, structural characterization, exopolysaccharide, enzyme activity.

## 1. INTRODUÇÃO

Exopolissacarídeos (EPS) são biopolímeros constituídos por polissacarídeos de cadeia longa, que são secretadas principalmente por bactérias e microalgas durante o seu crescimento e que ficam ao redor da célula microbiana (SUTHERLAND, 1977; SUTHERLAND, 1972).

Muitas cepas de bactérias lácticas (BAL) possuem a capacidade de produzir exopolissacarídeo, a exemplo a dextrana, que é sintetizada quando este grupo de micro-organismo cresce na presença de sacarose. Este polímero é sintetizado extracelularmente pela dextransacarase, sem que o dissacarídeo penetre no interior da célula, diferente da formação de outros biopolímeros (VASILEVA, 2009).

A dextransacarase é uma glicosiltransferase extracelular (E.C. 2.4.1.5) que catalisa a transferência de resíduos D-glicopiranosil da sacarose para a dextrana, liberando moléculas de frutose (KOBAYASHI e MATSUDA, 1980; TSUCHIYA, 1952). A dextransacarase é excretada por várias espécies de *Leuconostoc* e *Streptococcus* (DOMAN e ROBYT, 1995) no meio de cultura, na presença de sacarose, liberando a frutose e transferindo a molécula de glicose para o sítio receptor do polímero (PADMANABHAN, 2002; MARGUERITE, 1998).

Além de catalisar a síntese de dextrana a partir de sacarose, dextransacarase também catalisa a transferência de um D-glicopiranosil a partir de

sacarose para outro receptor molecular, resultantes na geração de oligossacarídeos (NAESSENS, 2005; GOULAS, 2004). Maltose, isomaltose e galactose são as moléculas receptoras conhecidas para dextranasacarase que, em presença de sacarose, sintetiza oligossacarídeos, tais como malto oligossacarídeos, isomaltose e galacto oligossacarídeos, respectivamente (SEO, 2007). A síntese da dextrana “in vitro” apresenta potencial econômico enorme, devido ao fato de ser extracelular e não necessitar de energia adicional, além da reação ser irreversível (TSUCHIYA, 1952). A enzima bruta liofilizada retém a atividade por vários anos, quando estocada à temperatura abaixo de 5°C. Em solução, vários fatores influenciam a estabilidade da enzima, sendo que a temperatura e o pH são os mais importantes (KABOLI, 1980).

Vários trabalhos na literatura já foram realizados com a finalidade de otimização e modificação do processo fermentativo na produção de dextrana (PAULO, 2012; SHUKLA, 2011; REINALDO, 2011; VASILEVA, 2009; PURAMA AND GOYAL, 2008; MARGUERITE, 1998; GOYAL, 1994). Devido a grandes aplicações comerciais deste polímero, é necessário verificar a melhor via de produção e os melhores resultados produtivos.

As espécies de bactérias lácticas podem produzir tanto a dextrana solúvel quanto a insolúvel (PADMANABHAN, 2002) em condições de cultivo microbiano, sendo que a maioria produz a dextrana insolúvel somente através da enzima pura, em condições diferenciadas de ativação enzimática (pH, temperatura, substratos, agitação) (SHUKLA, 2011; SEEMA, 2010; PURAMA e GOYAL, 2008). PAULO, 2012 obteve pela linhagem de *L. pseudomesenteroide* R2 somente a dextrana solúvel, no processo do cultivo celular. O presente trabalho propôs a utilização desta mesma linhagem, para a obtenção da dextrana insolúvel. Para tanto, se utilizou o

caldo fermentativo isento de células, contendo somente a dextranasacarase concentrada.

## **2. METODOLOGIA**

### 2.1 Obtenção da Dextrana Insolúvel pela Via Enzimática

Para a produção de dextrana, utilizou-se o caldo fermentativo isento de células, contendo somente a dextranasacarase concentrada. Todos os materiais químicos utilizados neste experimento possuíam alto grau de pureza.

#### 2.1.1 Micro-organismo

Foi utilizada a linhagem nativa de *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2, cedida pela Bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Aplicada à Saúde Pública da Universidade Estadual de Feira de Santana-UEFS.

#### 2.1.2 Condições de crescimento de *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 para produção de enzima com atividade de dextranasacarase

A linhagem do *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 preservada no meio leite extrato de levedura (PAULO, 2012) a -20° C passou por três ativações consecutivas, sendo inoculada no meio LACTOBACILLI MRS da marca ACUMEDIA

(composição g/L: Peptona proteose 10g, Extrato de carne 10g, Extrato de levedura 5g, Dextrose 20g, Polisorbato 80 1g, Citrato de amônia 2g, Acetato de sódio 5g, Sulfato de magnésio 0.10g, Sulfato de manganês 0.05g, Fosfato dipotássico 2g), incubada a 28°C, por 24h.

A cultura ativa apresentando densidade ótica  $1,92 \pm 0,01$  em abs 600 nm, correspondendo a  $10^8$  UFC/ml, foi inoculada na proporção de 1% em 100 ml do caldo MRS, incubada sem agitação a 35°C por 24h.

### 2.1.3 Concentração do caldo fermentativo e determinação da atividade enzimática da dextranasacarase

Visando obter um caldo fermentativo com maior concentração de enzima, e conseqüentemente alta atividade enzimática para a síntese da dextrana, realizou-se o seguinte procedimento: após o período de incubação da linhagem *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2, o caldo fermentativo foi centrifugado, e o sobrenadante contendo o extrato enzimático foi introduzido na membrana de diálise (marca SIGMA, 05 KDa), imerso em um becker contendo PEG 6000 (marca DINAMICA), diluído na proporção de 10% de água destilada (p/v), permanecendo durante um período de 4 horas, sob condições de refrigeração até o líquido sobrenadante ficar na proporção de 10 vezes menor ao volume introduzido no saco de diálise. Isto possibilitou a concentração do extrato enzimático.

A partir do extrato enzimático concentrado, foi determinada a atividade enzimática da dextranasacarase pelo método de 3,5 DNS (ácido dinitrossalissílico)

(Miller, 1959). Para tanto, foi inserido no tubo 150 µl do material concentrado e 150 µl de sacarose a 10%, diluída em solução tampão fosfato com pH 7,5. A mistura foi aquecida a 40°C por 30 min, em banho-maria. Logo após, foi adicionado 300µl de ácido dinitrosalicílico (DNS), sendo aquecida novamente em banho-maria por mais 15 minutos à temperatura de 95°C. Em seguida, foram acrescentados 3 ml de água destilada em todos os tubos, inclusive no branco. Todos os tubos foram homogeneizados no vortex. A leitura foi realizada no espectrofotômetro a 540 nm. Para que conseguisse obter leitura no espectrofotômetro, foi necessário diluir o extrato enzimático em água destilada a uma diluição de 1:10.

#### 2.1.4 Otimização para a produção da dextrana insolúvel

Para obtenção da dextransacarase, enzima responsável pela síntese da dextrana, é necessário ter como substrato indutor, a sacarose. Desta forma, seguiu o procedimento realizado por SHUKLA (2011), em que a reação foi constituída por 30 ml de solução tampão fosfato ou acetato (a depender do pH do meio), 10% de sacarose, 0,01% de ázida sódica, 600 microlitro de enzima concentrada. Com o intuito de se obter os melhores parâmetros para a produção da dextrana insolúvel, foi realizado um planejamento experimental, utilizando o modelo Doehlert, e como variáveis a maltose em três níveis (0, 5 e 10%) e o pH em 5 níveis (4,5; 5,5; 6,5; 7,5 e 8,5). A reação procedeu-se a 28°C por 30 horas a 180 RPM.



### 2.1.5 Extração da dextrana insolúvel

A extração da dextrana procedeu-se de acordo com SHUKLA (2011). O meio contendo a dextrana foi colocado por 10 minutos em banho-maria (água em ebulição); em seguida, centrifugado por 20 minutos, utilizando 5000 RPM. Após a centrifugação, foi adicionado ao sobrenadante o dobro de volume de álcool a 65%. A goma dextrana foi precipitada e, posteriormente, realizada a diálise. Já o pellet foi lavado 3 vezes com H<sub>2</sub>O destilada. Em cada lavagem, o pellet foi centrifugado por 20 minutos em 10000 RPM a 5°C. Após a última lavagem, o pellet foi precipitado com álcool a 65%. Todas as amostras adquiridas foram colocadas em placas devidamente identificadas e levadas à estufa a 40°C, para secagem até peso constante.

### 2.2 Obtenção e Extração da Dextrana Solúvel

A dextrana solúvel foi obtida através da fermentação microbiana, também chamada de processo convencional. Para a produção do EPS da goma, foi utilizando o meio de Guimarães com protocolo adaptado e otimizado por PAULO, 2012. Identificada neste trabalho como DEXTRANA, descrita na tabela 1.

## 2.3 Caracterização da Dextrana Insolúvel e Dextrana Solúvel

A fim de fornecer as características específicas das dextranas produzidas, foram identificadas utilizando-se as seguintes descrições demonstradas na tabela 1 (a caracterização foi determinante para avaliação das mesmas).

**Tabela 1-** Descrição das amostras de dextranas obtidas pelo *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2

IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	DESCRIÇÃO
PE 5,5	<u>Pellet</u> do meio de produção EPS com Dextranasacarase pH 5,5 10% Maltose
PE 8,5	<u>Pellet</u> do meio de produção EPS com Dextranasacarase pH 8,5 5% Maltose
SO 5,5	<u>Sobrenadante</u> do meio de produção EPS com dextranasacarase pH 5,5 10% Maltose
SO 8,5	<u>Sobrenadante</u> do meio de produção EPS com dextranasacarase pH 8,5 5% Maltose
DEXTRANA	Sobrenadante do meio de produção modificado por Paulo, E.M. (2012), pH 8,2

### 2.3.1 Análise termogravimétrica (TGA)

TGA com atmosfera de nitrogênio: os dados de TGA foram obtidos em uma balança termogravimétrica da marca SHIMADZU®, modelo TA 50. As amostras foram aquecidas de 25°C a 1000°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min, em uma atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50 ml/min. As curvas foram confeccionadas no software Origin 6.0. Os gráficos estão expostos nas Figuras 7 e 8.

TGA com atmosfera oxidante: Os dados de TGA foram obtidos em uma balança termogravimétrica da marca SHIMADZU<sup>®</sup>, modelo DTG-60H. As amostras foram aquecidas de 25°C a 700°C, com taxa de aquecimento de 10°C/ min, em uma atmosfera oxidante de ar com fluxo de 50 ml/min. As curvas foram confeccionadas no software Origin 6.0. Os gráficos estão expostos nas Figuras de 9 e 10.

### 2.3.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Os dados de DSC foram obtidos em um calorímetro exploratório diferencial da marca SEIKO, modelo EXTAR SII DSC-6220. As amostras foram aquecidas de 25°C a 600°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min, em atmosfera inerte de nitrogênio, com fluxo de 100 ml/min. As curvas foram confeccionadas no software Origin 6.0, e o gráfico está exposto na Figura 11.

### 2.3.3 FTIR (Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier)

O espectrômetro utilizado foi de marca Shimadzu, modelo IR Prestige-21, no modo de reflexão atenuada (ATR), na faixa espectral de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup>. As curvas foram confeccionadas no software Origin 6.0, e o gráfico está exposto na Figura 12.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para que ocorra a produção da dextrana, é necessário que não só ocorra a produção da enzima pelo micro-organismo, como também que ela esteja ativa. Uma unidade de dextranasacarase (UDS) é definida como sendo a quantidade de enzima que converte 1mg de sacarose em dextrana em 1 hora, com a liberação de 0,53mg de frutose, a 30°C em tampão pH 5,2 (HEHRE apud RODRIGUES, 2009). No presente trabalho, devido à natureza do *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2, a ativação da dextranasacarase se processa em condição mais alcalina. A atividade enzimática no caldo fermentativo sem concentrar foi de 4,99 UDS/ml. Após concentrar, resultou na atividade de 48,65 UDS/mL, em solução tampão fosfato pH 7,5 a 40°C. Este dado confirma a concentração do extrato enzimático cerca de 10 vezes mais com relação ao caldo fermentativo sem concentrar, e que, com este procedimento, se consegue maior quantidade de enzimas para serem utilizadas em um sistema de produção de polímero. CORTEZI (2004), utilizando diferentes composições de meio de cultura para a produção de dextranasacarase pelo *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B, mostrou que a maior determinação enzimática foi de 5,67 UDS/ML. Esta autora relata que fermentações utilizando melaço como fonte de carbono resultou em 11,6 UDS/mL. Quando foi utilizada a sacarose como fonte de carbono, as concentrações de 3 e 4% m/v resultaram em atividades enzimática próximas, 10,8 e 10,7 UDS/mL, respectivamente.

A dextrana pode ser produzida por uma serie de micro-organismos, mas as estruturas das moléculas vão depender do micro-organismo produtor, ou seja, serão diferentes para cada um deles. No processo de determinação, foram utilizados dois

fatores: pH e quantidade de maltose. A literatura é vasta quando cita que o pH do meio tem influência direta na síntese de dextrana como na estabilidade da enzima. Os seguintes trabalhos descrevem a dextranasacarase como sendo mais ativa e estável na faixa de pH entre 5.0 e 5.5 (KUEGLER, 2008; KANG, 2008, RAVI KIRAN PURAMA e ARUN GOYAL, 2008; NAESSENS, 2005; MONCHOIS; 1997 ; MILLER et al, 1986; KOBAYASHI, 1986; ERHARDT; CHLUDZINSKI, 1974;). No presente trabalho, a melhor condição para ativação dessa enzima foi no pH 8,5.

O pH ótimo para a síntese é descrito como sendo em torno de 5.0-6.0, porém foram relatadas as seguintes faixas de pH como ótimas para a síntese deste polímero: pH 5.0-5.5 (NAESSENS, 2005); pH 5.2-6.0 (DAVID SEMYONOV, 2014); pH 5.4 (SEEMA, 2011); pH 6.0 (CORTEZI, 2005); pH 5.5-6.0 (TSUCHIYA, 1952); pH 5.5 (PADMANABHAN, 2003); pH 5.2 (KABOLI, 1980; KIM e ROBYT, 1994); pH 4.8-6,2 (MILLER et al, 1986).

### 3.1 Otimização para a produção da dextrana insolúvel

A tabela 2 mostra a produção da dextrana obtida do pellet e do sobrenadante. Em todos os ensaios, após dissolver os polímeros secos em água destilada, somente no polímero originado no pellet do ensaio 8, cujos parâmetros utilizados foram maltose 5% e pH 8,5, conseguiu-se a produção da dextrana insolúvel, com o rendimento de 0,09g/30 ml, equivalente a 3g/L.

**Tabela 2** - Matriz do planejamento experimental modelo Doehlert para a otimização da dextrana insolúvel pelo *Leconostoc pseudomesenteroides* R2.

AMOSTRA	MALTOSE %	pH	Dextrana obtida do pellet (g/30 mL)	Dextrana obtida do sobrenadante (g/30 mL)
1	10	5,5	0,01	0,84
2	10	7,5	0,02	0,64
3	5	4,5	0,04	0,00
4C	5	6,5	0,04	1,14
5C	5	6,5	0,04	1,07
6C	5	6,5	0,05	0,81
7C	5	6,5	0,03	1,04
<b>8</b>	<b>5</b>	<b>8,5</b>	<b>0,09</b>	<b>0,55</b>
9	0	5,5	0,02	0,00
10	0	7,5	0,05	2,35

SHUKLA, et al, 2011, conseguiu a produção da dextrana insolúvel com rendimento de 3g/L, cujos parâmetros utilizados foram maltose 5% e pH 5,4. PADMANABHAN e KIM, 2002, utilizaram o pH de 5,4 e testaram valores de 2, 5, 10 e 15% de sacarose. Os mesmos não citam a quantidade de dextrana produzida, mas ressaltam que a proporção de 15% foi a que rendeu maior produção. A dextrana solúvel foi produzida nos demais ensaios, seja extraída do pellet ou do sobrenadante, sendo que, em ambas as situações, no ensaio 10 (0% de maltose e pH 7,5), houve maior produção do polímero, com produção mais expressiva no sobrenadante, tendo o rendimento de 2,35g/30 ml, equivalente a 7,83g/l. PAULO, 2012, otimizou a produção da dextrana solúvel pelo *Leconostoc pseudomesenteroides* R2, através do processo da fermentação microbiana, produzido como maior rendimento 42g/L, nas condições de pH 7,5, no meio isento de maltose. Neste trabalho, repetiu-se a produção nas condições de PAULO (2012) e o rendimento foi de 73g/L. Isto significa que, para a produção da dextrana solúvel por esta linhagem, tanto na condição convencional, ou pela utilização da enzima purificada, a melhor condição de produzir dextrana é no pH 7,5. Para a produção da dextrana insolúvel, é no pH 8,5.

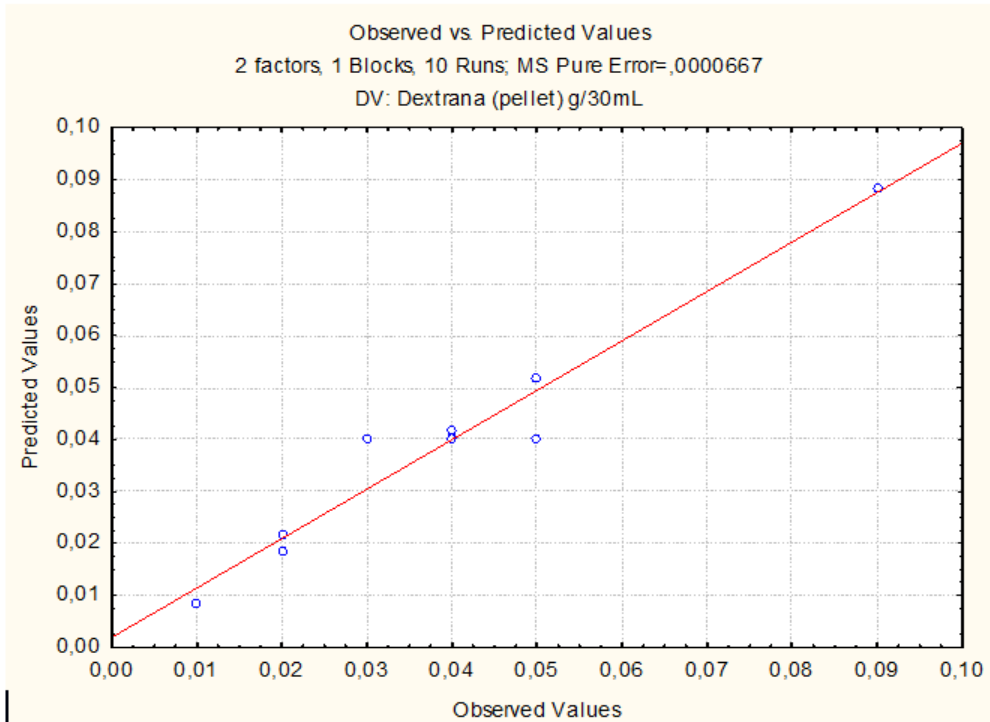
### 3.2 Otimização da produção da dextrana insolúvel

Analisando os dados da ANOVA (tabela 3), não há evidência de falta de ajuste do modelo. A análise de variância mostrou que este modelo de regressão foi significativo ( $P < 0,05$ ) com o valor de F de 15,53.

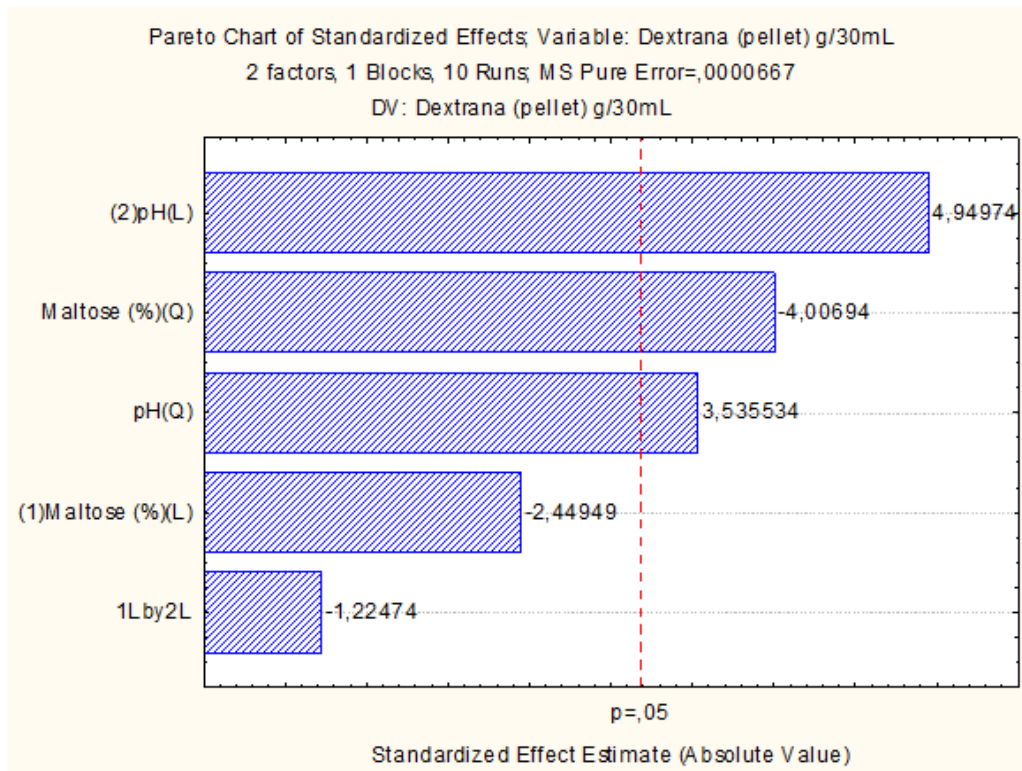
**Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental modelo Doehlert para a otimização da dextrana insolúvel pelo *Leconostoc pseudomesenteroides* R2.**

Fonte de variação	SQ	GI	MQ	F calculado	F tabelado	R-sqr
Regressão	0,00427	5	0,00085	15,53	6,26	0,95174
Resíduo	0,00022	4	0,00005			
Falta de ajuste	0,00002	1	0,00002	3,00	10,13	
Puro erro	0,00020	3	6,66600			
<b>SQ total</b>	<b>0,00449</b>	<b>9</b>				

A análise apresenta também um valor satisfatório de coeficiente de otimização, que foi calculado como sendo de 0,95174, corroborado pelo gráfico gerado dos valores preditos, em que a maior parte dos valores observados encontra-se próximos à linha de tendência (figura 1).



