

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEc  
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso

**Extração e caracterização de poli(3-hidroxi-butirato)  
produzido por *Ralstonia solanacearum***

**Karine Laste Macagnan**

Pelotas, 2013

**Karine Laste Macagnan**

**Extração e caracterização de poli(3-hidroxi-butirato) produzido por  
*Ralstonia solanacearum***

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Biotecnólogo.

Orientador Acadêmico: Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Orientadora de Estágio: Dra. Claire Tondo Vendrusculo

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:  
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB-10/1032  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M145e        Macagnan, Karine Laste  
                Extração e caracterização de poli(3-hidroxi-  
butirato) produzido por *Ralstonia solanacearum* /  
Karine Laste Macagnan. – 48f. – Monografia  
(Conclusão de curso). Biotecnologia. Universidade  
Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento  
Tecnológico. Pelotas, 2013. – Orientador Fábio  
Pereira Leivas Leite; co-orientador Claire Tondo  
Vendrusculo.

1. Biotecnologia. 2. Poli(3-hidroxi-  
butirato). 3. *Ralstonia solanacearum*. 4. Sudan  
Black. 5. Infravermelho. 6. DSC. I. Leite,  
Fábio Pereira Leivas. II. Vendrusculo, Claire  
Tondo. III. Título.

CDD: 574.1929

**Banca Examinadora:**

Dra. Patrícia Diaz de Oliveira

Msc. Amanda Ávila Rodrigues

Msc. Ane Gerber Crochemore

Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por ter me dado forças e determinação para superar os obstáculos e conquistar meus objetivos.

À Universidade Federal de Pelotas, ao Curso de Graduação em Biotecnologia pela oportunidade de realizar a graduação.

Ao orientador acadêmico, Professor Dr. Fábio Pereira Leivas Leite, pelo aceite como orientada.

À orientadora de estágio, Professora Dra. Claire Tondo Vendrusculo, pela grandiosa ajuda no desenvolvimento do trabalho.

À Professora Dra. Marta Amaral por disponibilizar a utilização do microscópio óptico no Laboratório de Imunohistoquímica do CDTec/UFPel, Professora Carmem Iara Walter Calcagno por disponibilizar a utilização do DSC no IFSul/Sapucaia do Sul, Professora Daniela Bianchini por disponibilizar a utilização do Espectroscópio de Infravermelho na Central Analítica do CCQFA/UFPel.

À Professora Dra. Angelita da Silveira Moreira por estar sempre presente durante o desenvolvimento do trabalho e pelo esclarecimento de dúvidas decorrentes.

À banca examinadora, Dra. Patrícia Diaz de Oliveira, Msc. Amanda Ávila Rodrigues, Msc. Ane Gerber Crochemore e Dr. Fábio Pereira Leivas Leite, pelo aceite para avaliar o meu trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biopolímeros, Andiara, Andrey, Bruna, Caciara, Emilyn, Fernanda, Hugo, Janaína, Natália e Tayla pela amizade, colaboração e momentos inesquecíveis de descontração.

Agradeço muito a Amanda pela ajuda incansável, pelo apoio, por estar sempre ao meu lado.

Às colegas Estela e Tainã, amigas que conheci na graduação e que levarei comigo para o resto da vida.

À minha preciosa família, meus pais Vanderlei e Odete e minha irmã Kelly, por sempre me apoiarem nas minhas decisões, por me darem todo o suporte para meus estudos e por simplesmente serem o meu exemplo de vida.

Ao meu namorado, Vinícius, por sempre me incentivar a alcançar os meus objetivos, por entender quando não pude estar perto e por estar sempre ao meu lado.

## Resumo

MACAGNAN, Karine Laste. **Extração e caracterização de poli(3-hidroxi-*butirato*) produzido por *Ralstonia solanacearum***. 2013. 48f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Pesquisadores têm buscado substitutos para os plásticos petroquímicos, para minimizar impactos ambientais. Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são polímeros acumulados no citoplasma bacteriano como materiais de reserva de energia e carbono, ocorrendo quando há condições desfavoráveis de crescimento e excesso de carbono. Por possuir propriedades físicas comparáveis ao polipropileno (PP), o polihidroxi-*butirato* P(3HB) é o biopolímero mais estudado dentre os PHAs. O objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologias de extração e caracterização do P(3HB) produzido por *Ralstonia solanacearum*. Para a multiplicação celular, o inóculo foi realizado em meio yeast malt (YM) e para o acúmulo de PHA, o meio F4. A presença de corpos lipofílicos na linhagem foi confirmada por esfregaços corados com *Sudan Black*. A extração do biopolímero foi realizada em solvente clorofórmio em agitação magnética na temperatura de 58°C em diferentes tempos (1h30min, 1h, 30min e 15min). Após, a massa celular foi separada do solvente por duas formas: (1) filtração em papel filtro quantitativo e (2) transferência para funil de decantação. Os melhores rendimentos foram obtidos através da metodologia 2, com obtenção de 45,5% no tempo de 30min. As metodologias de extração empregadas possibilitaram a obtenção de filmes poliméricos em todos os tempos e formas de separação. Os filmes obtidos tiveram a identidade química característica de P(3HB) e temperaturas de fusão correspondentes às relatadas na literatura.

Palavras-chave: Poli(3-hidroxi-*butirato*). *Ralstonia solanacearum*. *Sudan Black*. Infravermelho. DSC.

## Abstract

MACAGNAN, Karine Laste. **Extraction and characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Ralstonia solanacearum***. 2013. 48f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Researchers have sought substitutes for petrochemical plastics, to minimize environmental impacts. The polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polymers accumulated in the bacterial cytoplasm as reserve materials for energy and carbon, occurring when conditions are unfavorable for growth and carbon excess. By having physical properties comparable to polypropylene (PP), polyhydroxybutyrate P(3HB) is the most studied among the biopolymer PHAs. The objective of this study was to develop methods for the extraction and characterization of P(3HB) produced by *Ralstonia solanacearum*. For cell multiplication, the inoculum was performed in yeast malt (YM) medium and the accumulation of PHA in medium F4. The presence of lipophilic bodies in the lineage was confirmed by smears stained with Sudan Black. The biopolymer extraction was performed with magnetic stirring in chloroform solvent at a temperature of 58°C for different times (1h 30 min, 1 h, 30 min and 15 min). After the cell mass was separated from the solvent by two forms: (1) filtration on quantitative filter paper and (2) transferring to separatory funnel. The best results were obtained using the methodology 2, obtaining 45,5% at time 30 min. The extraction methods used allowed to obtain polymer films in all times and forms of separation. The films obtained had a characteristic chemical identity of P(3HB) and melting temperatures corresponding to those reported in the literature.

Keywords: Poly(3-hydroxybutyrate). *Ralstonia solanacearum*. Sudan Black. Infrared. DSC.

## LISTA DE FIGURAS

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 1</b>  | Estrutura geral dos polihidroxicanoatos.....  | 17 |
| <b>Figura 2</b>  | Produtos da Acetil-Coa em condições de crescimento balanceado e de excesso de carbono.....            | 18 |
| <b>Figura 3</b>  | Morfologia dos grânulos de PHA nas células bacterianas.....   | 19 |
| <b>Figura 4</b>  | Via metabólica mais estudada para a biossíntese de PHAs.....  | 20 |
| <b>Figura 5</b>  | Esfregaços corados com <i>Sudan Black</i> visualizados em lente de imersão em microscopia óptica..... | 30 |
| <b>Figura 6</b>  | Filmes poliméricos formados por meio da extração com clorofórmio utilizando a metodologia 1.....      | 32 |
| <b>Figura 7</b>  | Filmes poliméricos formados por meio da extração com clorofórmio utilizando a metodologia 2.....      | 32 |
| <b>Figura 8</b>  | Porcentagem de rendimento dos filmes.....   | 34 |
| <b>Figura 9</b>  | Espectro FT-IR para os polímeros extraídos pela metodologia 1.....                                    | 36 |
| <b>Figura 10</b> | Espectro FT-IR para os polímeros extraídos pela metodologia 2.....                                    | 37 |
| <b>Figura 11</b> | Curva DSC do polímero extraído pela metodologia 1 no tempo de 1 h e 30 min – amostra A.....           | 39 |
| <b>Figura 12</b> | Curva DSC do polímero extraído pela metodologia 1 no tempo de 1 h – amostra B.....                    | 39 |
| <b>Figura 13</b> | Curva DSC do polímero extraído pela metodologia 1 no tempo de 30 min – amostra C.....                 | 40 |
| <b>Figura 14</b> | Curva DSC do polímero extraído pela metodologia 1 no tempo de 15 min – amostra D.....                 | 40 |