**Figura 1** - Valores preditos e valores observados da análise experimental da produção do polímero insolúvel a partir do pellet.

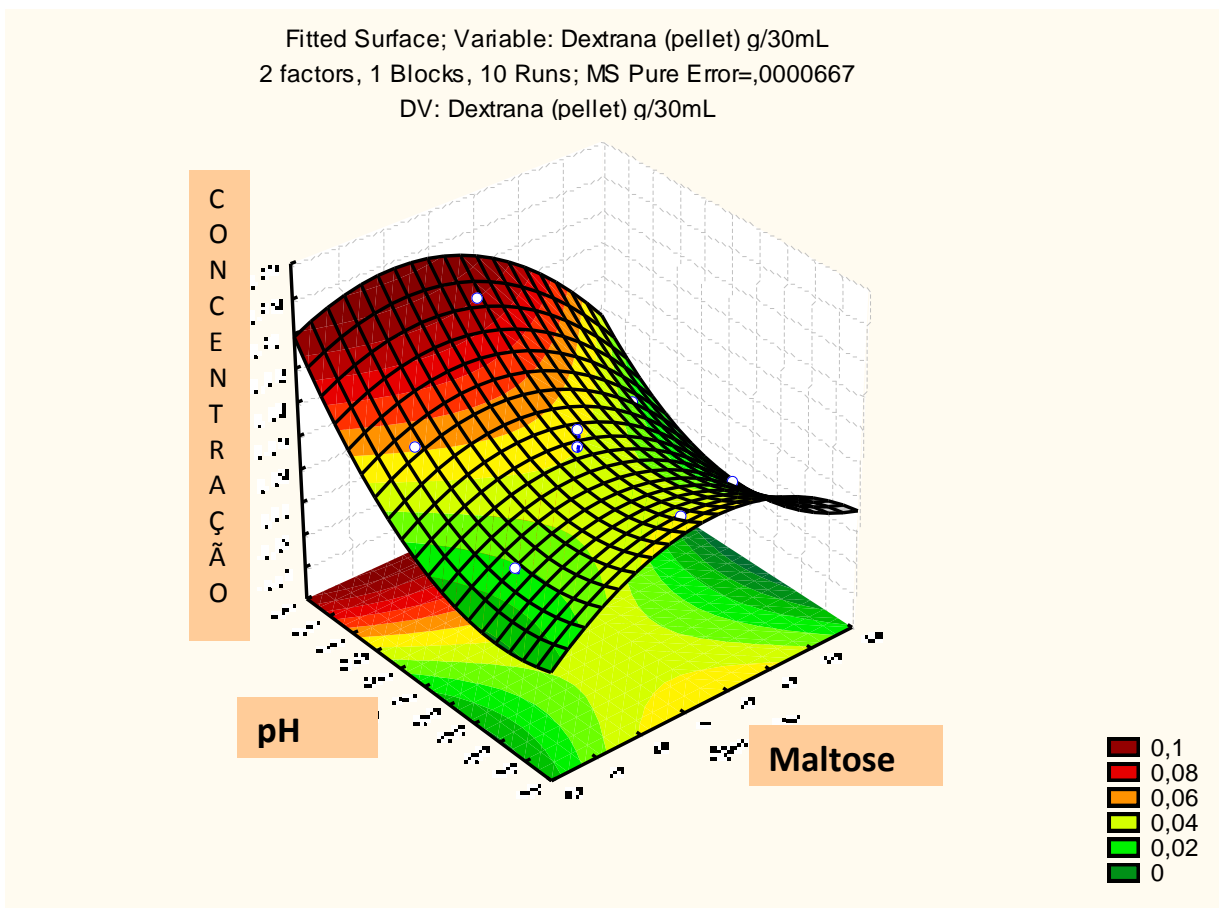


**Figura 2** - Gráfica de Pareto dos dados experimentais da produção da dextrana a partir do pellet.



Através do gráfico de Pareto (figura 2), pode-se observar que o parâmetro de maior influência para a produção de polímero de uma maneira geral (solúvel e insolúvel) foi o pH, tendendo para um valor mais alto.

A partir dos dados experimentais obtidos para a produção da dextrana insolúvel, em que foram utilizados níveis diferentes de pH e concentração de maltose, foi possível traçar um gráfico tridimensional (figura 2), em que se demonstra a área de maior produção do polímero. Vale ressaltar que a área se refere principalmente à produção do polímero solúvel, já que somente um ponto do ensaio experimental produziu o polímero insolúvel.



**Figura 3** - Gráfico de Superfície de resposta mostrando o efeito da concentração de maltose e do pH para a produção da dextrana extraído do pellet.

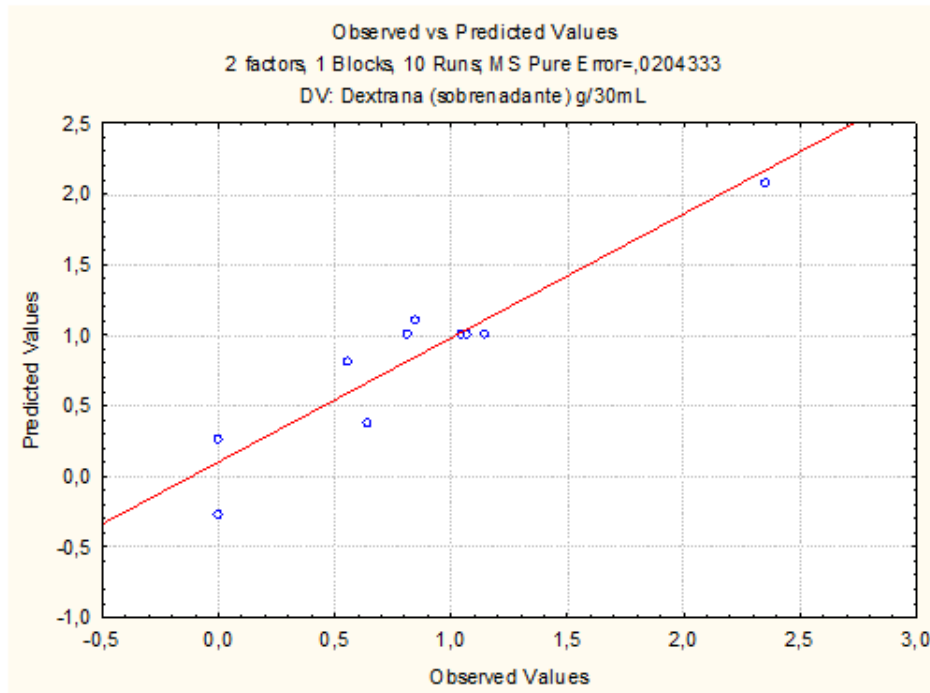
### 3.3 Resultado Sobrenadante

Nos dados da ANOVA demonstrados na tabela 4, observa-se que houve evidência de falta de ajuste do modelo, e que o modelo de regressão não foi significativo em nível de 5%, apresentando o valor de F calculado (5,76) menor do que o F tabelado (6,26). A análise apresenta também o coeficiente de otimização menor do que os dados obtidos na produção do polímero pelo pellet, que foi calculado como sendo de 0,87798.

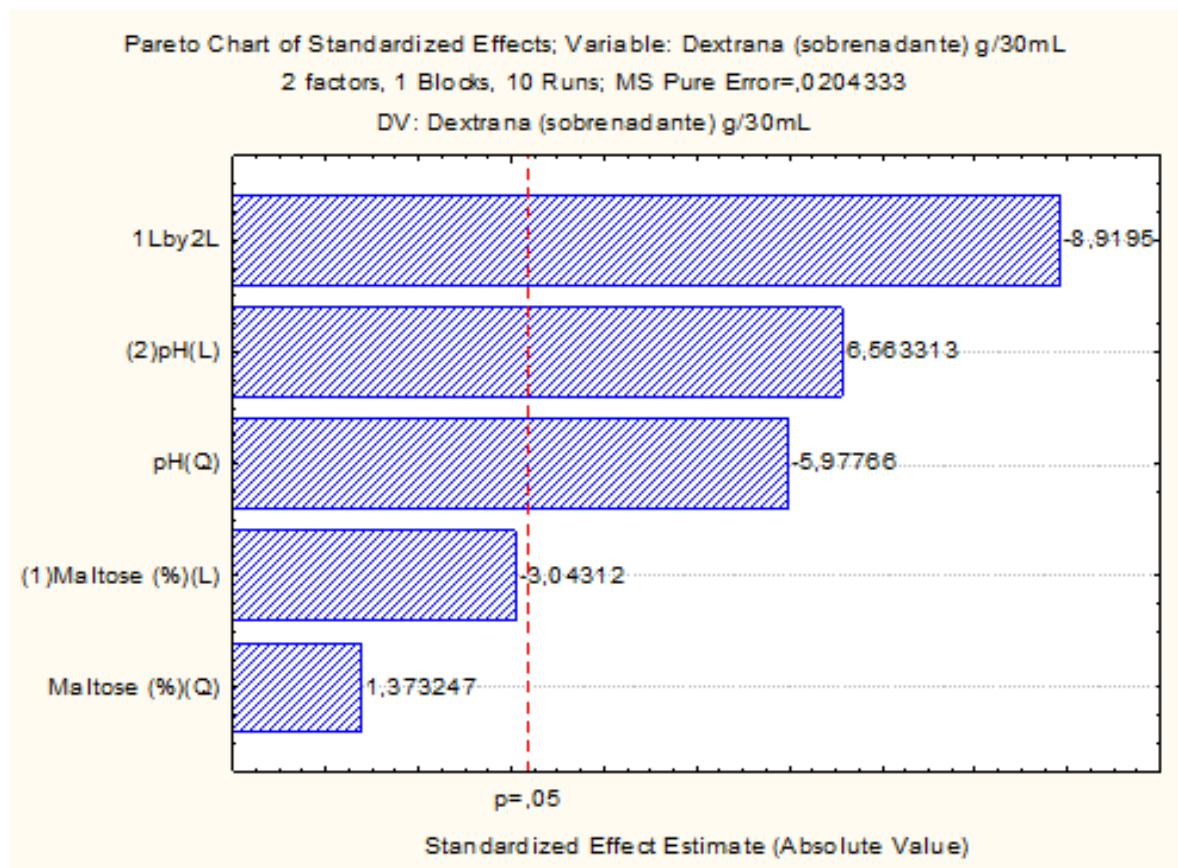
**Tabela 4** - ANOVA dos dados experimentais da produção da dextrana insolúvel a partir do sobrenadante

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F		R-sqr
				calculado	tabelado	
Regressão	3,51107	5	0,70221	5,76	6,26	0,87798
Resíduo	0,48797	4	0,12199			
Falta de ajuste	0,42667	1	0,42667	20,88	10,13	
Puro erro	0,06130	3	0,02043			
SQ total	3,99904	9				

Os valores observados se encontram um pouco afastados da linha de tendência dos valores preditos (figura 4). Isto pode ser explicado pelo fato de uma boa parte do polímero encontrado no sobrenadante ter ficado incrustado nos pellets, após a centrifugação.



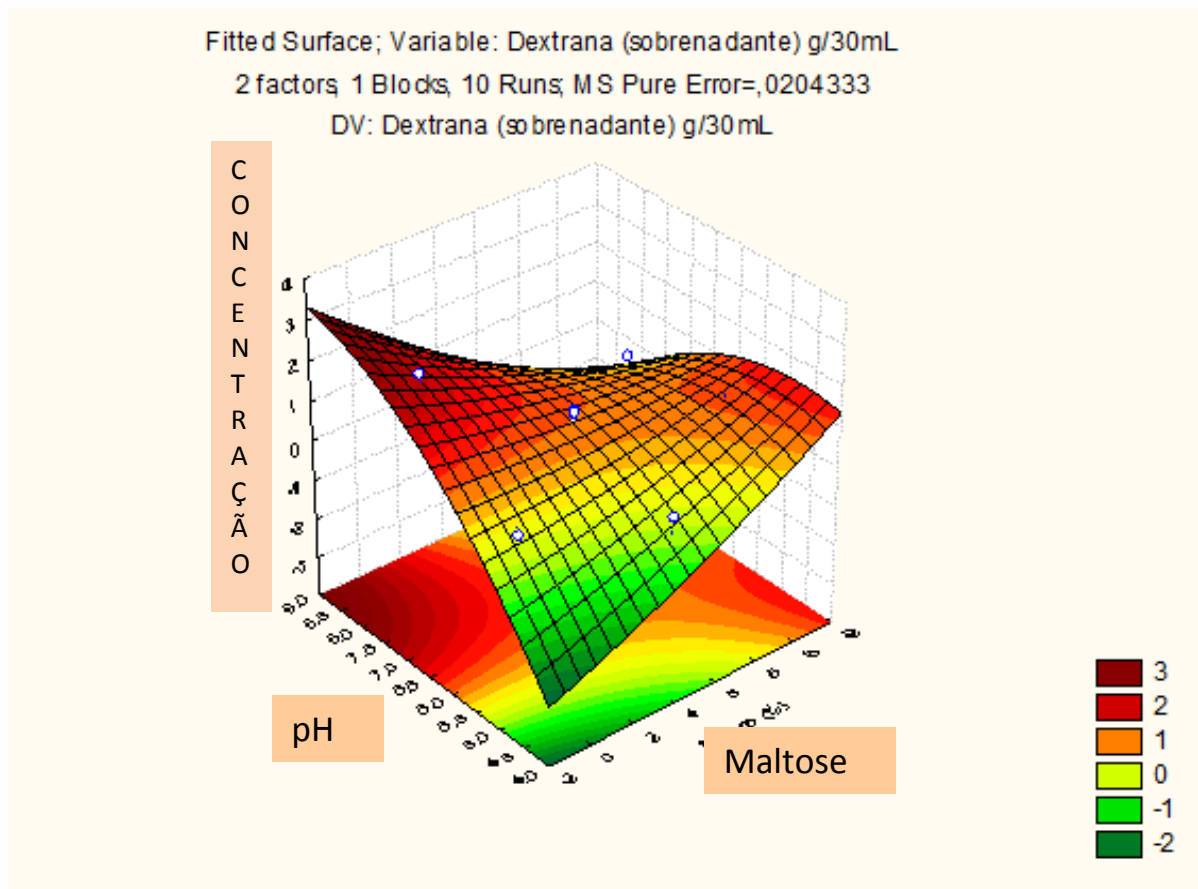
**Figura 4** - Valores preditos e valores observados da análise experimental da produção do polímero insolúvel a partir do sobrenadante.



**Figura 5** - Gráfico de Pareto dos dados experimentais da produção da dextrana a partir do sobrenadante.

Através do gráfico de Pareto (figura 5), pode-se observar que a interação entre o pH e a concentração de maltose foi mais significativa do que somente o efeito do pH, e a maltose sem a interação do pH não exerceu efeito significativo no sistema.

A partir dos dados experimentais obtidos para a produção da dextrana insolúvel, em que foram utilizados níveis diferentes de pH e concentração de maltose, foi possível traçar um gráfico tridimensional (figura 6), em que se demonstra a área de maior produção do polímero. Vale ressaltar que a área se refere somente à produção do polímero solúvel, uma vez que no sobrenadante somente obteve-se polímero solúvel, mostrando pontos divergentes por não apresentar significância conforme tabela 4.



**Figura 6** - Gráfico de Superfície de resposta mostrando o efeito da concentração de maltose e do pH para a produção da dextrana extraído do sobrenadante.

Diferentes cepas de *Leuconostoc mesenteroides* já foram isoladas a partir de substratos orgânicos, que foram capazes de produzir um polímero de glicose comercialmente importante de cadeia longa, conhecida como dextrana. Neste trabalho, foi produzida e caracterizada a dextrana insolúvel e solúvel produzida a partir da cepa de *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2, isolada da fermentação do repolho colhido do semiárido baiano (PAULO,2012).

Os autores (PADMANABHAN e KIM, 2002) compararam a produção de dextrana solúvel e insolúvel, no meio com pH de 5,4 e concentração de 2, 5, 10 e 15% de sacarose. O melhor rendimento foi de dextrana insolúvel com 15% de sacarose. SHUKLA, et al, 2011, relata rendimento de 3g/L, cujos parâmetros utilizados foram maltose 5% e pH 5,4. Neste trabalho, a melhor produção foi de dextrana insolúvel na amostra 8, com meio de produção EPS com dextranasacarase pH 8,5 e 5% maltose; e dextrana solúvel na amostra 10, contendo meio de produção EPS com dextranasacarase em pH 7,5 e 0% maltose pela via enzimática.

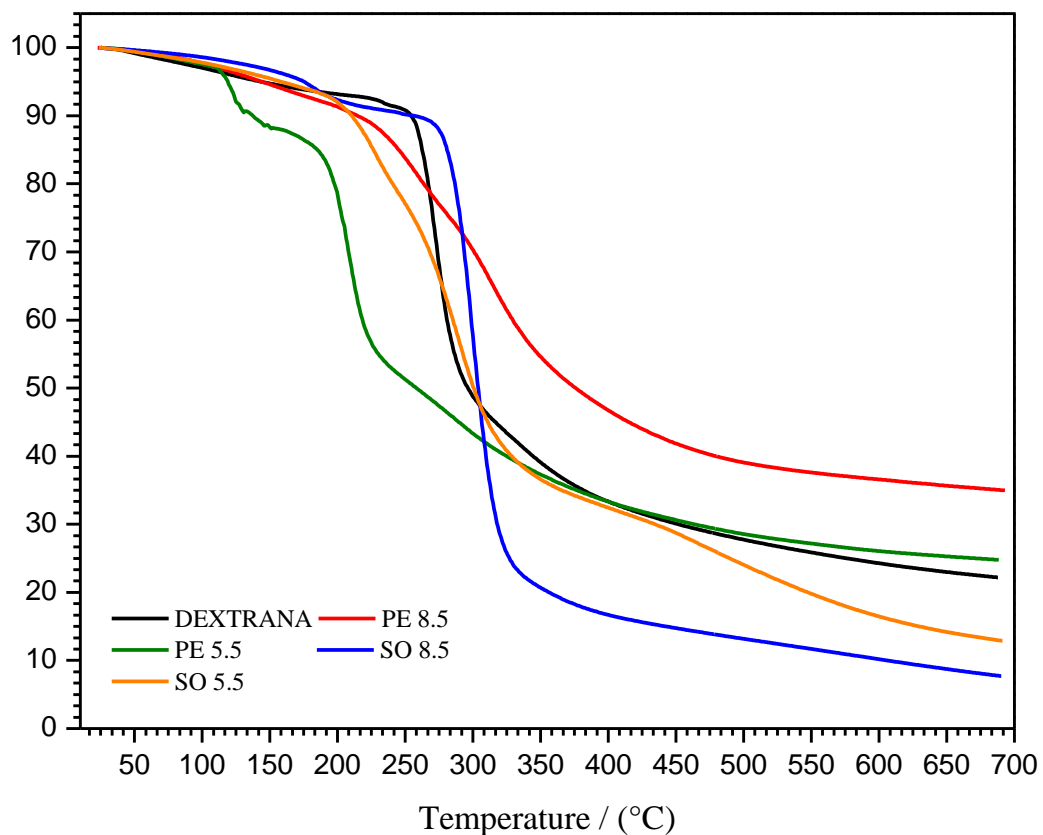
### 3.5 Caracterização das Dextranas

A dextrana solúvel e a insolúvel foram caracterizadas como segue:

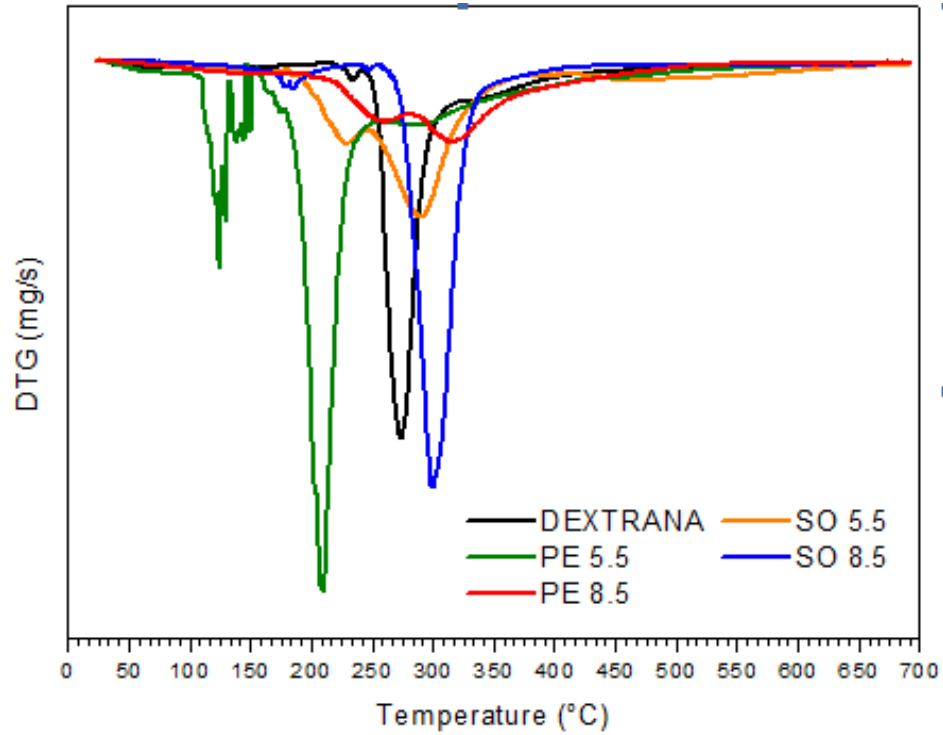
#### 3.5.1 Análise termogravimétrica (TGA) com atmosfera de N<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>:

As estabilidades térmicas das amostras de dextranas estão ilustradas na figura 07, representando os resultados obtidos da análise termogravimétrica (TGA).