## LISTA DE TABELAS

|                 |                                      |    |
|-----------------|--------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> | Propriedades térmicas de P(3HB)..... | 38 |
|-----------------|--------------------------------------|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                |   |
|----------------|---|
| AN             | agar nutritivo  |
| °C             | grau(s) Celsius   |
| cm             | centímetro(s)   |
| CDTec          | Centro de Desenvolvimento Tecnológico                       |
| DSC            | Calorimetria Diferencial de Varredura                       |
| FTIR           | Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier |
| h              | hora  |
| P(3HB)         | polihidroxibutirato   |
| PHA            | polihidroxialcanoatos                                       |
| F1             | fase de multiplicação celular                               |
| F2             | fase de acúmulo de PHB                                      |
| RPM            | rotações por minuto   |
| MCS            | massa celular seca  |
| mf             | massa total do filme  |
| mg             | miligrama(s)  |
| min            | minuto(s)   |
| mL             | mililitro(s)  |
| MO             | microscopia óptica  |
| TCA            | ácido tricarbóxico  |
| TG             | Termogravimetria  |
| T <sub>m</sub> | Temperatura de fusão cristalina                             |
| UFPel          | Universidade Federal de Pelotas                             |
| YM             | Meio Yest Malt  |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1. Introdução</b> .....  | 12 |
| <b>2. Revisão Bibliográfica</b> .....   | 15 |
| <b>2.1 Biopolímeros</b> .....   | 15 |
| <b>2.1.1 Polihidroxialcanoatos - PHAs</b> .....                                       | 16 |
| <b>2.1.2 Poli(3-hidroxiбутирато) – P(3HB)</b> .....                                   | 17 |
| <b>2.2 Biossíntese de PHAs</b> .....  | 18 |
| <b>2.3 Microrganismos acumuladores de PHAs</b> .....                                  | 20 |
| <b>2.3.1 Ralstonia solanacearum</b> .....   | 21 |
| <b>2.4 Visualização e detecção de PHA</b> .....                                       | 22 |
| <b>2.5 Extração de PHA</b> .....  | 22 |
| <b>2.6 Identificação e caracterização de PHA</b> .....                                | 24 |
| <b>3. Material e Métodos</b> .....  | 26 |
| <b>3.1 Microrganismos</b> .....   | 26 |
| <b>3.2 Produção de PHA</b> .....  | 26 |
| <b>3.3 Avaliação da presença de corpos lipofílicos</b> .....                          | 27 |
| <b>3.4 Extração do polímero</b> .....   | 27 |
| <b>3.5 Determinação de rendimento do filme</b> .....                                  | 28 |
| <b>3.6 Métodos analíticos</b> .....   | 28 |
| <b>3.6.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</b> ..... | 28 |
| <b>3.6.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)</b> .....                        | 29 |
| <b>4. Resultados e Discussão</b> .....  | 30 |
| <b>4.1 Avaliação da presença de corpos lipofílicos</b> .....                          | 30 |
| <b>4.2 Extração de PHB</b> .....  | 31 |
| <b>4.3 Determinação de rendimento da extração do biopolímero</b> .....                | 34 |
| <b>4.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</b> .....   | 35 |
| <b>4.5 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)</b> .....                          | 38 |
| <b>5. Conclusão</b> .....   | 42 |
| <b>6. Referências</b> .....   | 43 |

## 1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho foi realizado durante o estágio curricular supervisionado obrigatório para conclusão do Curso de Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas. O período de estágio foi de 2 de setembro a 21 de dezembro de 2012, no Laboratório de Biopolímeros, CDTec, UFPel, campus Capão do Leão. Todos os experimentos e análise de resultados foram desenvolvidos durante o período de estágio.

Os plásticos convencionais, obtidos a partir do petróleo, substituem cada vez mais o vidro e o papel na indústria de embalagens, pois proporcionam muitos avanços e facilidades para a sociedade, devido a sua durabilidade e resistência (LUENGO et al., 2003). Porém, seu uso indiscriminado e descarte errôneo provocam sérios impactos ambientais negativos. Por não reagirem quimicamente com a maioria das substâncias esses materiais são de lenta degradabilidade, provocando problemas nos aterros sanitários, dificultando a troca de gases e a decomposição de outros compostos (LUENGO et al., 2003). Além disso, geram problemas urbanos causando enchentes ao obstruir redes de esgoto, como também danos em animais, pois são ingeridos por peixes e tartarugas devido a grande quantidade de plástico encontrada nos oceanos, causando a morte desses animais (SERAFIM et al., 2002; REDDY, 2003).