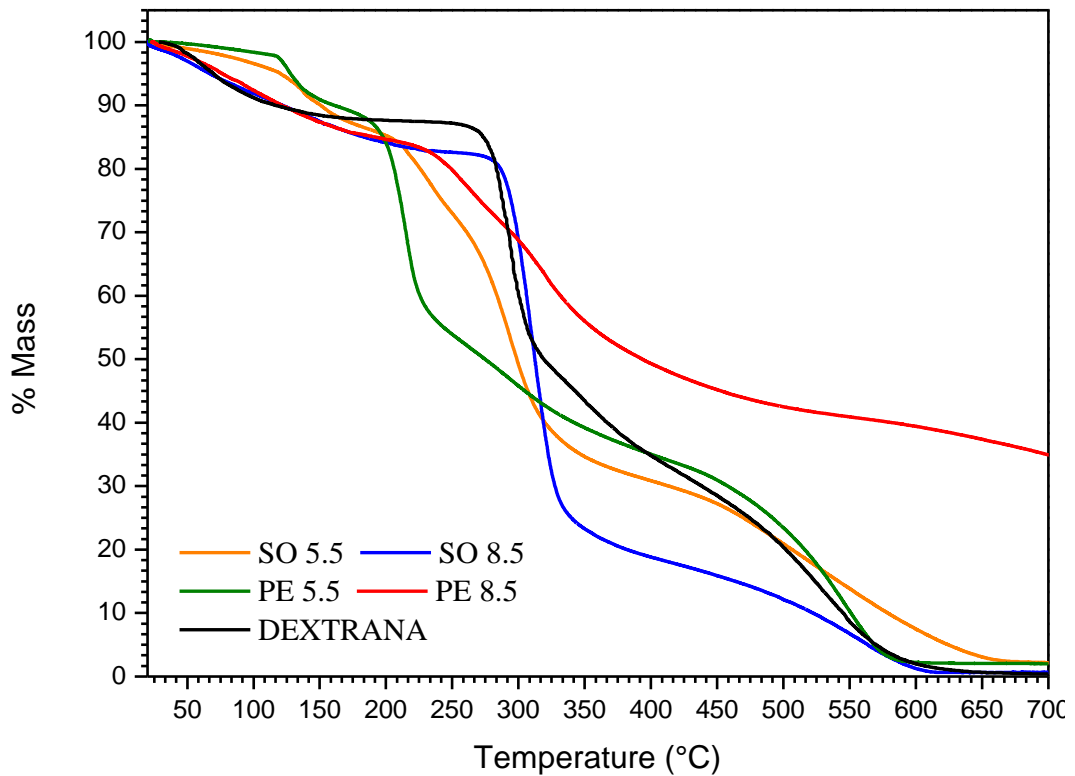
As curvas TGA foram estudadas na gama de 50°C-700°C, Figura 7 e 8, em atmosfera de N<sub>2</sub>; e, Figura 9 a 10, em atmosfera de O<sub>2</sub>. As amostras de dextrana apresentam 10% entre as temperaturas de ±50°C a ±200°C. É possível observar que a segunda temperatura de decomposição ocorreu para todas as amostras, no período de temperatura de ± 200°C a ± 330°C, indicando decomposição das amostras. Na terceira fase, a combustão dos produtos degradados começou a ± 330°C. A amostra PE 5,5 possui comportamento diferente: apresenta a perda de 10% entre ±50 a ±110°C, a segunda fase ±110°C a ± 250°C – e, nesta fase, já perdeu 60% da sua massa. A curva termogravimétrica típica do polímero dextrana obtida de experimentos realizados por RODRIGUES-FILHO, et al., 2007, também mostram comportamento semelhante a este termograma.



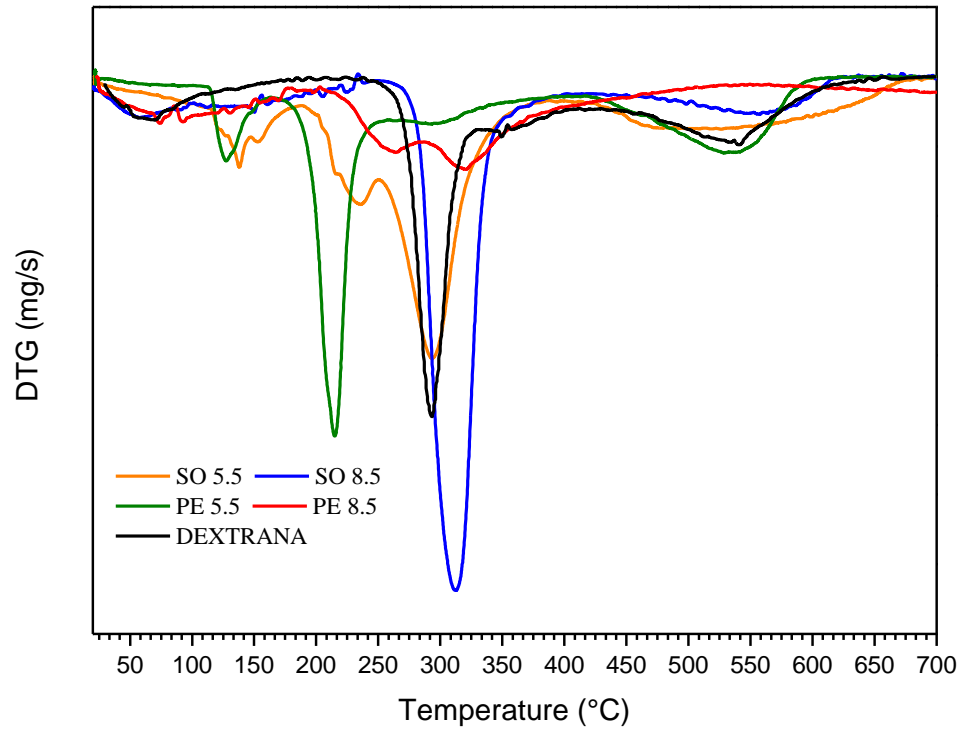
**Figura 7** – Curva de TGA de todas as amostras PE 5,5 – PE 8,5 – SO 5,5 – SO 8,5- DEXTRANA, sob atmosfera de N<sub>2</sub>.



**Figura 8**– Curva de dTGA de todas as amostras PE 5,5 – PE 8,5 – SO 5,5 – SO 8,5- DEXTRANA, sob atmosfera de N2.



**Figura 9** – Curva de TGA de todas as amostras PE 5,5 – PE 8,5 – SO 5,5 – SO 8,5- DEXTRANA, sob atmosfera de O2.

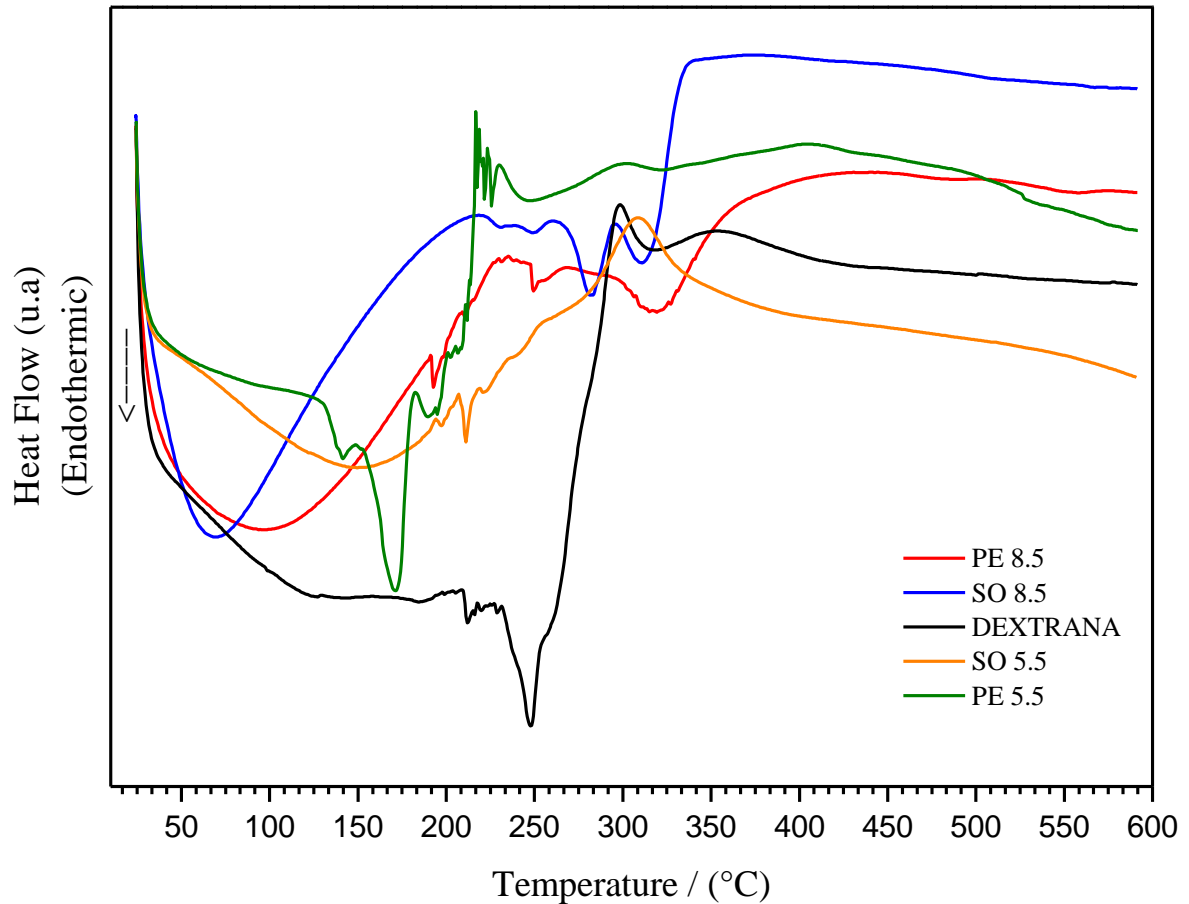


**Figura 10** – Curva de dTGA de todas as amostras PE 5,5 – PE 8,5 – SO 5,5 – SO 8,5- DEXTRANA sob atmosfera de O<sub>2</sub>.

### 3.5.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC):

As amostras de dextranas: dextrana, PE 5,5, PE 8,5, SO 5,5 e SO 8,5, foram caracterizadas por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e expostas na Figura 11. Os gráficos sugerem que as variações são similares entre os compostos que apresentam a decomposição a partir de 300°C.

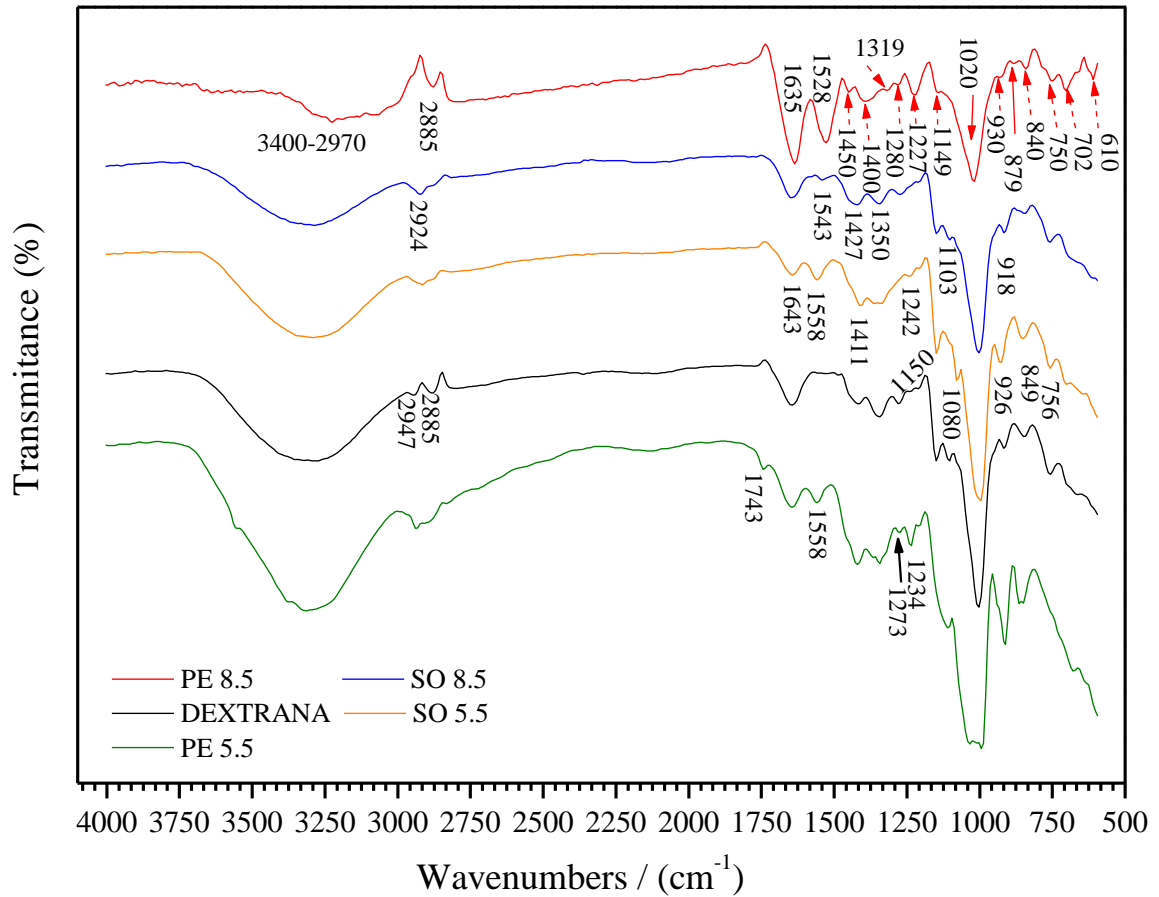




**Figura 11** - Gráfico da curva de DSC de comparação entre as amostras de PE 5,5 – PE 8,5 – SO 5,5 – SO 8,5- DEXTRANA.

### 3.5.3 FTIR (Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier)

O espectrômetro utilizado foi de marca Shimadzu, modelo IR Prestige-21, no modo de reflexão atenuada (ATR), na faixa espectral de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ . Gráficos de FT-IR estão representado na Figura 12.



**Figura 12** - Gráfico dos espectros na região do infravermelho (500-4000 cm<sup>-1</sup>) das amostras de PE 5,5 – PE 8,5 – SO 5,5 – SO 8,5- DEXTRANA.

O espectro de FTIR da dextrana, que provavelmente é a insolúvel (PE 8,5), mostra pontos como os relatados por SHUKLA, 2011: o espectro de FTIR mostrou ausência de uma banda larga em torno do 3.422 cm<sup>-1</sup>, atribuído na literatura ao estiramento de alongamento de hidroxila.

As dextranas PE 5,5- PE 8,5 - SO 5,5 -SO 8,5 – DX apresentam espectros semelhantes. A banda na região de 2928 cm<sup>-1</sup> foi devida ao estiramento C-H. A banda na região de 1.645 cm<sup>-1</sup> corresponde ao estiramento do grupo carbonila/carboxila C=O. Características de absorção a 850 e 930 cm<sup>-1</sup> também

foram observadas, na configuração de um  $\alpha$ - representando unidades de açúcar (PATEL, 2012).

No entanto, as principais bandas de absorção que caracterizaram o exopolissacarídeo, dextrana  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6), foram encontradas nas regiões de 1150  $\text{cm}^{-1}$ , referente às vibrações da ligação glucosídica C-O-C e, em 912  $\text{cm}^{-1}$ , indicando a existência dessa ligação glucosídica na conformação alfa ( $\alpha$ ). A presença do evento de absorção em 1010  $\text{cm}^{-1}$ , relativo à grande flexibilidade da cadeia da dextrana presente nas ligações glicosídicas  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6), também confirma a estrutura do EPS. Os eventos em 1103 e 1.020  $\text{cm}^{-1}$  são devidos ao estiramento de C-O e ligações C – C, CCH, COH e HCO (PATEL, 2012; PURAMA, 2009; SHUKLA, 2011).

#### 4. CONCLUSÃO

No presente trabalho, através da linhagem bacteriana *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2, foi possível obter tanto a dextrana solúvel quanto a insolúvel, sendo esta última produzida quando encontrados os parâmetros ideais para a sua produção.

As dextranas produzidas foram purificadas e suas propriedades estruturais analisadas e, na caracterização das dextranas pelo FTIR, comparando-se todas as amostras produzidas neste trabalho, que apenas a dextrana insolúvel (PE8,5) apresenta ausência da banda de OH (hidroxila) na região de 3400, sugerindo assim sua insolubilidade. No teste visual, a amostra PE 8,5 não dissolveu nas seguintes substâncias: DMSO, D<sub>2</sub>O, eter, álcool, H<sub>2</sub>O quente. No TGA, dTGA e DSC,

demonstrou estabilidade térmica em alta temperatura. Esta característica é de grande aplicação tecnológica e de grande importância para este produto, pois permite que o mesmo seja esterilizado sem que ocorra sua decomposição.

## REFERÊNCIAS

CHLUDZINSKI, A. M.; GERMAINE, G. R.; SCHACHTELE, C. F. Purification and properties of dextransucrase from *Streptococcus mutans*. **J. Bacteriol.**, 118, 1974. 1-7.

CORTEZI, M.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Temperature effect on dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B isolated from Alcohol and Sugar Mill Plant. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 4 (3), pp. 279-285, March 2005.

DAVID SEMYONOV, ORY RAMON, YUVAL SHOHAM AND EYAL SHIMONI. Enzymatically synthesized dextran nanoparticles and their use as carriers for nutraceuticals. **Food Funct.**, 2014, 5, 2463.

DOMAN, K.; ROBYT, J. F. Production, selection and characteristics of *Leuconostoc mesenteroides* B742 constitutive for dextransucrase. *Enzyme Microbiology Technology*, 15, 1995. 689-695.

ERHARDT, F. A.; KUEGLER, J. Co-immobilization of dextransucrase and dextranase for the facilitated synthesis of isoalto-oligosaccharides: preparation, characterization and modeling. **Biotechnol. Bioeng.**, 100, 2008. 673-683.

GOULAS, A.K., FISHER, D.A., GRIMBLE, G.K., GRANDISON, A.S., RASTALL, R.A. Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextransucrase and dextranase. **Enzyme Microb. Technol.** , 2004, 35, 327–338.

GOYAL, A., KATIYAR, S.S. Fractionation of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextran sucrose by polyethylene glycol: a simple and effective method of purification. **J. Microbiol. Meth.** 20, 1994, 225–231.

JEANES, A. et al. Characterization and Classification of Dextrans from Ninety- six Strains of Bacteria. **Journal Amer. Chem. Soc.**, p. 5041-5052, 1954.

KABOLI, H.; REILLY, P. J. Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase. **Biotechnol. Bioeng.**, 22, 1980. 1055-1069.

KANG, H. K.; KIM, Y. M.; KIM, D. M. Functional, genetic, and bioinformatic characterization of dextransucrase (DSRBCB4) gene in *Leuconostoc mesenteroides* B-1299CB4. **J. Microbiol. Biotechnol.**, 18, 2008. 1050- 1058.

KIM D AND ROBYT; J. F.. Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucansucrases. **Enzyme Microbial Technol.** 1994, 16: 659-664.

KOBAYASHI, MIKIHICO and MATSUDA , KAZUO; CHARACTERIZATION OF THE MULTIPLE FORMS AND MAIN COMPONENT OF DEXTRANSUCRASE FROM LEUCONOSTOC MESENEROIDES NRRL B-512F. **Biochimica et Biophysica Acta**, 614 (1980) 46—62. Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

KOBAYASHI;M, MIHARA K. AND MATSUDA; K. Dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRLB-512F:Characterization of the Enzyme Bound to Sephadex Gel. **Agric. Biol Chem.**, 50 (3), 551-556, 1986.

MARGUERITE DOLS , MAGALI REMAUD SIMEON, REN-MARC WILLEMOT, MICHEL R. VIGNON , PIERRE F. MONSAN. Structural characterization of the maltose acceptor-products synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextranase. **Carbohydrate Research** 305,1998, 549-559.

MARIANA CORTEZI, RUBENS MONTI AND JONAS CONTIERO. Temperature effect on dextranase production by *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B isolated from Alcohol and Sugar Mill Plant. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 4 (3), pp. 279-285, March 2005.

MILLER A. W, EKLUND SH, ROBYT JF. Milligram to gram scale purification and characterization of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Carbohydr. Res.**, 1986;147: 119-133.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, **Analytical Chemistry** 31(3): 426-428, 1959.

MONCHOIS, V. et al. Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranase (DSRS) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 48, 1997. 465-472.

NAESSENS, M., CERDOBBEL, A., SOETAERT, W., VANDAMME, E.J. *Leuconostoc* dextranase and dextran: production, properties and applications. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** , 2005, 80, 845–860.

PADMANABHAN, P. A.; KIM, D. Production of insoluble dextran using cell-bound dextranase of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523. **Carbohydrate Research**, 337, 2002. 1529-1533.

PADMANABHAN, P. A; KIMA, D-S; PAKB D; SIMC S.J. et al. Rheology and gelation of water-insoluble dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523. **Carbohydrate Polymers**. 53 (2003) 459–468.

PAULO, ELINALVA M. et al; Production, extraction and characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 strain. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, June 2012, Vol.84(2), pp.495-507.

PURAMA, R. K., and GOYAL, A. Effect of nutrients by one variable at a time (OVAT) approach on the dextransucrase production from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. **Internet J. Microbiol**, 5.1, 2008.

RAVI KIRAN PURAMA, ARUN GOYAL. Identification, effective purification and functional characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. **Bioresource Technology** 99 (2008) 3635–3642.

RAVI KIRAN PURAMA, ARUN GOYAL. Screening and optimization of nutritional factors for higher dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640 using statistical approach . **Bioresource Technology** 99 (2008); 7108–7114.