A expansão demográfica do planeta, que passou de 1,5 para 7 bilhões de habitantes no último século (POPULACION REFERENCE BUREAU, 2011), gera preocupação devido ao acúmulo de plásticos no ambiente, ocasionando um problema mundial (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005). A necessidade de produção para suprir as exigências destes habitantes tem gerado todo tipo de “lixo”, os quais

contribuem para o desequilíbrio ambiental. A conscientização dos usuários dos plásticos com relação aos benefícios *versus* poluição ambiental e também a produção de materiais similares que não poluam ou minimizem a produção da poluição, são os fatores que poderão modificar a situação atual deste problema. Possivelmente os plásticos sintéticos poderão ser substituídos por biodegradáveis na fabricação de embalagens, podendo ser uma alternativa para reduzir o grande volume de resíduos plásticos no meio ambiente (FIORESE, 2008).

Preocupados em minimizar este desequilíbrio, pesquisadores têm buscado substitutos para os plásticos petroquímicos. A rápida degradação pela ação enzimática de microrganismos sob condições apropriadas no meio ambiente é a principal característica destes bioplásticos; além de serem termoplásticos e biocompatíveis ao ser humano (PIEMOLINI, 2004). Bioprocessos podem ser empregados como ferramenta para obtenção de polímeros biodegradáveis da família dos polihidroxialcanoatos (PHAs). PHAs são acumulados no citoplasma bacteriano como inclusões de poliésteres insolúveis, correspondendo até 90% da massa celular (KUNASUNDARI; SUDESH, 2011). A síntese de PHAs, materiais de reserva intracelular de energia e carbono para os microrganismos, ocorre quando há condições desfavoráveis de crescimento e excesso de carbono (MADISON; HUISMAN, 1999). Por possuir propriedades físicas, como ponto de fusão, grau de cristalinidade e temperatura de transição vítrea comparáveis ao polipropileno (PP), o polihidroxibutirato P(3HB) é o biopolímero mais estudado dentre os PHAs e o mais utilizado em plásticos biodegradáveis (HOLMES, 1985; CHANPRATEEP, 2010).

São conhecidos mais de 300 microrganismos capazes de sintetizar PHAs, mas são poucos os efetivamente empregados na sua produção, incluindo *Ralstonia* sp., *Cupriavidus necator* e *Pseudomonas* sp., e *Escherichia coli* recombinante (CHANPRATEEP, 2010). Os microrganismos empregados na produção de PHAs devem ser eficientes em cultivos com alta densidade celular, acumular alta concentração de polímero em um período relativamente curto, resultando em alta produtividade, um fator indispensável para diminuir os custos de produção na fase do processo fermentativo deste biopolímero (LEE, 1996). Atualmente já são produzidos alguns tipos de bioplásticos em países como Alemanha, Itália e Espanha, com as mesmas propriedades de alguns dos plásticos sintéticos (PRADELLA, 2006). O inconveniente para a utilização é o preço, que em alguns

casos chegam a custar até cinco vezes o preço do plástico sintético. Conhecendo-se o processo e sabendo-se que a etapa de extração é a mais problemática e também a mais onerosa, a qual custa 50% ou mais, do custo total do processo (KUNASUNDARI & SUDESH, 2011), as pesquisas tem sido orientadas buscando a melhoria e a minimização dos custos desta etapa. Inúmeras abordagens podem ser pesquisadas buscando solucionar este problema, tais como, troca de solventes, estudos de redução de tempo de agitação na etapa de extração, diferentes metodologias buscando aumentar a qualidade e o rendimento de extração, entre outras.

Este trabalho partiu da hipótese de que a espécie *Ralstonia solanacearum*, cedida pelo Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel e preservada na Coleção de Culturas de Microrganismos do Laboratório de Biopolímeros do CDTec/UFPel, que apresenta formação de corpos lipofílicos, é capaz de produzir e acumular biopolímeros do tipo poli(3-hidroxi-butirato). Objetivou-se desenvolver metodologias de extração e caracterização do P(3HB) produzido por *Ralstonia solanacearum*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BIOPOLÍMEROS

Os polímeros têm um papel importantíssimo na sociedade moderna, estando presente em muitos setores da economia como: medicina, agricultura, embalagens e eletroeletrônicos; sua produção é estimada em 180.000.000 t/ano (PRADELLA, 2006).

Devido ao aumento de preço do petróleo, principal fonte de matéria-prima para a produção dos polímeros, associada a uma crescente preocupação social com os índices de poluição mundial, fez-se necessário o desenvolvimento de novos tipos de polímeros, os quais são chamados de biopolímeros (BORSCHIVER et al., 2008).

Biopolímeros podem ser definidos como qualquer polímero (proteína, ácido nucléico, polissacarídeo) produzido por um organismo vivo (PRADELLA, 2006) e podem ser obtidos em processos biológicos, podendo ser utilizados substratos alternativos, de baixo custo (QUEIRÓZ & MAUGERI, 1989). Muitas bactérias produzem biopolímeros, sejam eles intra ou extracelulares (exopolissacarídeos) em apropriadas condições de cultivo.

Um exemplo de exopolissacarídeo é a goma xantana, a qual é sintetizada por linhagens de *Xanthomonas* e tem capacidade de formar soluções viscosas em meio aquoso. Os polímeros extracelulares possuem muitas aplicações em indústrias de alimentos, farmacêutica, petrolífera, cosmética, têxtil, de tintas, produtos agrícolas entre outras (SUTHERLAND, 1996; MOREIRA et al., 2001; ALVES et al., 2009).

Os polihidroxicanoatos (PHAs) podem ser destacados como polímeros intracelulares, são acumulados na forma de grânulos no interior da célula bacteriana por uma variedade de microrganismos (MADISON & HUISMAN, 1999). Podem ser vistos como substitutos dos plásticos petroquímicos devido as suas semelhantes propriedades e por terem a vantagem de serem totalmente biodegradáveis (COUTINHO et al., 2004).

### **2.1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS - PHAS**

Os polihidroxicanoatos são homo ou heteropoliésteres, sintetizados e armazenados intracelularmente por numerosos procariotos. São acumulados pela célula microbiana em forma de grânulos, podendo chegar até 90% de seu peso seco (MADISON & HUISMAN, 1999). A função mais frequentemente atribuída a estes grânulos é a de reserva de carbono e energia, assim quando há limitação de carbono ou energia estes PHAs podem ser reutilizados para suprir essa necessidade (SCHLEGEL et al., 1961; MADISON & HUISMAN, 1999).

O processo de síntese de PHAs ocorre em duas fases: primeiramente uma fase inicial de crescimento não limitado, visando o crescimento celular, seguida de uma fase de produção e acúmulo de polímero, a qual ocorre somente sob a condição de limitação de um nutriente essencial como P, Fe, Mg, N, associada a um excesso de fonte de carbono (KHANNA & SRIVASTAVA, 2005).

Dentre as importantes características dos PHAs pode-se destacar a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e termoplaticidade (REDDY et al., 2003). Além disso, outras características os tornam similares aos plásticos convencionais e altamente competitivos com o polipropileno, como o alto grau de polimerização, a cristalinidade, e por serem opticamente ativos e insolúveis em água (MADISON & HUISMAN, 1999; REDDY et al, 2003).

Existem algumas propriedades termoplásticas desejadas em PHAs, como baixa rigidez, elevado ponto de fusão, forte resistência a impactos e pressão, resistência ao alongamento antes da ruptura, temperatura de transição vítrea, cristalinidade e tempo de cristalização (CANEVAROLO, 2003). Cada microrganismo, seja ele naturalmente produtor de PHAs ou com modificação genética, originam



bioplásticos com propriedades termoplásticas diferentes obtendo produtos com características diferentes. Assim, é bastante ampla a busca por PHAs que apresentem essas propriedades.

Em relação às unidades monoméricas que compõem estes dependem da fonte de carbono utilizada pelas bactérias e diferem entre si pela composição da cadeia lateral ou do radical R e pelo valor de n (LEE, 1996a). A partir da Fig. 1 pode-se observar a estrutura geral da unidade monomérica destes biopolímeros.