REINALDO FRAGA VIDAL, AIDI'N MARTI'NEZ,CLAIRE MOULIS, PIERRE ESCALIER, SANDRINE MOREL , MAGALI REMAUD-SIMEON, PIERRE MONSAN. A novel dextransucrase is produced by *Leuconostoc citreum* strain B/110-1-2: an isolate used for the industrial production of dextran and dextran derivatives. **J Ind Microbiol Biotechnol** (2011) 38:1499–1506.

RODRIGUES, R. Dextrana: produção e aplicação industrial. 2009. Trabalho de conclusão de curso 50fl. (Licenciatura Bacharelado- Ciências Biológicas)- Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2009.

SEEMA PATEL, NARESH KASOJU, UTPAL BORA, ARUN GOYAL. Structural analysis and biomedical applications of dextran produced by a new isolate *Pediococcus pentosaceus* screened from biodiversity hot spot Assam. Department of

Biotechnology, Indian Institute of Technology Guwahati, Guwahati 781 039, Assam, India. **Bioresource Technology** 101 (2010) 6852–6855.

SEEMA PATEL, DAMINI KOTHARI AND ARUN GOYAL. Purification and Characterization of an Extracellular Dextranucrase from *Pediococcus pentosaceus* Isolated from the Soil of North East India. **Food Technol. Biotechnol.** 49 (3) 297–303 (2011);

SEO, E.-S., NAM, S.-H., KANG, H.-K., CHO, J.-Y., LEE, H.-S., RYU, H.-W., KIM, D. Synthesis of thermo- and acid-stable novel oligosaccharides by using dextranucrase with high concentration of sucrose. **Enzyme Microb. Technol.**, 2007, 40, 1117–1123.

SHUKLA, RISHIKESH, et al. "Structural characterization of insoluble dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 in the presence of maltose." *Food Technology and Biotechnology* 49.3 (2011): 291-296.

SUTHERLAND I.W. **Adv Microbiol Physiol** 1972;8:143–213.

SUTHERLAND I.W. Microbial EPS synthesis in surface carbohydrate of the prokaryotic cell. London: **Academic Press**, 1977.

TSUCHIYA, H.M., KOEPESELL, H.J., CORMAN, J., BRYANT, G., BOGARD, M.O., FEGER, V.H. The effect of certain cultural factors on production of dextranucrase by *leuconostoc mesenteroides*. **Ain R. W. JACKSON**. 521-526, v.64, 1952.

VASILEVAA. T., I. IVANOVAB & I. ILIEVA. Purificação e caracterização de glucosiltransferases de novas estirpes de *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnologia e Biotecnológica Equipment*. Volume 23, Suplemento 1, 2009. **Edição Especial: ANIVERSÁRIO XI Conferência Científica**. p. 693-697.



## 4.2. Obtenção e caracterização de compósitos de látex com fibra de coco e dextrana

Kenya Karla Felicíssimo Gonçalves<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal da Bahia

Contato: [kenyakarla@ig.com.br](mailto:kenyakarla@ig.com.br)

Manuscrito elaborado com resultados da pesquisa de tese do doutorado realizado na Universidade Federal da Bahia, no programa do RENORBIO.

### RESUMO

Neste trabalho, foi estudado o desempenho mecânico e térmico dos compósitos com matriz a base de borracha natural (*Hevea brasiliensis*) reforçada com a adição de agentes de reforço: dextrana e fibra de coco. A caracterização foi realizada através dos ensaios de análise termogravimétrica (TGA) nitrogênio e oxigênio; calorimetria exploratória diferencial (DSC); espectroscopia infravermelha (FTIR) e teste de tração. Os resultados permitiram concluir que os compósitos possuem características de suportar a altas temperaturas. A resistência à tração também aumentou com a adição dos agentes.

**PALAVRAS-CHAVES:** dextrana solúvel, látex, compósitos, fibras de coco, propriedades mecânicas.

## ABSTRACT

In this project was studied the mechanical and thermal behavior of components made out of natural rubber (*Hevea brasiliensis*). Two different reinforcement agent substances were added: dextran and coconut fiber. The characterization was made through trials of Thermogravimetric Analysis (TGA) nitrogen and oxygen, Differential Scanning Calorimetry (DSC), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), tensile testing. After the studies mentioned before, we can conclude that adding reinforcing filler improved the characteristics for the developed study application; the material resists to higher temperatures making the final product significantly more resistant.

**KEYWORDS:** dextran soluble, rubber latex, coconut fiber, composites, biocomposites

## 1. INTRODUÇÃO

Látex preparados por polimerização em emulsão constituem-se sistemas de grande aplicação industrial e tecnológica. São amplamente utilizados na produção de polímeros filmes, materiais elásticos e também em aplicações biomédicas e biotecnológicas (DA RÓZ, 2003). Um látex pode ser convenientemente definido como uma dispersão coloidal estável de um polímero em um meio aquoso, podendo ainda ser classificado como natural ou sintético. Na emulsão do látex, o polímero

disperso se encontra agregado na forma de partículas de geometria aproximadamente esférica, apresentando diâmetros típicos entre 30 a 1000 nm. Compósitos são misturas de um ou mais materiais dispersos em uma matriz, que podem associar as propriedades dos seus respectivos constituintes. Para a formação de um compósito com propriedades específicas, por exemplo, uma fibra orgânica pode ser adicionada a uma matriz polimérica, para modificar e melhorar propriedades mecânicas como resistência à tração e flexão, diminuição de custos e diminuição dos impactos ambientais ao meio ambiente (BLEDZKI, 1999).

A adição de agentes (reforço ou enchimento) é bastante utilizada nos polímeros, pois concedem aumento de resistência e rigidez, elevando sua competitividade comparada a outros tipos de aditivos (PEREIRA, 2009).

Dextrana é um exopolissacarídeo (EPS) de glicose de origem bacteriana. Com fórmula empírica  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , esse exopolissacarídeo (EPS) é formado por um esqueleto contendo unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosil, unidas por ligações  $\alpha(1\rightarrow6)$ . Ramificações ao longo da cadeia são introduzidas por ligações do tipo  $\alpha(1\rightarrow4)$ ,  $\alpha(1\rightarrow3)$  e  $\alpha(1\rightarrow2)$  (SEYMOUR, 1980).

A fibra de coco é uma das fibras de fruta usada em maiores quantidades e possui propriedades e qualidades que a distinguem de outras, tais como: maior elasticidade, em comparação com outras fibras vegetais, resistência à umidade, a alterações atmosféricas e ao desgaste. No entanto, as fibras extraídas são de pequeno comprimento e grosseiras, sendo utilizadas em colchões, tapetes, enchimentos de almofadas, na indústria da construção e setor automobilístico.

O consumo da água de coco e da polpa de coco gera uma quantidade significativa de resíduos, representados por suas cascas. As cascas podem ser processadas para serem utilizadas como carga de reforço ou confecção de

produtos, como tapetes, esteiras e outros. Poucos estudos têm sido realizados visando à caracterização e utilização da fibra e do pó da casca do coco verde (ROSA et al., 2002). Ressalta-se, entretanto, a grande predominância dos estudos voltados para uso de fibras de coco maduro (ROUT et al., 2001a; ROUT et al., 2001b; SILVA et al., 2006; ROZMAN et al., 2000).

Os compósitos assim formados foram avaliados com relação às características de cada um dos componentes e também dos compósitos feitos em quantidades variadas dos agentes adicionados. A adição de fibras aos polímeros vem se tornando uma prática cada vez mais comum por alterarem, de forma significativa, as propriedades do novo material. Em geral, a adição de cargas apresenta ao compósito baixa densidade, baixo custo, baixa abrasividade, são atóxicos, biodegradáveis, recicláveis, além da possibilidade de desenvolvimento. As fibras de coco utilizadas neste estudo são fibras lignocelulósicas obtidas do mesocarpo fibroso do coco verde, obtidas a partir de frutos sadios e descartados.

O látex, polímero natural, é um composto de aproximadamente três unidades trans isoprênicas, responsáveis pela parte cristalina, seguidas de cerca de 10.000 unidades cis isoprênicas, responsáveis pela parte amorfa, do tipo cabeça cauda (GALIANI, 2007), combinadas por ligações 1,4 e um grupo terminal. Os constituintes não borracha do látex são proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos e outros constituintes inorgânicos (AGUNSOYE, 2012). Os lipídios são os principais componentes ao redor da membrana do látex e apresentam importante papel no tempo de estabilidade mecânica do látex quando estabilizado em amônia (HASMA, 1991).

O conhecimento das características químicas, mecânicas e térmicas das fibras provenientes de frutos imaturos (coco verde), da dextrana e do látex torna-se necessário para a compreensão de sua potencialidade de uso.

Este trabalho teve como objetivo investigar as características do látex e das cargas que lhe foram adicionadas: a fibra de coco verde e a dextrana, biopolímero. Foram avaliadas a composição química, as propriedades mecânicas e térmicas, como forma de contribuir para avaliar seu potencial.

## 2. MATERIAL E MÉTODO

A produção dos componentes ocorreu utilizando reagentes com alto grau de pureza e com higiene dos locais de produção. Determinado as várias concentrações dos compósitos, foram produzidos os corpos de prova, de acordo ao que segue:

**Dextrana:** Produzida no laboratório BIOPROPECTOR, utilizou-se a linhagem nativa de *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2, cedida pela Bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Aplicada à Saúde Pública da Universidade Estadual de Feira de Santana-UEFS. A dextrana solúvel foi obtida através do processo convencional. Para a produção da goma, foi utilizado o meio de Guimarães, protocolo adaptado de Paulo, 2012. Todo o processo de cultivo e extração do EPS (exopolissacarídeo, DEXTRANA) seguiu-se às condições previamente otimizadas por Paulo, 2012. Meio de cultivo contendo 8,1% de sacarose, pH 8,0, sem aeração, temperatura de incubação 28°C, tempo de incubação 30h. A extração dos exopolissacarídeos foi realizada após o período de incubação, e a cultura que se

apresentava como um caldo viscoso foi tratada com ácido tricloroacético 10% (1:1), homogeneizada por 30 minutos a 90 RPM,  $25 \pm 2$  °C, centrifugada a 8150 x g por 20 minutos. O material sedimentado foi descartado, adicionado ao sobrenadante álcool absoluto (1:2). Os precipitados de EPS foram submetidos à diálise fechada contra água destilada, em membranas com limite de exclusão de 05 kDa. Durante a diálise, o material foi mantido sob agitação magnética. Os precipitados de EPS foram secos em estufa a 40<sup>0</sup>C até peso constante. Depois, triturados no moinho analítico – e estes, em forma de pó, foram utilizados na obtenção dos corpos de prova. Conseguimos um rendimento de 78,35 g/l (470,11 gramas / 6 litros de meio de produção).

**Fibra de coco:** As fibras de coco foram cuidadosamente tratadas no LAPOS – Laboratório de Polímeros e Sistemas da UESC. Os cocos verdes e sadios, colhidos logo após o consumo da água, foram separados do endocarpo (retirada da casca verde). O mesocarpo foi cortado manualmente em cavacos de tamanhos de aproximadamente 20 mm de espessura.

Os cavacos foram secos em laboratório por 7 dias a temperatura ambiente e, após secos, foram acondicionados em estufa a 110<sup>0</sup>C por 2 horas. Em seguida, foram armazenados. Antes da moagem, eles foram secos em micro-ondas (no modo descongelar), até a estabilização do peso (peso constante). Secos, os cavacos (pedaços do mesocarpo) foram colocados em moinho de bolas na proporção de 20 gramas de fibras e 120 bolas, por um período de 60 minutos. Após a moagem, as fibras são separadas por meio de peneiras, segundo a norma técnica NBR 10,027 método A. As fibras após a moagem foram utilizadas para a formação dos respectivos compósitos.

**Látex:** O látex de borracha natural (NR) possui a concentração igual a 53% de sólidos. Ele foi aditivado com enxofre, estearina, óxido de zinco e acelerador ZBDC. O látex natural foi colhido na região do Sul da Bahia e armazenado sob refrigeração, com adição de amônia, pelo período de até 48 horas antes do uso.

**Compósitos:** As amostras foram preparadas individualmente, de acordo com a sua composição, confeccionando os corpos de prova pelo modo CASTING. Realizou-se a pesagem (p/p) de cada componente (fibra de coco ou dextrana). O preparo a ser descrito foi utilizado para todas as amostras e estas foram preparadas individualmente, uma em cada momento. Adicionou-se ao vasilhame o látex e, a cada componente, a fibra de coco ou dextrana. Estes foram adicionados ao látex de forma manual e contínua. Muito lentamente, a solução foi agitada manualmente para promover a homogeneização.

## 2.1. Amostras

IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	DESCRIÇÃO
LÁTEX	LÁTEX
DEXTRANA	DEXTRANA
FIBRA DE COCO	FC
LÁTEX+DEXTRANA 5%	LADX 5%
LÁTEX+DEXTRANA 10%	LADX 10%
LÁTEX+DEXTRANA 15%	LADX 15%
LÁTEX+DEXTRANA 20%	LADX 20%
LÁTEX+ FIBRA DE COCO 5%	LFC 5%
LÁTEX+ FIBRA DE COCO 10%	LFC 10%
LÁTEX+ FIBRA DE COCO 15%	LFC 15%
LÁTEX+ FIBRA DE COCO 20%	LFC 20%

## 2.2. Caracterização da fibra de coco, látex (NR-borracha natural) e dextrana solúvel.

A fim de fornecer as características específicas ao látex, utilizou-se a fibra de coco e a dextrana. Avaliamos as características de cada um dos componentes e também dos compósitos na proporção descrita na amostra.

## 2.3. Análise Termogravimétrica (TGA)

### 2.3.1. TGA com atmosfera de nitrogênio

Os dados de TGA foram obtidos em uma balança termogravimétrica da marca SEIKO TG/DTA 6200, modelo EXSTAR 6000. As amostras foram aquecidas de 25°C a 700°C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, em uma atmosfera inerte de nitrogênio, com fluxo de 100 ml/min. As curvas foram confeccionadas no software Origin 6.0. Gráficos de TG com as DTG, representado nas Figura 1 a 4.

### 2.3.2 TGA com atmosfera oxidante

Os dados de TGA foram obtidos em uma balança termogravimétrica da marca Shimadzu, modelo DTG-60H. As amostras foram aquecidas de 25°C a 700°C, com



taxa de aquecimento de 10°C/min, em uma atmosfera oxidante de ar, com fluxo de 50 ml/min. As curvas foram confeccionadas no software Origin 6.0 e os gráficos de TGA com as DTG, representados nas Figuras 5 a 8.

#### 2.4. DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

Os dados de DSC foram obtidos em um calorímetro exploratório diferencial da marca SEIKO, modelo EXTAR SII DSC-6220. As amostras foram aquecidas de 25°C a 600°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min, em atmosfera inerte de nitrogênio, com fluxo de 100 ml/min. As curvas foram confeccionadas no software Origin 6.0, os gráficos de DSC estão representados nas Figuras 9 e 10.

#### 2.5 FTIR (Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier)

O espectrômetro utilizado foi de marca Shimadzu, modelo IR Prestige-21, no modo de reflexão atenuada (ATR), na faixa espectral de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ . As curvas foram confeccionadas no software Origin 6.0 e os gráficos de FTIR estão representados nas Figuras 11 e 12.

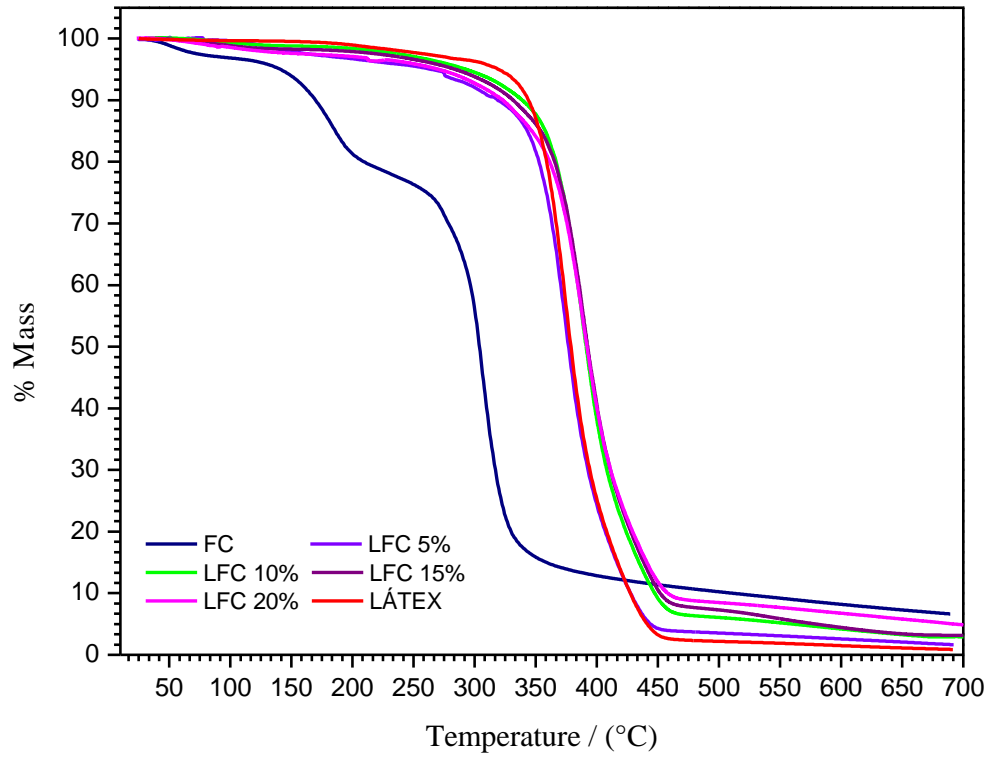
## 2.6 Tração

Os testes foram conduzidos em máquina de ensaio universal, marca EMIC, com velocidade de 1 cm/min. Gráficos de tração estão representados nas Figura 13 a 16 e na tabelas 1 e 2.

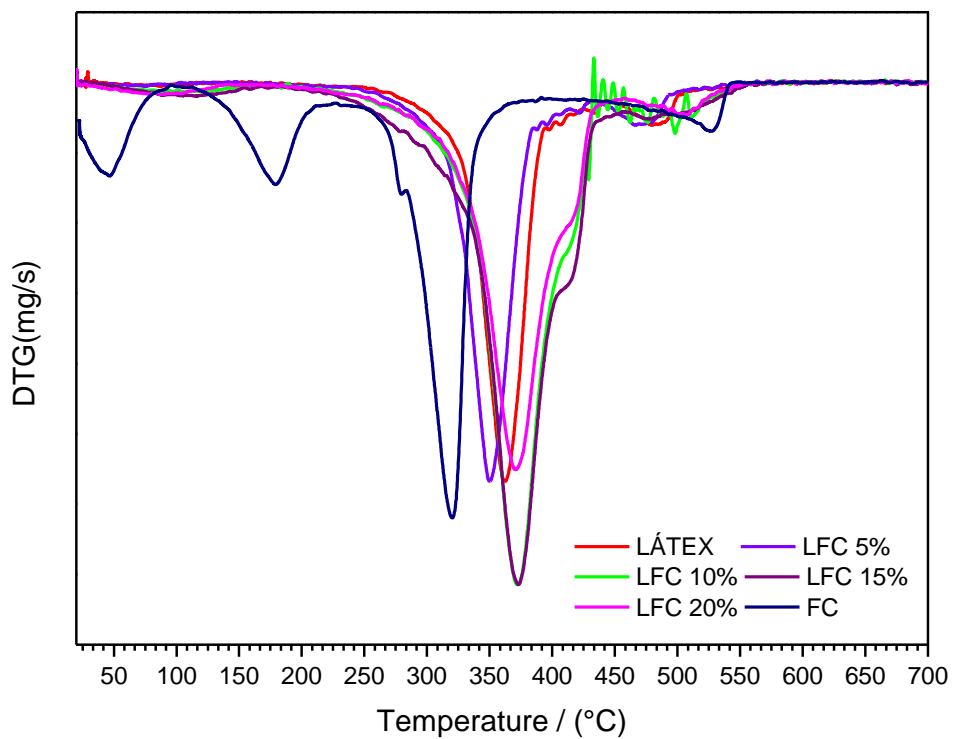
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. TGA com atmosfera oxidante de N<sub>2</sub> E O<sub>2</sub>

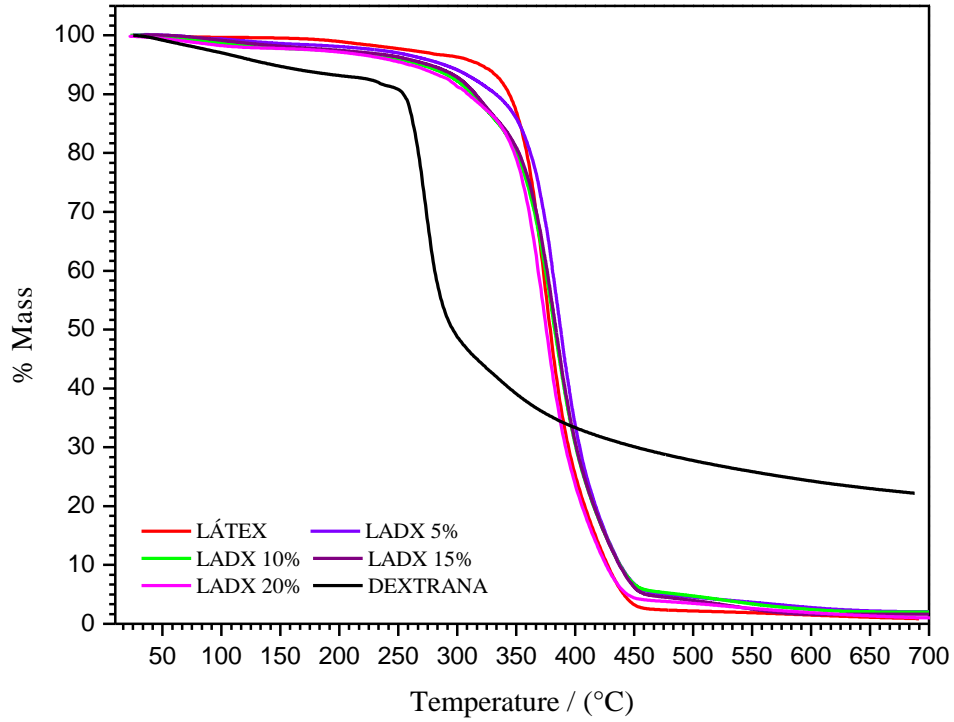
Neste estudo, a estabilidade térmica das amostras foi determinada pela análise termogravimétrica dos compósitos de látex com fibra de coco, látex com dextrana e também de cada um dos componentes isolados, para que fosse possível fazer uma interpretação entre as amostras. As curvas nos termogramas de TG/DTG das amostras dos compósitos (látex + dextrana e fibra de coco) e do látex mostraram que são termicamente estáveis até cerca de 280°C e perdem 90% da sua massa na faixa entre 280°C e 450°C. O processo de decomposição inicia a partir de 450°C e ocorre em uma única etapa. Os valores de TG observados estão dentro da faixa de valores encontrados na literatura (Zhou et al., 2014; Cheng et al., 2014; Ho, 2000; Nawamawat et al., 2011; Che et al., 2012; Laitinen et al., 2012;).