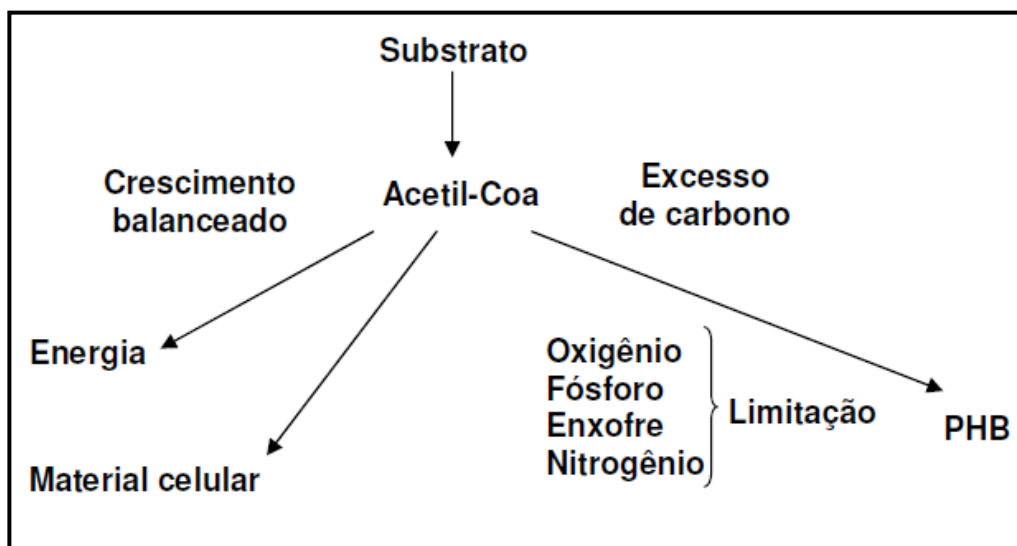
|  |  |  |
|--|--|--|
| $\left[ \begin{array}{c} -O - CH - (CH_2)_n - C - \\   \qquad \qquad \qquad    \\ R \qquad \qquad \qquad O \end{array} \right]_{100-3000}$ |  |  |
| n=1  | R= hidrogênio<br>R= metil<br>R= etil<br>R= propil<br>R= pentil<br>R= nonil | Poli (3-hidroxiopropionato)<br>Poli (3-hidroxiбутирато)<br>Poli (3-hidroxiуалерато)<br>Poli (3-hidroxihexanoato)<br>Poli (3-hidroxiоттаноato)<br>Poli (3-hidroxiдесаноato) |
| n=2  | R= hidrogênio<br>R= metil  | Poli (4-hidroxiбутирато)<br>Poli (4-hidroxiуалерато)   |
| n=3  | R= hidrogênio<br>R= metil  | Poli (5-hidroxiуалерато)<br>Poli (5-hidroxihexanoato)  |
| n=4  | R= hexil   | Poli (6-hidroxiдесаноato)  |

**Figura 1** - Estrutura geral dos polihidroxiálcanoatos. Fonte. LEE 1996a.

### 2.1.2 POLI(3-HIDROXIБУТИРАТО) – P(3HB)

O P(3HB) é o PHA mais extensivamente estudado e caracterizado, é um homopolímero composto por unidades monoméricas de quatro átomos de carbono, sendo um poliéster natural e biodegradável (TSUGE, 2002).

Na maioria dos microrganismos o P(3HB) é sintetizado a partir de uma molécula de acetil-COA. Quando o cultivo destes ocorre em condições de crescimento balanceado o acetil-COA entra no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) para geração de energia e material celular. Porém, quando este cultivo ocorre em condições de excesso de fonte de carbono e limitação de algum nutriente essencial, o acetil-COA é convertido em PHB por uma sequência de três reações catalisadas pelas enzimas cetotiolase, acetil-COA redutase e PHA sintase (OEDING & SCHLEGEL, 1973; BYROM, 1987), podendo ser observado na Fig. 2.