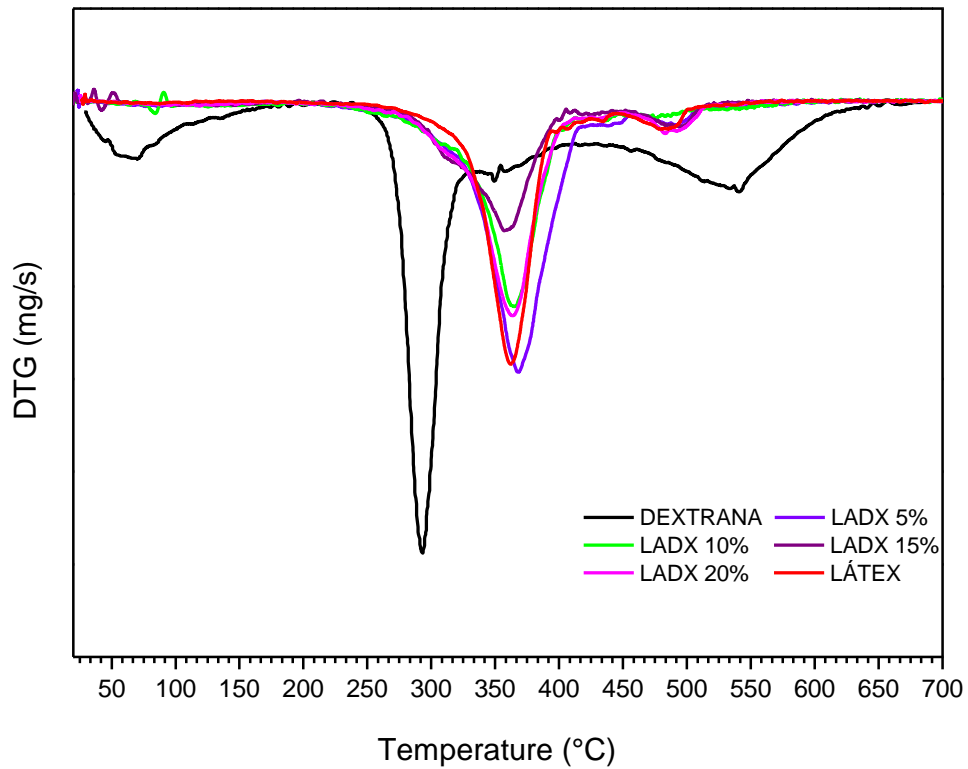
**Figura 1** – Curvas de TGA das amostras: LATEX, FC, LFC 5%, LFC 10%, LFC 15% e LFC 20%, sob atmosfera de  $N_2$ .



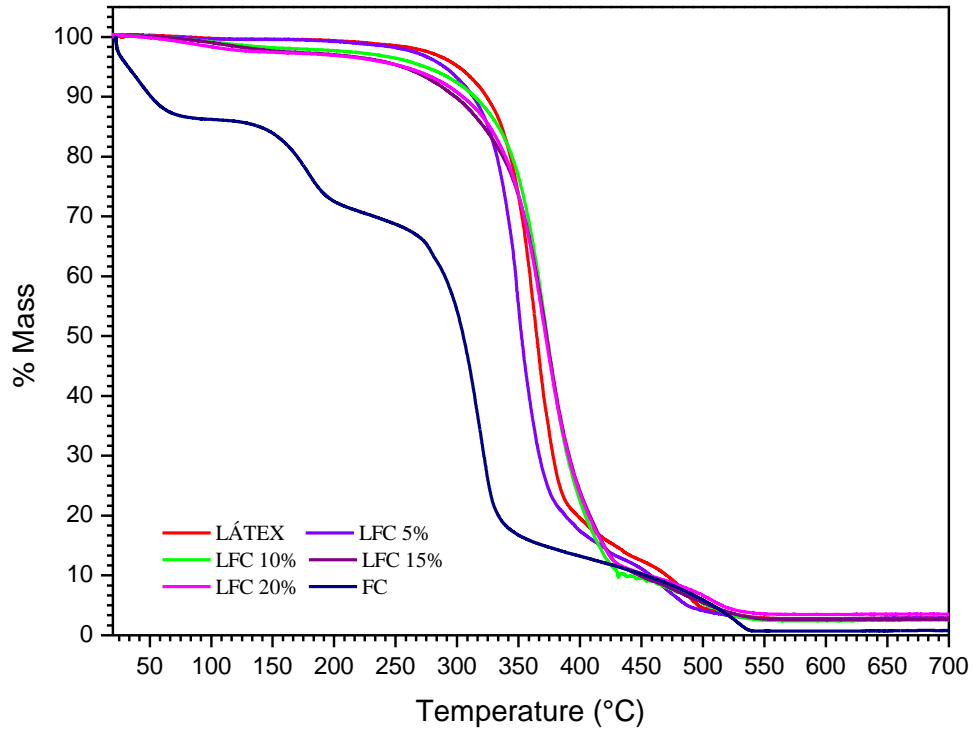
**Figura 2** – Curvas de dTGA das amostras: LATEX, FC, LFC 5%, LFC 10%, LFC 15% e LFC 20%, sob atmosfera de  $N_2$ .



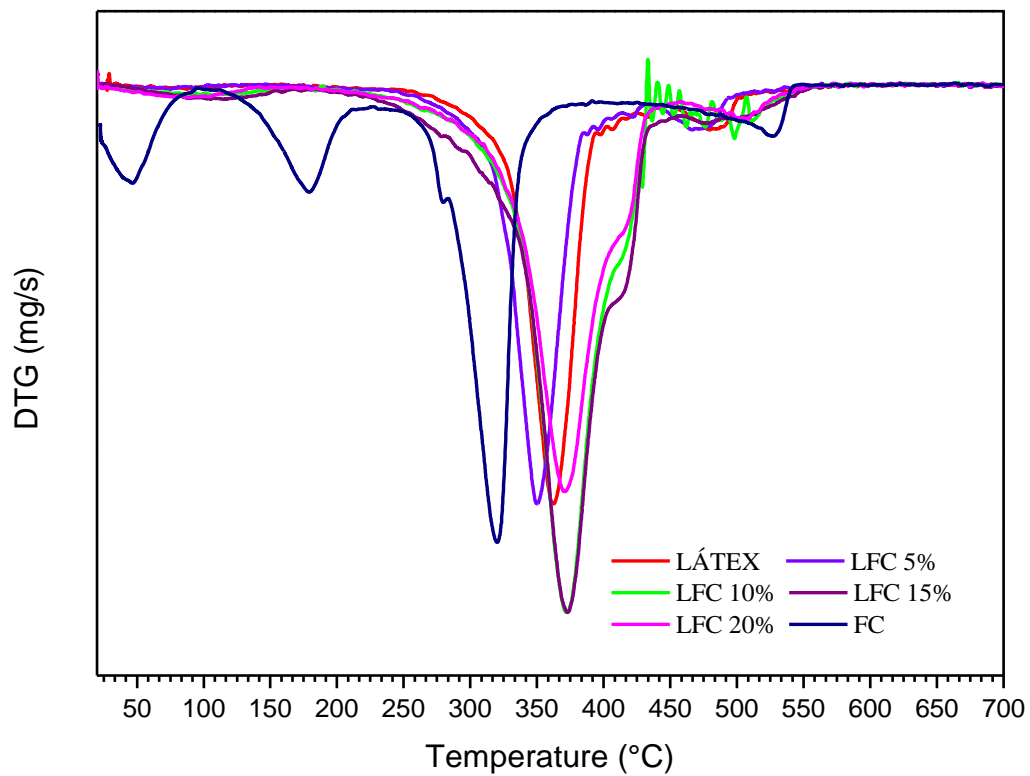
**Figura 3** – Curvas de TGA das amostras LÁTEX, DEXTRANA, LADX 5%, LADX 10%, LADX 15% e LADX 20%, sob atmosfera de N<sub>2</sub>.



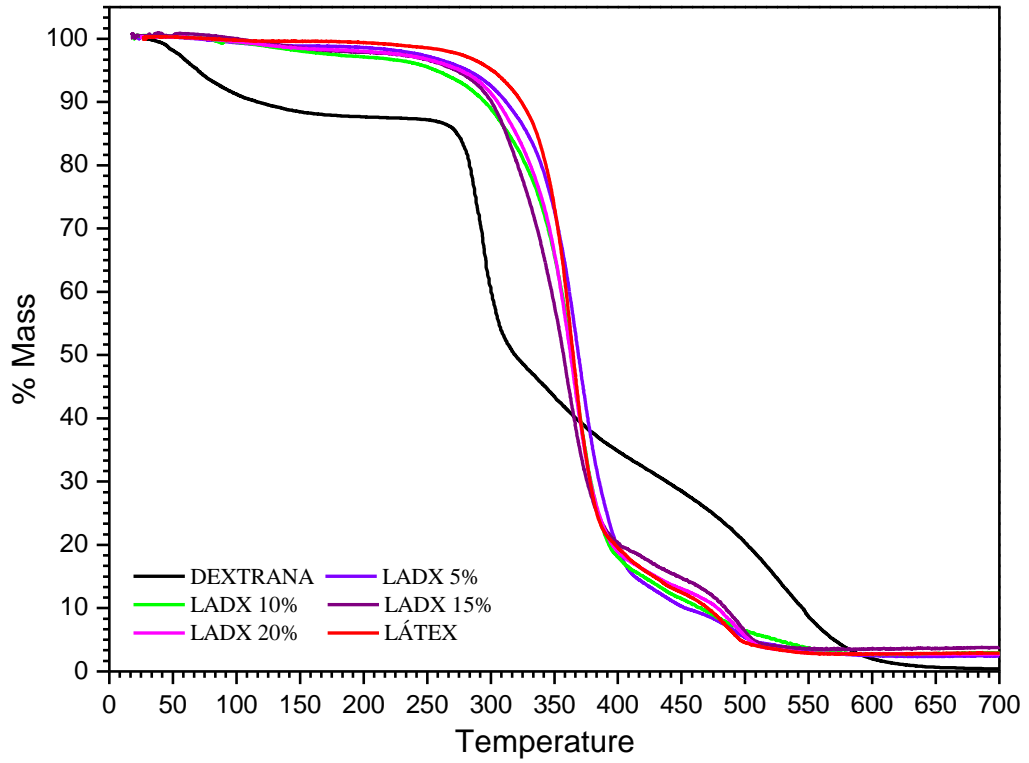
**Figura 4** – Curvas de dTGA das amostras LÁTEX, DEXTRANA, LADX 5%, LADX 10%, LADX 15% e LADX 20%, sob atmosfera de N<sub>2</sub>.



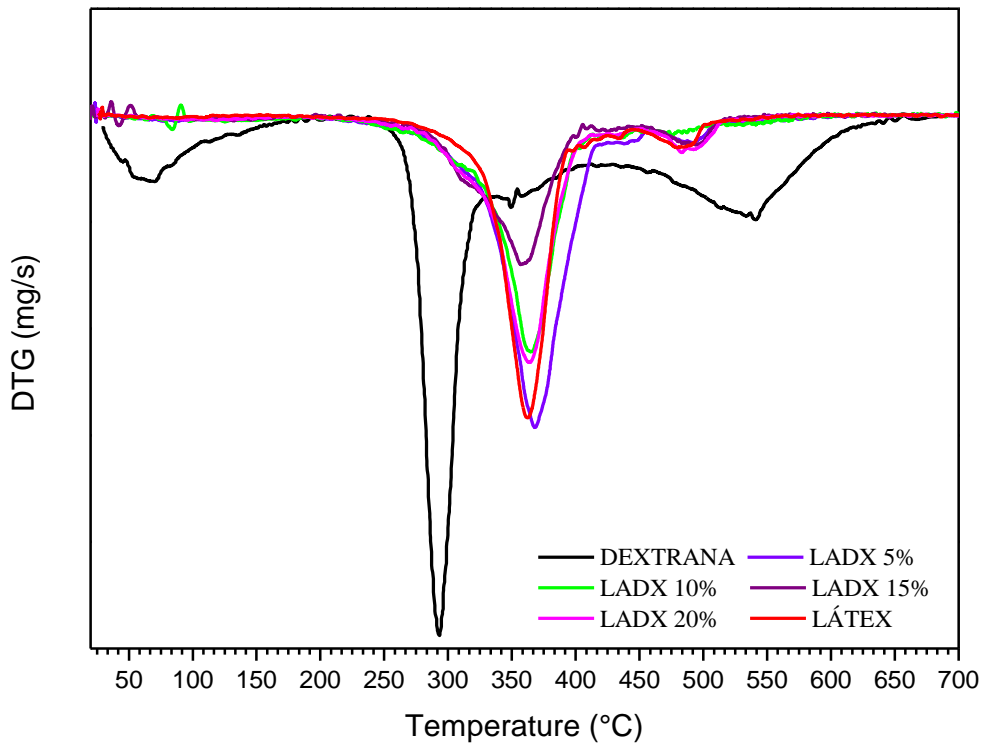
**Figura 5** – Curvas de TGA das amostras: LÁTEX, FC, LFC 5%, LFC 10%, LFC 15% e LFC 20%, sob atmosfera de  $O_2$ .



**Figura 6** – Curvas de dTGA das amostras: LÁTEX, FC, LFC 5%, LFC 10%, LFC 15% e LFC 20%, sob atmosfera de  $O_2$ .



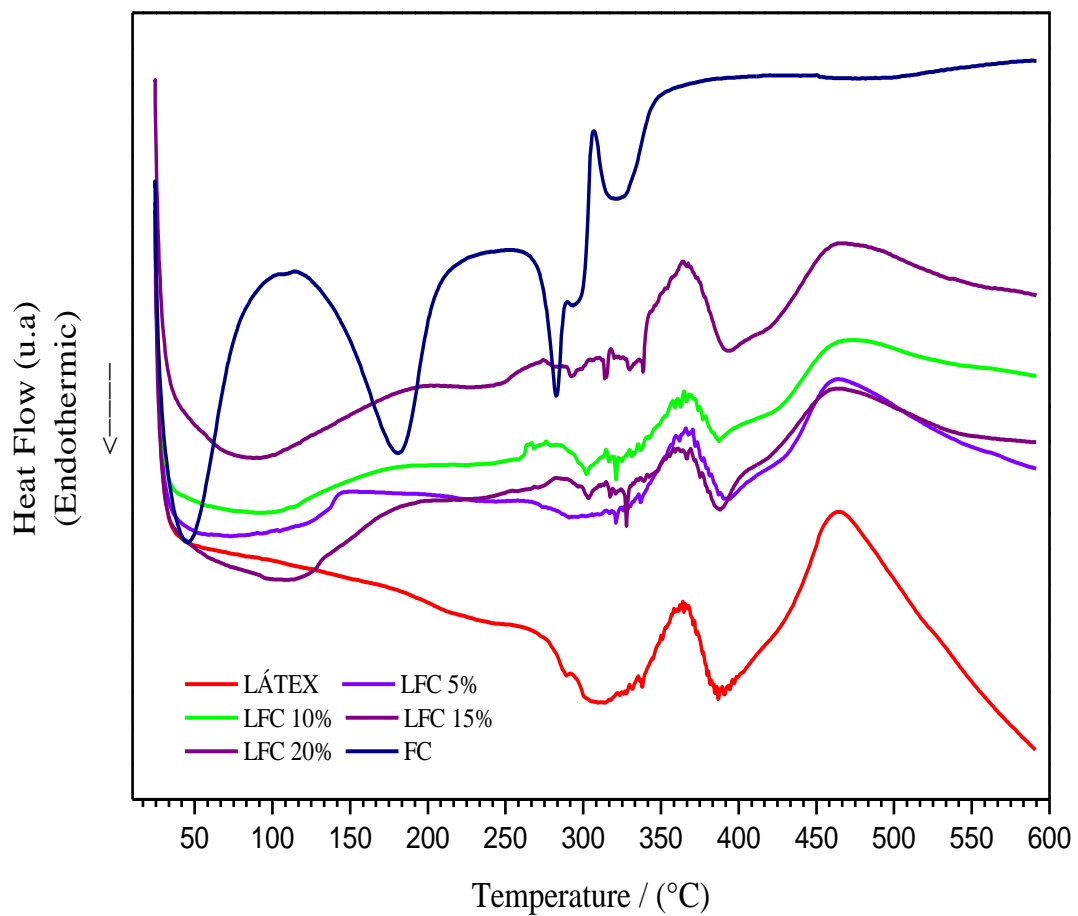
**Figura 7** – Curvas de TGA das amostras LÁTEX, DEXTRANA, LADX 5%, LADX 10%, LADX 15% e LADX 20%, sob atmosfera de O<sub>2</sub>.



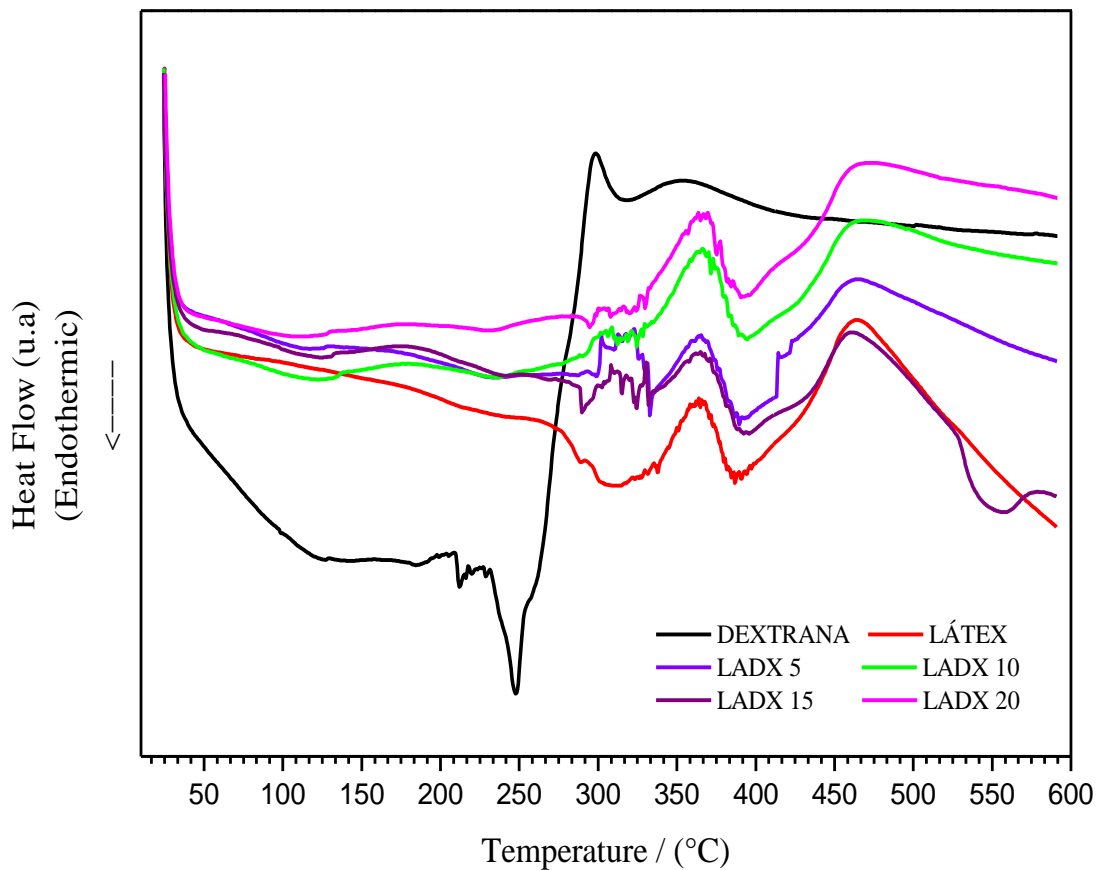
**Figura 8** – Curvas de dTGA das amostras LÁTEX, DEXTRANA, LADX 5%, LADX 10%, LADX 15% e LADX 20%, sob atmosfera de O<sub>2</sub>.

### 3.2 DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

A estabilidade térmica das amostras foi estudada através de ensaios de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e os gráficos 9 e 10 sugerem que a quantidade de fibra adicionada foi pouca para influenciar grandes mudanças. O gráfico do látex continuou predominante em todas as amostras, provavelmente cobriu muito as fibras, mostrando que as variações são similares entre os compostos.



**Figura 9** – Gráfico da curva de DSC das amostras LATEX, FC, LFC 5%, LFC 10%, LFC 15% e LFC 20%.



**Figura 10** – Gráfico da curva de DSC das amostras LÁTEX, DEXTRANA, LADX 5%, LADX 10%, LADX 15% e LADX 20%, sob atmosfera de O<sub>2</sub>.

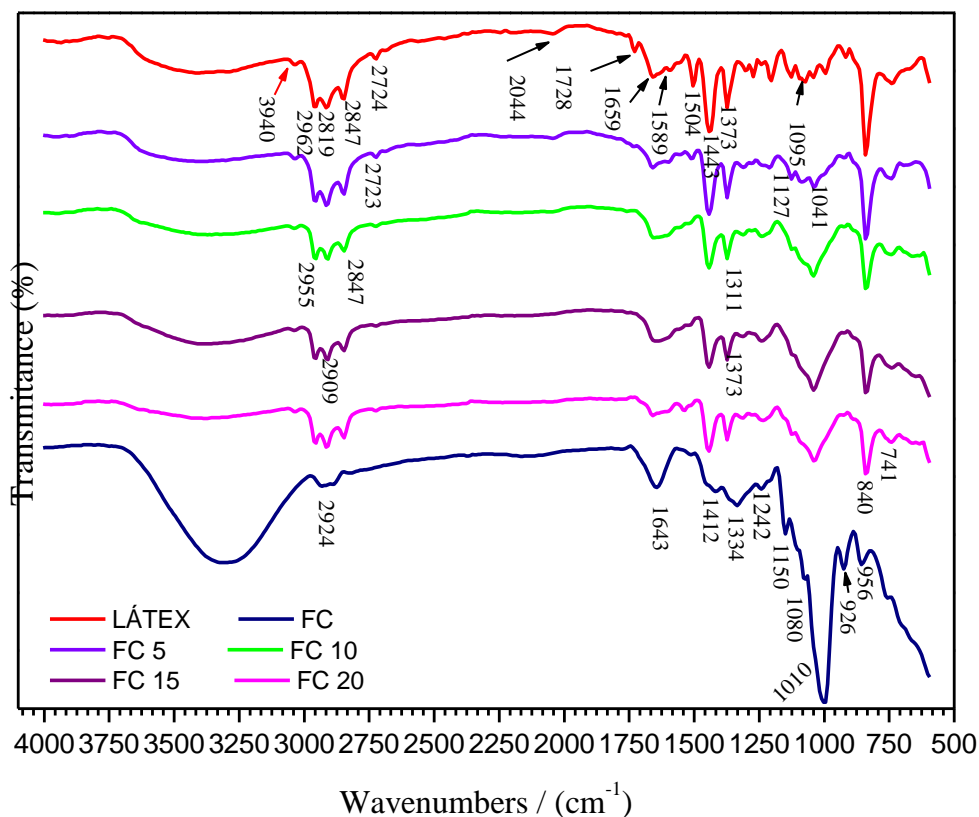
### 3.3. FTIR (Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier)

A Figura 11 apresenta espectros de FTIR de látex e do composto de látex com fibra de coco nas diferentes proporção da fibra de coco. As atribuições correspondentes às principais bandas são: região de  $3000\text{cm}^{-1}$  aparece apenas no espectro de fibra de coco, estiramento correspondente à hidroxila e na região de  $2960\text{cm}^{-1}$  banda de estiramento da ligação C-H. Em todas as amostras, na região de  $2900$  a  $2850\text{cm}^{-1}$ , encontra-se o estiramento do grupo metila, na região  $1540\text{cm}^{-1}$ ,

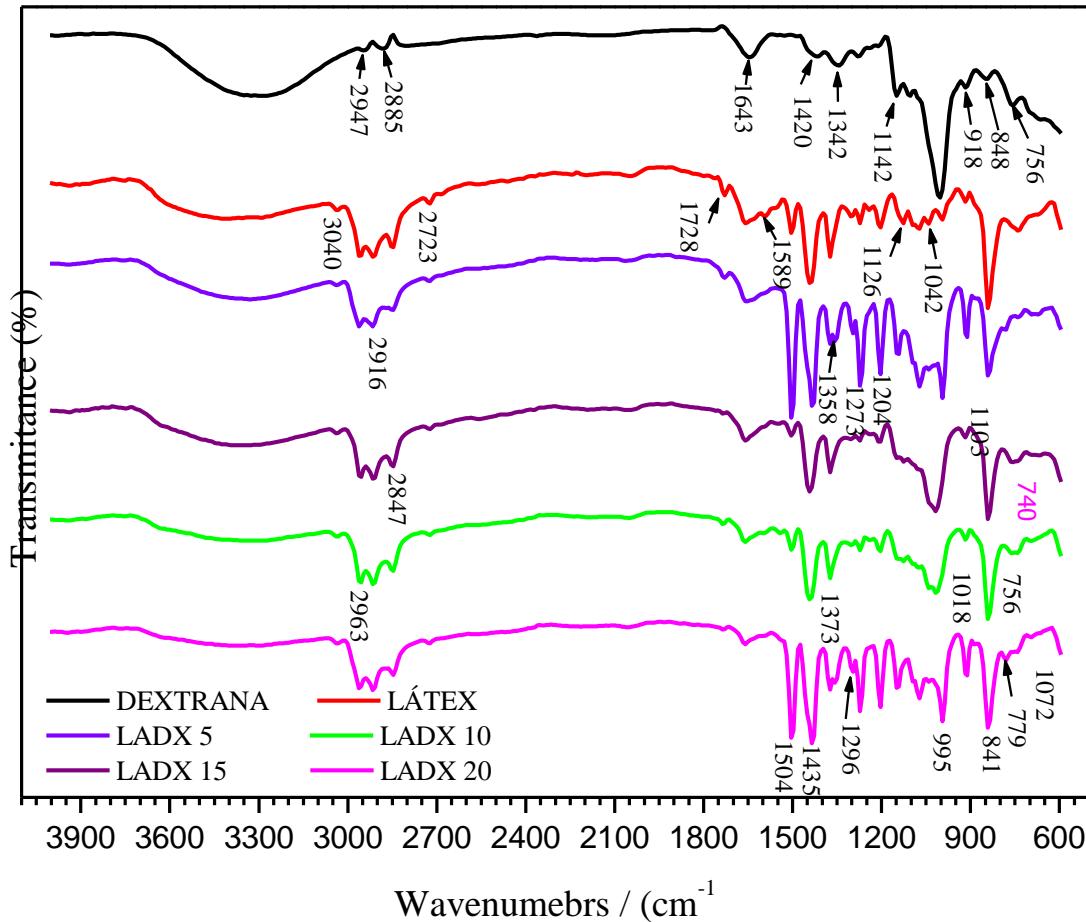


observa-se um estiramento da ligação C=C (Rúvolo Filho, 1986; Marinho, 1992; Dall'Antonia, 2009).

A figura 12 apresenta espectros de FTIR de dextrana e do composto de látex nas diferentes proporções da dextrana. As atribuições correspondentes às principais bandas são: na região de 2900 a 2850  $\text{cm}^{-1}$ , encontra-se o estiramento do grupo metila, na região 1540  $\text{cm}^{-1}$  observa-se um estiramento da ligação C=C. A dextrana apresentou uma banda de absorção intensa na região de 3413  $\text{cm}^{-1}$ , referente à vibração de alongamento das ligações dos grupos hidroxila (O-H), indicando a presença de um composto polihidroxilado (LIU et al., 2007). As bandas na região de 2920  $\text{cm}^{-1}$  e 1645  $\text{cm}^{-1}$  são devido às vibrações de estiramento das ligações C-H (SHUKLA, et al, 2011; Majumder, et al, 2009; SHINGEL, K. I. 2002; JEANES, A. et al. 1954)



**Figura 11** – Espectros na região do infravermelho (600-4000  $\text{cm}^{-1}$ ) das amostras de LATEX, FC, LFC 5%, LFC 10%, LFC 15% e LFC 20%.



**Figura 12** – Espectros na região do infravermelho (600-4000 cm<sup>-1</sup>) das amostras de LÁTEX, DEXTRANA, LADX 5%, LADX 10%, LADX 15% e LADX 20%.

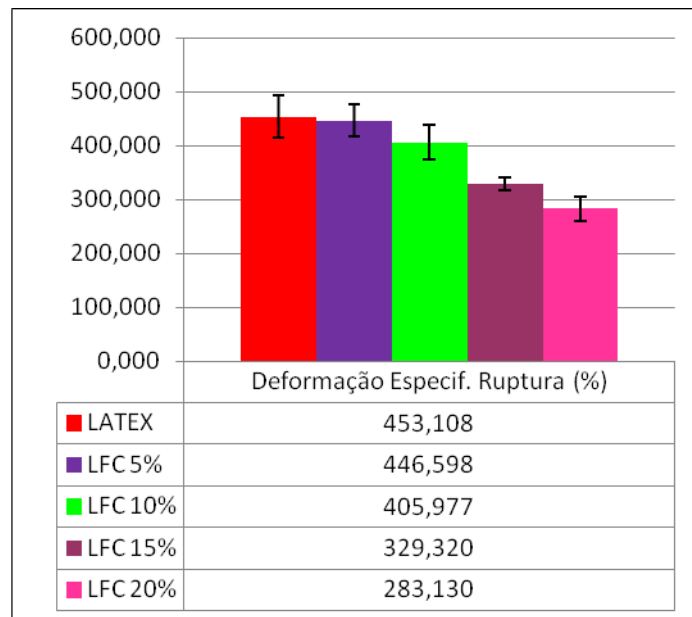
### 3.4 Tração

São apresentados os valores de tensão na ruptura ( $\sigma$ ), módulo elástico (E) e deformação na ruptura ( $\epsilon$ ) para todas as amostras estudadas, nas Figuras 13 a 16 e tabela 1 e 2. Há uma relação direta com o incremento, tanto de fibra de coco e dextrana, gerando aumento da tensão de ruptura, promovendo melhorias às propriedades. Fibras com alto teor de lignina, como é o caso das fibras de coco, são de excelente qualidade e flexíveis. Estudos com blendas contendo lignina ou derivados têm mostrado que, em alguns casos, as propriedades mecânicas e/ou térmicas do material polimérico são melhoradas com sua adição (Medhat M. 2013;

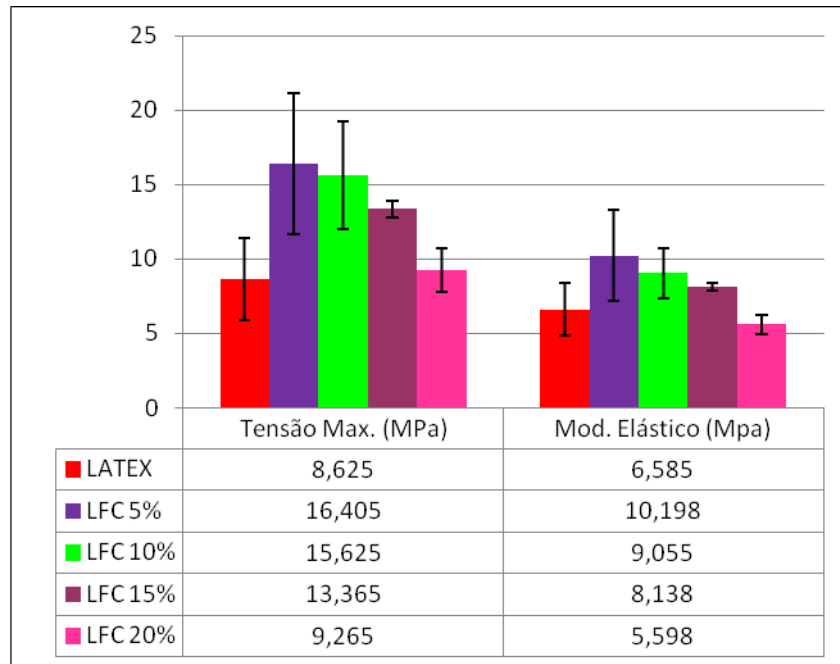
Karthik, 2013; Balarami, 2013; Sathishkumar, T. et al, 2013; Bellucci, F. S., et al. 2012. Moreno, Rogério, et al. 2013; Hemsri, S , 2012).

**Tabela 1** - Teor de fibras em massa ( $T_f$ ), tensão máxima ( $\sigma_{m\acute{a}x}$ ), deformação na ruptura ( $\epsilon_{rup.}$ ) e módulo elástico na deformação de 50% ( $E$ ), amostras de LATEX, FC, LFC 5%, LFC 10%, LFC 15% e LFC 20%.

$T_f$ (%)	$\sigma_{m\acute{a}x}$ (MPa)	$\epsilon_{rup.}$ (%)	$E$ (MPa)
<b>LÁTEX</b>	<b>8,625 ± 2,7</b>	<b>453,108 ± 39,5</b>	<b>6,585 ± 1,8</b>
<b>LFC 5%</b>	<b>16,405 ± 4,8</b>	<b>446,598 ± 29,4</b>	<b>10,198 ± 3,1</b>
<b>LFC 10%</b>	<b>15,625 ± 3,6</b>	<b>405,978 ± 32,8</b>	<b>9,055 ± 1,7</b>
<b>LFC 15%</b>	<b>13,365 ± 0,6</b>	<b>329,320 ± 11,6</b>	<b>8,138 ± 0,3</b>
<b>LFC 20%</b>	<b>9,265 ± 1,5</b>	<b>283,130 ± 23,0</b>	<b>5,598 ± 0,6</b>



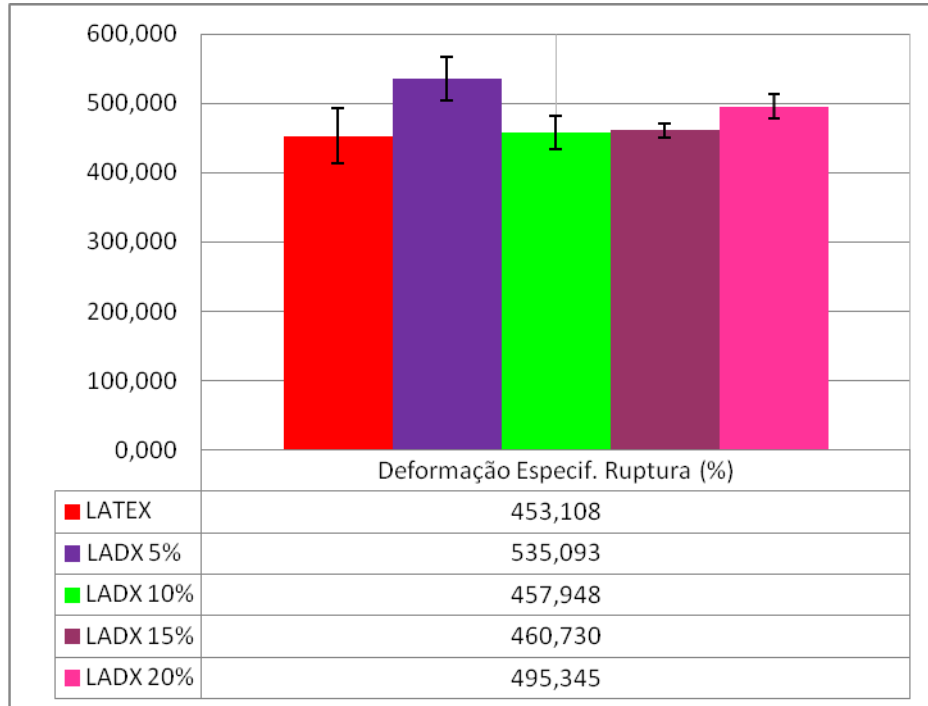
**Figura 13** – Deformação na ruptura das amostras de LATEX, FC, LFC 5%, LFC 10%, LFC 15% e LFC 20%.



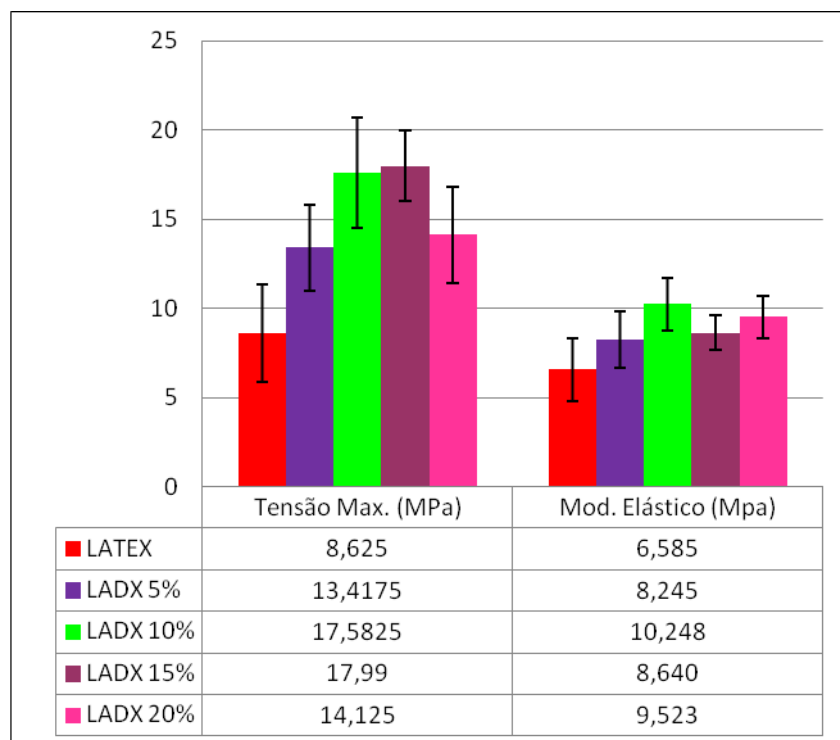
**Figura 14** – Módulo Máxima e Módulo Elástico das amostras de LATEX, FC, LFC 5%, LFC 10%, LFC 15% e LFC 20%.

**Tabela 2** - Teor de fibras em massa ( $T_f$ ), tensão máxima ( $\sigma_{\text{máx}}$ ), deformação na ruptura ( $\epsilon_{\text{rup.}}$ ) e módulo elástico na deformação de 50% ( $E$ ), dos compósitos de LATEX, DEXTRANA, LADX 5%, LADX 10%, LADX 15% e LADX 20%.

$T_f$ (%)	$\sigma_{\text{máx.}}$ (MPa)	$\epsilon_{\text{rup.}}$ (%)	$E$ (MPa)
<b>LÁTEX</b>	<b>8,625 <math>\pm</math> 2,7</b>	<b>453,108 <math>\pm</math> 39,5</b>	<b>6,585 <math>\pm</math> 1,8</b>
<b>LADX 5%</b>	<b>13,417 <math>\pm</math> 2,4</b>	<b>535,093 <math>\pm</math> 31,2</b>	<b>8,245 <math>\pm</math> 1,6</b>
<b>LADX 10%</b>	<b>17,582 <math>\pm</math> 3,1</b>	<b>457,948 <math>\pm</math> 23,7</b>	<b>10,248 <math>\pm</math> 1,5</b>
<b>LADX 15%</b>	<b>17,990 <math>\pm</math> 2,0</b>	<b>460,730 <math>\pm</math> 10,0</b>	<b>8,640 <math>\pm</math> 1,0</b>
<b>LADX 20%</b>	<b>14,125 <math>\pm</math> 2,7</b>	<b>495,345 <math>\pm</math> 18,0</b>	<b>9,523 <math>\pm</math> 1,2</b>



**Figura 15** – Deformação na ruptura das amostras de LATEX, DEXTRANA, LADX 5%, LADX 10%, LADX 15% e LADX 20%.



**Figura 16** – Módulo Máxima e Módulo Elástico das amostras de LATEX, DEXTRANA, LADX 5%, LADX 10%, LADX 15% e LADX 20%.

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que a adição, ao látex, de fibra de coco e dextrana como reforço proporcionou aos compósitos características de maciez e, ao mesmo tempo, resistência à mordida, para serem utilizados na proposta da placa miorrelaxante.

Nas análises de TGA demonstraram estabilidade térmica tal capaz de submeter o material á ciclos térmicos de esterilização.

Analisando estas curvas dos gráficos de DSC, conclui-se que o comportamento das amostras em sua composição se mantém similar a do látex puro.

Os resultados dos testes de tração, como na literatura, mostram que a adição de fibras de coco e dextrana no compósito aumentam a resistência à tração, promovendo uma economia viável para a produção do produto final, já que as fibras possuem valor de mercado menor que o látex.

Em linhas gerais, pode-se concluir que os objetivos traçados para o presente trabalho foram alcançados com sucesso, pois foram desenvolvidos biocompósitos com alto teor de materiais obtidos de fontes renováveis

O trabalho permitiu confeccionar a placa miorrelaxante com compósitos a base de borracha natural com fibra de coco ou dextrana, a qual foi apresentada ao final dos trabalhos na forma de produto devidamente acabado e embalado. O

biocompósito foi confeccionado na sua íntegra com materiais naturais, renováveis e biodegradáveis.

## REFERÊNCIAS

AGUNSOYE J. OLUMUYIWA, TALABI S. ISAAC, SANNI O. SAMUEL. Study of Mechanical Behaviour of Coconut Shell Reinforced Polymer Matrix Composite. **Journal of Minerals and Materials Characterization and Engineering**. Vol.11 No.8, August 2012, PP. 774-779

BALARAMI REDDY T. Mechanical performance of green coconut fiber/hdpe composites. **Int. Journal of Engineering Research and Applications** ISSN : 2248-9622, Vol. 3, Issue 6, Nov-Dec 2013, pp.1262-1270.

BELLUCCI, F. S., et al. "Preparation and Structural Characterization of Vulcanized Natural Rubber Nanocomposites Containing Nickel-Zinc Ferrite Nanopowders." *Journal of nanoscience and nanotechnology* 12.3 (2012): 2691-2699.

BLEDZKI, A. K.; GASSAN, J. Composites reinforced with cellulose based fibers. 2 issue. [S.l.]: **Progress in Polymer Science**. 1999. 24 v, p. 221-274.

CORRADINI, ELISÂNGELA, et al. "Composição química, propriedades mecânicas e térmicas da fibra de frutos de cultivares de coco verde." *Revista Brasileira de Fruticultura* 31.3 (2009): 837-846.

DA RÓZ, A. L. O futuro dos plásticos: biodegradáveis e fotodegradáveis. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, p. 4-5, 2003.

DALL'ANTONIA, A. C. et al. *Borracha natural formulada e vulcanizada dos clones: GT 1, IAN 873, PB 235 e RRIM 600*. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 19, nº 1, p. 63-71, 2009.