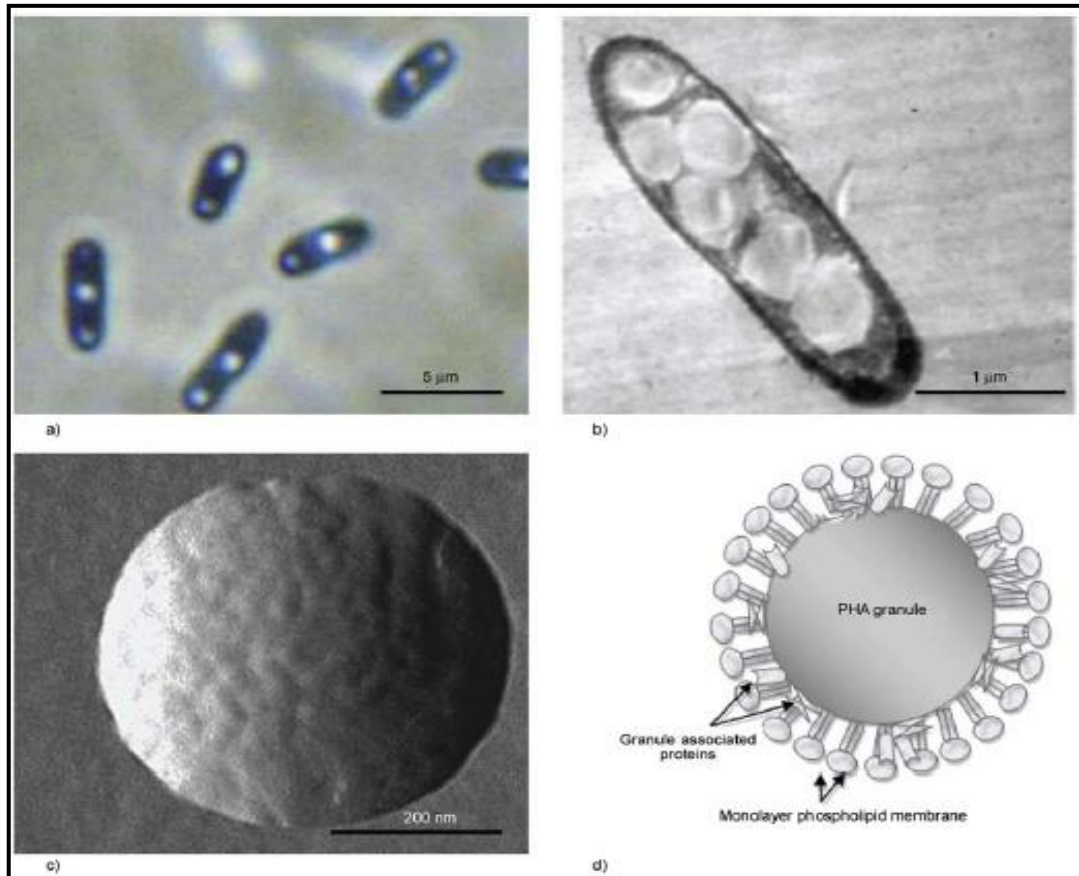


**Figura 2** - Produtos da Acetil-Coa em condições de crescimento balanceado e de excesso de carbono. Fonte: Byrom, 1987.

## 2.2 BIOSÍNTESE DE PHAS

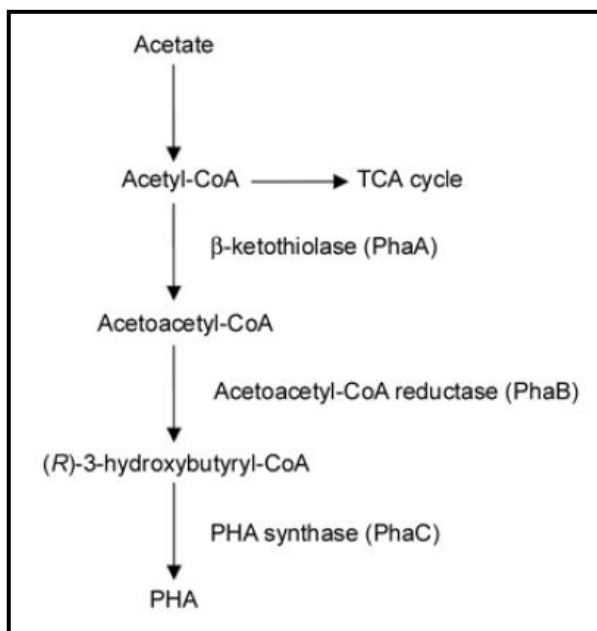
O polihidroxicanoato é um composto lipídico sintetizado por muitos microrganismos como forma de armazenamento material. Após a síntese, o PHA é acumulado sob a forma de grânulos no citoplasma da célula bacteriana. A média do tamanho dos grânulos é, aproximadamente, 0,2-0,5  $\mu\text{m}$ . A Fig. 3 mostra a morfologia de grânulos de PHA quando observada por diversas técnicas de microscopia. A análise microscópica de força atômica revelou a presença de uma monocamada de proteína sobre a superfície dos grânulos de PHA (SUDESH et al., 2004). Para a finalidade de recuperar os grânulos é necessário realizar a ruptura celular bacteriana