GALIANI, P. D., MALMONGE, J. A., SANTOS, D. P., MALMONGE, L. F., Avaliação de Clones de Borracha Natural Crua por Ensaio Padrão e Análise Dinâmico-Mecânica, **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 17, nº 2, p. 93-97, 2007.

HASMA, H., Lipids Associated with Rubber Particles and Their Possible Role in Mechanical stability of latex concentrates. **Journal of Natural Rubber Research**. V.62, p. 105-114, 1991.

HEMSRI, S ; Grieco, K ; Asandei, AD ; Parnas, R. S. Wheat gluten composites reinforced with coconut fiber. **Composites Part A-Applied Science And Manufacturing**, 2012 Jul, Vol. 43(7), pp.1160-1168

JEANES, A. et al. Characterization and Classification of Dextrans from Ninety- six Strains of Bacteria. *Journal Amer. Chem. Soc.*, p. 5041-5052, 1954.

KARTHIK, M.R.P. and SARAVANAN. M.R.N., Comparison of Natural Frequency and Mechanical Properties of Natural Fiber and Synthetic Fiber Composite Plates- **International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT)**- Vol. 2 Issue 11, November – 2013.

MAJUMDER, AVISHEK, ANGAD SINGH, AND ARUN GOYAL. "Application of response surface methodology for glucan production from *Leuconostoc dextranicum* and its structural characterization." *Carbohydrate Polymers* 75.1 (2009): 150-156.

MARINHO, J. R. D. Microestrutura de cis-poliisopreno de Látices Naturais. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil (1992).

MEDHAT M. HASSAN, NAGWA A. BADWAY, MONA Y. ELNAGGAR, EL-SAYED A. HEGAZY. Thermo-mechanical properties of devulcanized rubber/high crystalline polypropylene blends modified by ionizing radiation. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. Volume 19, Issue 4, 25 July 2013, Pages 1241–1250



MORENO, ROGÉRIO, et al. "Monitoring the thermal properties of natural rubbers from new clones: IAC 301 and IAC 303." *Polímeros* 23.5 (2013): 649-653.

PAULO, ELINALVA M. et al.; Production, extraction and characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2. **Strain Anais da Academia Brasileira de Ciências**, June 2012, Vol.84(2), pp.495-507.

PEREIRA, F. S. G. *Polímeros: Fundamentos científicos e tecnológicos*. Instituto Federal de Educação, **Ciência e Tecnologia de Pernambuco**, Recife, 2009. p. 107.

SHUKLA, R. et al. Insoluble Dextran Produced by *L. mesenteroides* with Maltose, *Food Technol. Biotechnol.* 49 (3) 291–296 (2011)

ROSA, M. de F.; BEZERRA, F. C.; CORREIA, D.; SANTOS, F. J. DE S.; ABREU, F. A. P. de; FURTADO, A. A. L.; BRÍGIDO, A. K. L.; NORÕES, E. R. DE V. **Utilização da casca de coco como substrato agrícola**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2002. 24 p.

ROUT, J.; MISRA, M.; TRIPATHY, S. S.; NAYAK, S. K.; MOHANTY, A. K. The influence of fibre treatment on the performance of coir-polyester composites. **Composites Science and Technology**, Barking, v.61, n.9, p.1303-1310, 2001a.

ROUT, J.; TRIPATHY, S. S.; NAYAK, S. K.; MISRA, M.; MOHANTY, A. K. Scanning electron microscopy study of chemically modified coir fibers. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v.79, n.7, p.1169-1177, 2001b.

ROZMAN, H. D.; TAN, K. W.; KUMAR, R.N.; ABUBAKAR, A.; ISHAK, Z. A. M.; ISMAIL, H. The effect of lignin as a compatibilizer on the physical properties of coconut fiber-polypropylene composites. **European Polymer**, New York, v.36, n.7, p.1483-1494, 2000.

RÚVOLO FILHO, A. *Físico-Química de Filmes de Borracha Clorada*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil (1986).

SATHISHKUMAR, TP ; NAVANEETHAKRISHNAN, P ; SHANKAR, S; RAJASEKAR, R; RAJINI, N. Characterization of natural fiber and composites – A review. **Journal of Reinforced Plastics and Composites**, 2013, Vol.32(19), pp.1457-1476

SEYMOUR F. R., AND KNAPPSTRUCTURAL R. D.; Analysis of dextrans, from strains of leuconostoc and related genera, that contain 3-&cc-d-glucosylated a-d-glucopyranosyl residues at the branch points, or in consecutive, linear positions. **Carbohydrate Research**, 8 1 (1980) 105-129.

SHINGEL, K. I. Determination of structural peculiarities of dextran, pullulan and c-irradiated pullulan by Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 337, p. 1445–1451, 2002.

SILVA, R. V.; SPINELLI, D.; BOSE FILHO, W. W.; CLARO NETO, S.; CHIERICE, G. O.; TARPANI, J. R. Fracture toughness of natural fibers/castor oil polyurethane composites. **Composites Science Tecnology**, Barking, v.66, n.10, p.1328-1335, 2006.

### 4.3. PATENTE: PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO INSOLÚVEL

#### 1. Campo da invenção

5           A presente invenção descreve a síntese de um exopolissacarídeo utilizando a enzima dextranasacarase produzida por *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Mais especificamente, descreve a síntese de dextrana, principalmente de dextrana insolúvel, passível de ser utilizada em diversas aplicações industriais, como por exemplo na síntese ou na blenda de um polímero  
10 para ser utilizado em qualquer aparelho intra-oral, na função de moldagem odontológica ou qualquer outro uso.

#### 2. Estado da técnica

15           A dextrana é um polissacarídeo de glicose de origem bacteriana. Com fórmula empírica  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , esse exopolissacarídeo (EPS) é formado por um esqueleto contendo unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosil unidas por ligações  $\alpha(1\rightarrow6)$ . Ramificações ao longo da cadeia são introduzidas por ligações do tipo  $\alpha(1\rightarrow4)$ ,  $\alpha(1\rightarrow3)$  e  $\alpha(1\rightarrow2)$  (Seymour, F. R. & Knapp, R. D. Structural analysis of dextrans,  
20 from strains of leuconostoc and related genera, that contain 3-O- $\alpha$ -d-glucosylated  $\alpha$ -d-glucopyranosyl residues at the branch points, or in consecutive, linear positions. *Carbohydr. Res.* 81, 105–129, 1980). A enzima responsável pela introdução dessas ramificações é a dextranasacarase, uma glucosiltransferase capaz de transferir resíduos glucosil da sacarose para polímeros de dextrana,  
25 liberando frutose.

As principais espécies de micro-organismos produtores de dextranasacarase são *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*. A dextrana sintetizada por *Leuconostoc mesenteroides* foi um dos primeiros biopolímeros produzidos em escala industrial, com importantes aplicações em biotecnologia, na medicina e nas indústrias química e de alimentos (Monchois, V., Willemot, R. M. & Monsan, P. Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 131–51, 1999).

A frequência e número de ramificações na cadeia de dextrana depende principalmente da cepa bacteriana e do tipo de dextranasacarase produzida por ela. As ramificações influenciam diretamente as propriedades físico-químicas desse polissacarídeo, incluindo sua solubilidade. A baixa solubilidade em água está associada à presença de alta porcentagem de ligações  $\alpha(1\rightarrow3)$  (Shukla, R. *et al.* Structural Characterization of Insoluble Dextran Produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 in the Presence of Maltose. *Food Technol. Biotechnol.* 49, 291–296, 2011).

A produção da dextrana pode ser realizada por métodos convencionais de fermentação ou método enzimático. No caso do método fermentativo, quando a bactéria *L. mesenteroides* é utilizada, o meio de cultura deve conter sacarose, uma fonte orgânica de nitrogênio, fatores de crescimento, traços de minerais e fosfato. As principais variáveis que devem ser controladas são o pH (em torno de 6.7-7.2), temperatura (25°C), a concentração inicial de sacarose (em geral 2%) e o tempo de fermentação (entre 24 e 48h). Após as primeiras 20h, o pH do meio cai para em torno de 5.0 devido à formação de ácidos orgânicos (Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W. & Vandamme, E. J. *Leuconostoc* dextranase and dextran: production, properties and applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*

80, 845–860, 2005). Esse pH é ideal para a produção de dextrana (Robyt, J. F. & Walseth, T. F. Production, purification, and properties of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydr. Res.* 68, 95–111, 1979). A dextrana pode então ser isolada do meio de cultura, por exemplo por precipitação  
5 com etanol e, posteriormente, purificada.

Como mencionado acima, as condições para produção da dextranasacarase pelo micro-organismo e da síntese da dextrana pela dextranasacarase são distintas. Assim, outra estratégia para a produção de dextrana é a utilização de métodos enzimáticos, separando em etapas distintas a  
10 produção da enzima e a síntese da dextrana e facilitando, portanto, o controle das condições ideais em cada uma das etapas. Dessa forma, após a produção de dextranasacarase pela bactéria, essa enzima é isolada do meio de cultura e então utilizada para a produção de dextrana em um meio livre de micro-organismos, na presença do açúcar, no caso sacarose ou maltose (Naessens, M., Cerdobbel, A.,  
15 Soetaert, W. & Vandamme, E. J. *Leuconostoc* dextransucrase and dextran: production, properties and applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 845–860, 2005).

Há na literatura um relato da produção de dextrana por *L. pseudomesenteroides* (Paulo, E. M. et al. Production, extraction and  
20 characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 strain. *An. Acad. Bras. Cienc.* 84, 495–508, 2012). No entanto, esse autores utilizam o método de fermentação, em que não se separa as etapas de produção da dextranasacarase e do EPS.

Por outro lado, existe ampla literatura no estado da técnica descrevendo a  
25 síntese de dextrana pela enzima dextranasacarase isolada de *L. mesenteroides*,

utilizando o método enzimático descrito acima. O pH do meio afeta tanto a síntese de dextrana como a estabilidade da enzima. O pH ótimo para a síntese é descrito como sendo em torno de 5.0-6.0. Mais especificamente, as seguintes faixas de pH ótimo foram relatadas: pH 5.0-5.5 (Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W. & Vandamme, E. J. Leuconostoc dextransucrase and dextran: production, properties and applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 845–860, 2005); pH 5.2-6.0 (Semyonov, D., Ramon, O., Shoham, Y. & Shimoni, E. Enzymatically synthesized dextran nanoparticles and their use as carriers for nutraceuticals. *Food Funct.* 5, 2463–74, 2014); pH 5.4 (Patel, S., Kothari, D. & Goyal, A. Purification and Characterization of an Extracellular Dextransucrase from *Pediococcus pentosaceus* Isolated from the Soil of North East India. *Food Technol. Biotechnol.* 49, 297–303, 2011); pH 6.0 (Cortezi, M., Monti, R. & Contiero, J. Temperature effect on dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B isolated from Alcohol and Sugar Mill Plant. *African Journal of Biotechnology* 4, 279–285, 2005); pH 5.5-6.0 (Tsuchiya, H. M. *et al.* The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* 64, 521–6, 1952); pH 5.5 (Santos, M., Teixeira, J. & Rodrigues, A. Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512, f. *Biochem. Eng. J.* 4, 177–188, 2000); pH 5.2 (Kaboli, H. & Reilly, P. J. Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 1055–1069, 1980; Kang, H.-K., Kim, Y.-M. & Kim, D.-M. Functional, genetic, and bioinformatic characterization of dextransucrase, DSRBCB4 gene in *Leuconostoc mesenteroides* B-1299CB4. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 1050–8, 2008); pH 5.0-5.2 (KOESELL, H. J. & TSUCHIYA, H. M. Enzymatic synthesis of dextran. *J.*

*Bacteriol.* 63, 293–5, 1952; Vettori, M. H. P. B., Blanco, K. C., Cortezi, M., Lima, C. J. B. & Contiero, J. Dextran: effect of process parameters on production, purification and molecular weight and recent applications. *Diálogos & Ciência* 2012, 171–186, 2012); pH 4.8-6.2 (Miller, A. W., Eklund, S. H. & Robyt, J. F. Milligram to gram scale purification and characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydr. Res.* 147, 119–33, 1986).

Já em relação às condições ótimas para a estabilidade de dextransacarase isolada de *L. mesenteroides*, são: pH 5.2 e 30°C para a cepa 5412 (Rabelo, M. C., Fontes, C. M. L. & Rodrigues, S. Stability Study of Crude Dextransucrase from *Leuconostoc citreum* NRRL B-742. *Indian J. Microbiol.* 51, 164–70, 2011) e pH 5.6-6.0 para a cepa NRRL B-512F (Kaboli, H. & Reilly, P. J. Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 1055–1069, 1980). No documento US2011129879 (Hybrid Genes and Enzymes of Glucanase and Dextransucrase and Processes for Preparing Isomalto-Oligosaccharides or Dextran Using the Same) os inventores afirmam apenas que a dextransacarase é estável em pH baixo.

Os seguintes trabalhos descrevem a dextransacarase como sendo mais ativa e estável na faixa de pH entre 5.0 e 5.5: Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W. & Vandamme, E. J. *Leuconostoc* dextransucrase and dextran: production, properties and applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 845–860, 2005; Alsop, R. in *Microbial Polysaccharides: Progress in Industrial Biology*, ed. Bushell, M. . 1–44, Elsevier, 1983; Kaboli, H. & Reilly, P. J. Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 1055–1069, 1980; Rhee, S. H. & Lee, C.-H. Properties of Dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from Sikhae. *J. Microbiol. Biotechnol.* 1,

176–181, 1991; Miller, A. W., Eklund, S. H. & Robyt, J. F. Milligram to gram scale purification and characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydr. Res.* 147, 119–33, 1986; Chludzinski, A. M., Germaine, G. R. & Schachtele, C. F. Purification and properties of dextransucrase from *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 118, 1–7, 1974; Purama, R. K. & Goyal, A. Screening and optimization of nutritional factors for higher dextransucrase production by *Leuconostocmesenteroides* NRRL B-640 using statistical approach. *Bioresour. Technol.* 99, 7108–14, 2008; Kobayashi, M., Mihara, K. & Matsuda, K. Dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F: Characterization of the enzyme bound to Sephadex gel. *Agricultural and Biological Chemistry* 50, 551–556, 1986; Erhardt, F. A., Kügler, J., Chakravarthula, R. R. & Jördening, H.-J. Co-immobilization of dextransucrase and dextransucrase for the facilitated synthesis of isomalto-oligosaccharides: Preparation, characterization and modeling. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 673–83, 2008; Monchois, V., Remaud-Simeon, M., Russell, R. R., Monsan, P. & Willemot, R. M. Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase, DSRS and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 465–72, 1997; Kang, H.-K., Kim, Y.-M. & Kim, D.-M. Functional, genetic, and bioinformatic characterization of dextransucrase, DSRBCB4 gene in *Leuconostoc mesenteroides* B-1299CB4. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 1050–8, 2008; Iliev, I. *et al.* Gluco-oligosaccharides synthesized by glucosyltransferases from constitutive mutants of *Leuconostoc mesenteroides* strain Lm 28. *J. Appl. Microbiol.* 104, 243–50, 2008; Olvera, C., Fernández-Vázquez, J. L., Ledezma-Candanoza, L. & López-Munguía, A. Role of the C-terminal region of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ in cell



anchoring. *Microbiology* 153, 3994–4002, 2007; Yalin, Y., Jin, L., Jianhua, W., Da, T. & Zigang, T. Expression and characterization of dextransucrase gene *dsrX* from *Leuconostoc mesenteroides* in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 133, 505–12, 2008; Yokoyama, I., Kobayashi, M. & Matsuda, K. Purification of the dimeric form of dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* strains NRRL B-1416 and B-1375. *Agricultural and Biological Chemistry* 49, 1385–1391, 1985; Kim, M. & Day, D. F. Optimization of oligosaccharide synthesis from cellobiose by dextransucrase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 148, 189–98, 2008; Erhardt, F. A., Stammen, S. & Jördening, H.-J. Production, characterization and, co-immobilization of dextranase from *Penicillium aculeatum*. *Biotechnol. Lett.* 30, 1069–73, 2008; Kobayashi, M. & Matsuda, K. Purification and characterization of two activities of the intracellular dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Biochim. Biophys. Acta* 397, 69–79, 1975; Kobayashi, M. & Matsuda, K. Purification and properties of the extracellular dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *J. Biochem.* 79, 1301–8, 1976; Ul Qader, S. A., Aman, A., Syed, N., Bano, S. & Azhar, A. Characterization of dextransucrase immobilized on calcium alginate beads from *Leuconostoc mesenteroides* PCSIR-4. *Ital. J. Biochem.* 56, 158–62, 2007; Nam, S. H. *et al.* Maximization of dextransucrase activity expressed in *E. coli* by mutation and its functional characterization. *Biotechnol. Lett.* 30, 135–43, 2008; Eom, H.-J., Seo, D. M. & Han, N. S. Selection of psychrotrophic *Leuconostoc* spp. producing highly active dextransucrase from lactate fermented vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 61–7, 2007; Huang, S., Lee, H. C. & Mayer, R. M. The purification and properties of dextransucrase from *Streptococcus sanguis* ATCC 10558. *Carbohydr. Res.* 74, 287–300, 1979.

Em um estudo realizado por Kang e colaboradores, o efeito do pH na síntese de dextrana pela dextranasacarase isolada da cepa B-1299CB4 de *L. mesenteroides* foi avaliado. Um aumento do pH levou à diminuição da síntese de dextrana. Por exemplo, no pH 7.5, a atividade foi cerca de 10% e a estabilidade da enzima aproximadamente 25% (Kang, H.-K., Kim, Y.-M. & Kim, D.-M. Functional, genetic, and bioinformatic characterization of dextransucrase, DSRBCB4 gene in *Leuconostoc mesenteroides* B-1299CB4. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 1050–8, 2008).

Diversos documentos de patente também descrevem a produção de dextrana a partir de dextranasacarase. A faixa de pH utilizado para a síntese enzimática varia em torno de 4.5-6.0. O documento JPH07274991 (Production of dextran), por exemplo, descreve a produção enzimática de dextrana utilizando dextranasacarase produzida pela cepa de *L. mesenteroides* NRRL-B-512. Nessa invenção, a enzima é adicionada a uma solução de sacarose e a produção de dextrana é realizada em pH 5.2 a 30°C por 24h.

No documento JPH08173178 (Production of dextran), as cepas utilizadas para síntese de dextrana são *L. mesenteroides* M209 (FERM BP-4903) e *L. mesenteroides* M898 (FERM BP-4904). Os inventores observaram que quando não foi feito um controle do pH da solução a maior produção de dextrana pela enzima dextranasacarase foi em pH 5.76 para a cepa M898 e pH 4.5 para a cepa M209.

No documento US2011076240 (Antifungal and Anti-Cariogenic Cellobio-Oligosaccharides Produced by Dextransucrase), os inventores utilizam a cepa de *L. mesenteroides* B-512 FMCM, um mutante constitutivo da cepa parental B512 F, para produção de dextranasacarase. As condições utilizadas para teste da

atividade enzimática são: meio contendo 100mM de sacarose em tampão de citrato de sódio 20mM, pH 5.2, 30°C. Esse mesmo pH é utilizado para as reações de transglicosilação de sacarose e celobiose pela dextranasacarase, utilizada pelos inventores para produzir cellobiopolisacarídeos com atividade anti-  
5 cariogênica.

No documento KR20110063277 (A manufacture method of health beverage that low sucrose and high content of oligosaccharides) os inventores utilizam dextranasacarase isolada de *L. mesenteroides* e a reação enzimática é realizada em pH 5.2 a 28°C. Esse mesmo pH e temperatura são utilizados em  
10 US2012289689 (Construction of new variants of dextransucrase dsr-s by genetic engineering) com uma dextranasacarase geneticamente modificada, começando a reação com 100g/l de sacarose em tampão acetato 50mM contendo 0.05 g/l de CaCl<sub>2</sub> e 1 unidade por ml de enzima.

No documento US5229277 (Process for the production of dextran polymers  
15 of controlled molecular size and molecular size distributions), a produção de dextrana de peso molecular definido é realizada a partir de uma cultura mista de *L. mesenteroides* e uma cepa mutante de *Lipomyces starkeyi*. O primeiro produz a dextranasacarase e o segundo a dextranase, enzima que reduz o tamanho dos polímeros de dextrana, permitindo o controle deste dependendo da temperatura e  
20 tempo de reação. A reação foi realizada em pH 5.1-5.3 e 28-30°C.

No documento US6242226 (Products containing a dextran composition obtained from culturing *L. mesenteroides* ssp. *cremoris*) a dextrana é produzida em pH 4.5 ou 5.5 utilizando a cepa de *L. mesenteroides* ssp. *cremoris*. Em  
US4877634 (Food product containing novel dried compositions with  
25 polysaccharides), o pH do meio contendo sacarose é mantido em torno de 6.0

para a produção de dextrana. Já em GB734369 (A process for the enzymatic production of dextran from saccharose), é utilizado o pH de 5.5, o mesmo pH usado em EP0459367 (Method for preparing an antitumor dextran). No documento CN102229970 (Method for producing dextran and fructose by recombinant enzyme process), o pH utilizado é 5.4 e em GB716660 (Production and fractionation of dextrans) é 4.8.

A síntese de dextranas insolúveis em água por *L. mesenteroides* não está tão bem descrita na literatura como a síntese de dextranas solúveis. Padmanabhan & Kim relatam a produção enzimática de dextrana insolúvel utilizando a enzima dextranasacarase isolada da cepa de *L. mesenteroides* B-523. A síntese é realizada em tampão acetato de sódio pH 5.4 contendo 130  $\mu$ M de CaCl<sub>2</sub> e 15% de sacarose (Padmanabhan, P. A. & Kim, D.-S. Production of insoluble dextran using cell-bound dextransucrase of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523. *Carbohydr. Res.* 337, 1529–33, 2002). Já Shukla e colaboradores descrevem a produção de dextrana insolúvel por *L. mesenteroides* NRRL B-1149 em tampão acetato de sódio 20mM (pH 5.4), contendo 0,01% de azida sódica (Shukla, R. *et al.* Structural Characterization of Insoluble Dextran Produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 in the Presence of Maltose. *Food Technol. Biotechnol.* 49, 291–296, 2011). Zahnley e Smith (1995) obtiveram dextrana insolúvel produzida por dextranasacarase de *L. mesenteroides* B-1355 em tampão contendo 50 mM de acetato de sódio (pH 5.2), 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mg de Tween 80 por ml, 200 mM NaCl e 0.02% de azida sódica (Zahnley, J. C. & Smith, M. R. Insoluble Glucan Formation by *Leuconostoc mesenteroides* B-1355. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1120–3, 1995).

A presente invenção pretende solucionar a necessidade de produção de dextrana insolúvel, a partir de micro-organismos de fácil obtenção, passível de utilização na fabricação de material para uso intra-oral. Ainda, tal dextrana deve ser capaz de resistir às condições intra-orais, sem que seja preciso acrescentar  
5 outro material para proporcionar durabilidade nessas condições.

Ao contrário do que foi relatado no estado da técnica, a enzima obtida na presente invenção não foi capaz de sintetizar dextrana insolúvel na faixa de pH ótima para síntese de dextrana (5.0-6.0) ou para a estabilidade da dextranasacarase (5.2-6.0). A síntese do exopolissacarídeo insolúvel foi obtida  
10 somente em pH 8.5. De acordo com o estado da técnica, não seria esperado a produção de dextrana insolúvel nesse pH.

### 3. Descrição detalhada da tecnologia

#### 15 3.1. Isolamento do micro-organismo *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2

Este trabalho foi realizado utilizando a linhagem nativa de *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2, cedida pela Bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Aplicada a Saúde Pública da Universidade Estadual de Feira de  
20 Santana-UEFS.

#### 3.2. Cultivo de *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 para produção de enzima com atividade de dextranasacarase

Um pré-inóculo foi preparado com *L. pseudomesenteroides* R2 em meio LACTOBACILLI MRS da marca ACUMEDIA (composição g/L: Peptona proteose 10g, Extrato de carne 10g, Extrato de levedura 5g, Dextrose 20g, Polisorbato 80 1g, Citrato de amônia 2g, Acetato de sódio 5g, Sulfato de magnésio 0.10g, Sulfato 5 de manganês 0.05g, Fosfato dipotássico 2g) nas condições de temperatura de incubação 28°C, tempo de incubação 24h e sem aeração.

Após 24 horas foi utilizado 1% do inóculo (1% da cultura ativa da linhagem de *L. pseudomesenteroides* R2 proliferada no caldo MRS), com densidade ótica 1,92 ± 0,01 em abs 600 nm com 108 UFC/ml, de acordo com leitura no 10 espectrofotômetro, confirmando o crescimento ideal do *L. pseudomesenteroides* R2.

As condições para o meio de produção foram: 35°C, sem agitação, por 24 horas. Após 24 horas esse meio de crescimento passa a ser denominado caldo fermentativo.

15

### 3.3. Purificação da enzima com atividade de dextranasacarase

Após 24 horas, 100 mL do caldo fermentativo foi centrifugado a 5.000 RPM por 20 minutos a 5°C. O sobrenadante obtido foi concentrado utilizando 20 membranas com limite de exclusão de 15 kDa submersa em uma solução de PEG 6000 10% (p/v). Esse processo foi realizado a 4°C por 4 horas, concentrando a amostra em 10x.

25

### 3.4. Avaliação da atividade enzimática de dextranasacarase

Para confirmar a atividade da enzima a partir do caldo fermentativo, foi avaliada a presença de atividade enzimática de dextranasacarase. Para tanto, 5 150 µl do material concentrado obtido no passo 3 foi adicionado a 150 µl de sacarose 10% diluída em solução tampão fosfato 20 mM pH 7,5. A mistura foi aquecida a 40°C por 30 min, em banho-maria. O produto formado foi adicionado a 300µl de ácido dinitrossalissílico (DNS), aquecendo a 95°C em banho-maria por 15 minutos. 3ml de água destilada foram acrescentados, e, após 10 homogeneização, foi realizada leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

### 3.5. Otimização da produção de exopolissacarídeos (EPS) pela dextranasacarase

Uma vez confirmada a presença de atividade enzimática, foi realizada a 15 otimização da produção de exopolissacarídeos. Para tanto, foram utilizadas diferentes concentrações de maltose (10%, 5% ou 0%) e pH (variando de 4,5 a 8,5). As combinações de maltose e pH testadas estão representadas na tabela 1.

20 **Tabela 1** – Variação na concentração de maltose e pH do meio de produção do EPS

AMOSTRA	MALTOSE %	pH
1	10	5,5
2	10	7,5
3	5	4,5
4	5	6,5
5	5	6,5
6	5	6,5
7	5	6,5
8	5	8,5
9	0	5,5
10	0	7,5

Assim, 600 µL da enzima concentrada como descrito no passo 3 foram incubados por 30 horas a 28°C sob agitação (180 RPM) em 30 mL de solução de acetato ou fosfato, a depender do pH, contendo 10% de sacarose, 0,01% de azida sódica e concentrações variadas de maltose.

### 3.6. Extração dos exopolissacarídeos produzidos

As soluções descritas no item 5, contendo os exopolissacarídeos produzidos com diferentes concentrações de maltose e pH, foram incubadas por 10 min em água em ebulição e centrifugadas por 20 min a 10.000 RPM. Os exopolissacarídeos no sobrenadante de cada amostra foram precipitados com álcool 65% (2 volumes de álcool para 1 de amostra) e reservado. Os pellets obtidos foram ressuspensos em água destilada e centrifugados por 20 minutos a 10.000 RPM. Esse processo foi repetido 3x para lavagem do material. Os exopolissacarídeos presentes no pellet final foram precipitado em álcool 65% (2:1).

Todas as amostras (obtidas a partir do sobrenadante ou do pellet) foram secadas em estufa a 40°C e pesadas após 72 horas.

20

#### **EXEMPLO 1 – Avaliação da solubilidade em solução aquosa dos exopolissacarídeos produzidos**

1 g de cada um dos exopolisacarídeos obtidos a partir dos pellets descritos no passo 6 foram colocados em frascos com 3 mL de água destilada,



dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo (DMSO) e mantidos sob agitação a 180 RPM por 24 horas.

Somente o pellet da amostra 8 (tabela 1) não dissolveu em nenhum dos solventes usados, apresentando a característica de um exopolissacarídeo insolúvel em solução aquosa. Essa amostra foi obtida a partir da incubação da dextranasacarase com 5% de maltose em pH 8,5. Em todas as outras condições utilizadas (variações da concentração de maltose e pH), foi obtido exopolissacarídeo solúvel.

#### 4. Reivindicações

1. Processo de produção de exopolissacarídeo insolúvel, caracterizado por utilizar dextranasacarase em meio contendo ao menos uma fonte de açúcar e pH ácido.
2. Processo de produção de exopolissacarídeo insolúvel, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela dextranasacarase ser isolada de *Leuconostoc pseudomesenteroides*.
3. Processo de produção de exopolissacarídeo insolúvel, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo pH do meio ser preferencialmente 7.5-8.5.
4. Processo de produção de exopolissacarídeo insolúvel, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela fonte de açúcar ser preferencialmente maltose ou sacarose.
5. Processo de produção de exopolissacarídeo insolúvel, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pela concentração de maltose ser preferencialmente 5% e a de sacarose ser preferencialmente 10%.
6. Exopolissacarídeo insolúvel, com característica de não dissolver nas substâncias D<sub>2</sub>O; DMSO; eter; álcool; H<sub>2</sub>O quente.

#### **4.4 PRODUTO: PLACA MIORRELAXANTE**

A placa miorrelaxante é colocada sobre os dentes e apresenta três funções principais: proteger os dentes de desgastes em pacientes que apresentam parafunção, como o bruxismo (hábito de ranger os dentes); aliviar as articulações temporomandibulares (localizadas em frente aos ouvidos) contra as forças excessivas que se formam durante a parafunção; e a de induzir o relaxamento da musculatura, o que ocorre em apenas alguns casos. Este produto foi produzido com a blenda desenvolvida no manuscrito 2 e descrita no item 2.16.

## 5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Em pesquisas futuras, são sugeridos os seguintes estudos:

- 1- Avaliação da interferência do pH ainda mais alto que o 8,5 na produção de dextrana insolúvel.
- 2- Avaliação da interferência da maltose, fazer um modelo de produção variando as proporções de maltose.
- 3- Otimização no procedimento de produção da dextrana insolúvel, para que seja verificada a possibilidade de produção maior que 3 g/l.
- 4- Avaliar as características dos compósito utilizando valores maiores que 20% de concentração na matriz polimérica (látex).
- 5- Realizar a Microscopia eletrônica de varredura nas misturas, para melhor avaliação das interações dos compósitos.
- 6- Avaliar os compósitos através do DRX- difração de Raios-X.
- 7- Desenvolver o produto “PROTETOR DE ESPORTE”, utilizando materiais fruto do manuscrito 2.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como foco principal a produção e caracterização de agentes de reforço e compósitos, para serem utilizados na confecção da placa miorrelaxante. Realizou-se a caracterização dos compósitos e avaliou-se as características mecânicas desses compósitos. Obteve-se um processo que foi patenteado, onde produziu a dextrana insolúvel com o pH de 8,5. Com o objetivo de criar um produto com características exigidas pelo mercado, simulou-se, utilizando o programa Comsol Multiphysics®, os compósitos e suas características às respostas mecânicas. Após a simulação, conseguiu-se observar necessidades de ajustes no design do produto, como o arredondamento das bordas internas. Observou-se respostas similares quanto aos compósitos. Devido aos valores de obtenção da matéria-prima, a melhor opção de material para confecção do produto por avaliação, neste trabalho, é o compósito de látex com fibra de coco a 20%.

O produto final é apresentado com a proposta de ser inserido ao mercado. Para isto, foi projetada a embalagem.

## REFERÊNCIAS

AGERON, B.; et al. Sustainable supply management: An empirical study. *International Journal of Production Economics*, 140.1, p. 168-182, 2012.

AHMED, R. Z., et al. Characterization of high molecular weight dextran produced by *Weissella cibaria* CMGDEX3. *Carbohydrate polymers*, 90.1, p. 441-446, 2012.

AKCELRUD, L. C. *Fundamentos da ciência dos polímeros*. Manole, São Paulo: p. 288, 2007.

ALMEIDA, S. R. de; et al. Meio Ambiente e Sacolas Plásticas: a atitude do cliente do varejo na cidade de São Paulo. *SEGET*, Dom Bosco, 1 ed., p. 1-15. 2008.

ALOÉ, F.; GONÇALVES, L.R.; AZEVEDO, A.; BARBOSA, R.C. Bruxismo durante o sono. *Rev Neurociências*. 2003;11(1):4-17.

AMAN, A., et al. Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1. *Carbohydrate Polymers*, 87.1, p. 910-915, 2012.

AQUINO, F. W.B; FRANCO, D. W. Molecular mass distribution of dextran in Brazilian sugar and insoluble deposits of cachaça. *Food chemistry*, 114.4, p. 1391-1395, 2009.

Bader G, Lavigne G. Sleep bruxism: an overview of an oromandibular sleep movement disorder. *Sleep Med Reviews*. 2000;4:27-43.

Barbosa TS, Miyakoda LS, Pocztaruk RL, Rocha CP. Temporomandibular disorders and bruxism in children and adolescence. Review of the literature. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2008;72:290-314.

BASHARI, M.; et al. Separation and characterization of dextran extracted from deteriorated sugarcane. *International journal of biological macromolecules*, 59, p. 246-254, 2013.

BESNAINOU, J; COULON; R. Life-cycle assessment: a system analysis. *Environmental Life-Cycle Assessment*. New York (NY): McGraw-Hill, 1996.

BRITO, R. P. de; BERARDI, P. C. Competitive advantage and sustainable supply chain management: a meta-analysis. *Revista de Administração de Empresas*, 50.2, p. 155-169, 2010.

BUKHARI, M. M., et al. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7 (4), p. 381-392, 2015.

CAI, R., et al. Screening, production, and characterization of dextranase from *Catenovulum* sp. *Annals of Microbiology*, 64.1, p. 147-155, 2014.

CAO, H.; et al. Biological actions of silver nanoparticles embedded in titanium controlled by micro-galvanic effects. *Biomaterials*, 32.3, p. 693-705, 2011.

CAPPELLE, S.; LACAZE, G.; WICK, M. Emerging fermentation technologies: Development of novel sourdoughs. *Food Microbiology*, 24, p. 155–160, 2007.

CASTELLANE, T. C. L.; et al. Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological and bioremediation applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, p. 515–522, 2015.

COPLIN, D.L.; COOK, D. Molecular-genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 3, p. 271-279, 1990.

Cortese SG, Biondi AM. Relationship between dysfunctions and parafunctional oral habits, and temporomandibular disorders in children and teenagers. *Arch Argent Pediatr*. 2009;107:34-8.

CORTEZI, M.; MONTI, R.; CONTIERO.J. Temperature effect on dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B isolated from Alcohol and Sugar Mill Plant. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 4 (3), pp. 279-285, March 2005.



DA RÓZ, A. L. O futuro dos plásticos: biodegradáveis e fotodegradáveis. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 13, p. 4-5, 2003.

DINIZ MB, SILVA RC, ZUANON ACC. Bruxismo na infância: um sinal de alerta para odontopediatras e pediatras. *Rev Paul Pediatr*. 2009;27(3):329-34.

DOLS, M., et al. Characterization of the Different Dextranucrase Activities Excreted in Glucose, Fructose, or Sucrose Medium by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Applied and environmental microbiology*, 64.4, p. 1298-1302, 1998.

DOLS, M., et al. Structural characterization of the maltose acceptor-products synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextranucrase. *Carbohydrate research*, 305.3, p. 549-559, 1997.

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature.

Classification of genera, 2012. Disponível: <http://www.bacterio.net/leuconostoc.html>, acesso em: 26/05/2015.

FALCONER, D. J., et al. Biosynthesis of dextrans with different molecular weights by selecting the concentration of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC dextranucrase, the sucrose concentration, and the temperature. *Carbohydrate research*, 346.2, p. 280-284, 2011.

GIRARD, E., and LEGOY, M-D. Activity and stability of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F in the presence of organic solvents. *Enzyme and microbial technology*, 24.7, p. 425-432, 1999.

GLAROS AG, FORBES M, SHANKER J, GLASS EG. Effect of parafunctional clenching on temporomandibular disorder pain and proprioceptive awareness. *Cranio*. 2000 Jul;18(3):198-204.

GUPTA, A. and KAMALAKAR, A. P. Immobilization and properties of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* culture, LM1. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 41.5, p. 399-407, 1995.

HADDAD, A. N.; CORRÊA, M. S. N. P.; FAZZI, R. Bruxismo em crianças. *Ver. Odontopediatr.*, v.3, n.2, p.91-8, abr.-jun., 1994.

IASEVOLI, G.; MASSI, M. The relationship between sustainable business management and competitiveness: research trends and challenge. *International Journal of Technology Management*. 58.1, p. 32-48, 2012.

JARDIM, N. S., et al. Gerenciamento integrado do lixo municipal. *Lixo municipal: manual de gerenciamento integrado 2*, p. 3-25, 2000.

JESIONOWSKI, T., et al. Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption*, 20.5-6, p. 801-821, 2014.

KABOLI, H., and PETER J. R. Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase. *Biotechnology and Bioengineering*, 22.5, p. 1055-1069, 1980.

KIM, D. and ROBYT, J. F. Properties and uses of dextransucrases elaborated by a new class of *Leuconostoc mesenteroides* mutants. *Progress in Biotechnology*, 12, p. 125-144, 1996.

KOBAYASHI; M., and MATSUDA; K. Characterization of the multiple forms and main component of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 614.1, p. 46-62, 1980.

KWON, T-H; AJO-FRANKLIN; J. B. High-frequency seismic response during permeability reduction due to biopolymer clogging in unconsolidated porous media. *Geophysics*, 78.6, p. 117-127, 2013

LEATHERS, T. D. Dextran. *Biopolymers Online*, 2002.

LOBBEZOO F, VAN DER ZAAG J, VAN SELMS MK, Hamburger HL, Naeije M. Principles for the management of bruxism. *J Oral Rehabil*. 2008 Jul;35(7):509-23.

MACEDO C.R. Bruxismo do sono. R Dental Press Ortodon Ortop Facial. mar/abr 2008;13(2):18-22.

MCINTYRE, A. P., et al. Reducing values: dinitrosalicylate gives over-oxidation and invalid results whereas copper bicinchoninate gives no over-oxidation and valid results. Carbohydrate research, 380, p. 118-123, 2013.

OGIER, J-C., et al. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus. International journal of food microbiology, 126.3, p. 286-290, 2008.

PADMANABHAN, P. A.; et al. Rheology and gelation of water-insoluble dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523. Carbohydrate Polymers, 53.4, p. 459-468, 2003.

PADMANABHAN, P.A.; KIM, D. S. Production of insoluble dextran using cell-bound dextransucrase of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523. Carbohydrate Research. 337, p. 1529-1533, 2002.

PATEL, S.; et al. Scale up of dextran production from a mutant of *Pediococcus pentosaceus* (SPAm) using optimized medium in a bioreactor. Brazilian Archives of Biology and Technology, 54.6, p. 1125-1134, 2011

PAUL, D. R.; NEWMAN, S. Polymer blends. Academic Press, London: p. 414, 1978.

PAULO, E. M.; et al. Production, extraction and characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 strain. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84.2, p. 495-508, 2012.

PEREIRA, C. A.; et al. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers in medical science*, 26.3, p. 341-348, 2011.

Pizzol KEDC, Carvalho JCQ, Konishi F, Marcomini SEM, Giusti JSM. Bruxismo na infância: fatores etiológicos e possíveis tratamentos. *Rev Odontol UNESP*. 2006;35(2):157-63.

PURAMA, R. K., and GOYAL, A. Dextranucrase production by *Leuconostoc mesenteroides*. *Indian Journal of Microbiology*, 45.2, p. 89-101, 2005.

PURAMA, R. K., and GOYAL, A. Effect of nutrients by one variable at a time (OVAT) approach on the dextranucrase production from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. *Internet J. Microbiol*, 5.1, 2008.

PURAMA, R. K., and GOYAL, A. Screening and optimization of nutritional factors for higher dextranucrase production by *Leuconostocmesenteroides* NRRL B-640 using statistical approach. *Bioresource technology*, 99.15, p. 7108-7114, 2008.

PURUSHE, S., et al. Biocatalytic potential of an alkalophilic and thermophilic dextranase as a remedial measure for dextran removal during sugar manufacture. *Bioresource technology*, 115, p. 2-7, 2012.

QUINTERO Y, RESTREPO CC, TAMAYO V, al e. Effect of awareness through movement on the head posture of bruxist children. *J Oral Rehab*. 2009;36:18-25.

RESTREPO C, GOMEZ S, MANRIQUE R. Treatment of bruxism in children: a systematic review. *Quintessence Int*. 2009 Nov- Dec;40(10):849-55.

RUGH JD, HARLAN J. Nocturnal bruxism and temporomandibular disorders. *Adv Neural*. 1988;49:329-41.

SABATIE, J., et al. The effect of synthesis temperature on the structure of dextran NRRL B 512F. *Carbohydrate polymers*, 9.2, p. 87-101, 1988.

SALAČ, J. Studium produkce dextranu kulturou *Leuconostoc garlicum* PR. 2013.

SANTO, A. A. E.; et al. Production of xanthan using sucrose, glycerin, vegetables leftovers in oil water effluent. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. S60-S61, 2011.

SANTOS, M., et al. Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512f. *Biochemical Engineering Journal*, 4.3, p. 177-188, 2000.

SETO, H., et al. Rheological properties of keto-sugars with high-density carbonyl groups. *Carbohydrate Polymers*, 80.4, p. 1183-1188, 2010.

SEURING, S.; MÜLLER, M. From a literature review to a conceptual framework for sustainable supply chain management. *Journal of cleaner production*, p. 16.15 2008.

SHAMALA, T. R.; PRASAD, M. S. *Proc. Biochem*, 30, p. 237–241, 1995

SHEIKHOLESLAM, A; HOLMGREN, K.; RIISI.; C. Therapeutic effects of the plane occlusal splint on signs and symptoms of craniomandibular disorders in patients with nocturnal bruxism. *Journal of Oral Rehabilitation*, v.20, p.473-82, 1993.

SHUKLA, R., et al. Structural characterization of insoluble dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 in the presence of maltose. *Food Technology and Biotechnology*, 49.3, p. 291-296, 2011.

SIMOES-ZENARI M, BITAR ML. Fatores associados ao bruxismo em crianças de 4 a 6 anos. *Pró Fono*. 2010;22(4):465-72.

SKILLMAN, L. C.; et al. The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development. *Journal of applied microbiology*, 85.S1, 1998.

SMITH, E. E. Biosynthetic relation between the soluble and insoluble dextrans produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *FEBS letters*, 12.1, p. 33-37, 1970.

SOARES, E. P.; NUNES, E. C. D.; SAIKI, M.; WEIBECK, W. Caracterização de polímeros e determinação de constituintes inorgânicos em embalagens plásticas metalizadas. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 12, p. 206-212, 2002.

SUTHERLAND I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, 11, p. 663–674, 2001.

SUTHERLAND, I. W. Structure of *Klebsiella aerogenes* type 8 polysaccharide. *Biochemistry*, 9.10, p. 2180-2185, 1970.

TABONEA, V.; et al. An alternative method for the determination of polysaccharidecleavage enzymes activities. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 116, p. 166-172, 2015.



TSUCHIYA, H. M.; et al. The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of bacteriology*, 64.4, p. 521–526, 1952.

VAN DEN BRINK, P.; et al. Potential of mechanical cleaning of membranes from a membrane bioreactor. *Journal of Membrane Science*, 429, p. 259-267, 2013.

VIDAL, R. F.; et al. A novel dextransucrase is produced by *Leuconostoc citreum* strain B/110-1-2: an isolate used for the industrial production of dextran and dextran derivatives. *J. Ind. Microbiol Biotechnol*, 38, p. 1499–1506, 2011.

WIEBECK, H. and HARADA, J. *Plásticos de engenharia*. São Paulo: Artliber, p. 349, 2005.