e remover a camada proteica que reveste os grânulos de PHA (KUNASUNDARI & SUDESH, 2011).



**Figura 3** - Morfologia dos grânulos de PHA nas células bacterianas observadas em (a) microscópio de contraste de fase; (b) de transmissão eletrônica; (c) A imagem de microscópio de força atômica mostra a presença de partículas globulares na superfície dos grânulos; (d) Um modelo que representa o grânulo PHA com uma monocamada de proteína na superfície (Não desenhadas de acordo com a escala real). Fonte: Kunasundari & Sudesh, 2011.

A formação de grânulos de PHA é dependente da presença de vias metabólicas adequadas. Através da Fig. 4 podemos observar uma via metabólica simplificada para a biossíntese de poli(3-hidroxi-butirato), que é o tipo mais comum de PHA. A biossíntese de P(3HB) é iniciada pela condensação de duas moléculas de acetil-CoA pela enzima cetotilase (PhaA) para formar acetoacetil-CoA. Subsequentemente, a acetoacetil-CoA-redutase NADPH dependente (PhaB) catalisa a redução da acetoacetil-CoA para o (R)-isômero de 3-hidroxi-butiril-CoA, que é então polimerizado em P(3HB) pela PHA sintase (PhaC) (SUDESH et al., 2000).



**Figura 4** - Via metabólica mais estudada para a biossíntese de polihidroxialcanoatos (PHA). Fonte: Kunasundari & Sudesh, 2011.

### 2.3 MICRORGANISMOS ACUMULADORES DE PHAS

Os microrganismos capazes de acumular PHAs são geralmente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, podendo ser encontradas em diversos locais na natureza, como solo, água do mar, efluentes entre outros (BYROM, 1987). Na literatura são reportados mais de 300 microrganismos capazes de sintetizar PHAs, mas somente uma pequena parte é empregada para a produção e desenvolvimento de processos, incluindo *Ralstonia sp.*, *Azotobacter vinelandii*, *Alcaligenes latus*, *Cupriavidus necator*, vários isolados metilotróficos e as versões recombinantes de *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes* (LEE, 1996a). A maioria das bactérias acumula uma pequena porcentagem de PHA (1% a 15%), mas em condições especiais de crescimento e estratégias de fermentação, podem alcançar altos valores (próximos a 90%) de sua massa celular seca (KHANNA & SRIVASTAVA, 2005).

Assim, a seleção do microrganismo para produção industrial de PHA é baseada em vários fatores como, alta velocidade de crescimento, utilização de diferentes substratos principalmente de baixo custo, capacidade de acumular grande quantidade de polímero, e que haja um fator de conversão do substrato em

biopolímero bastante elevado (LEE, 1996a). O alto custo de produção de PHAs deve-se em grande parte ao processo de extração do polímero. Para que este seja rentável, é necessário que a linhagem produtora seja capaz de acumular pelo menos 60% de sua massa celular em polímero (RAMSAY et al., 1990).

Os microrganismos usados para a produção de PHAs podem ser divididos em dois grupos, sendo esses baseados nas condições de cultura requeridas para a síntese do bioplástico. O primeiro grupo requer a limitação de um nutriente essencial como N, P, Mg, K, O ou S, paralelamente ao excesso de fonte de carbono, para a síntese eficiente de PHAs. Fazem parte deste grupo *Ralstonia eutropha*, *Protomonas extorquens*, *Pseudomonas oleovorans*, entre outros. Já o segundo grupo, não requer a limitação de nutrientes para a síntese de polímero, acumulando-o durante o crescimento. Para este grupo pode-se citar *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes vinelandii* recombinante e *Escherichia coli* recombinante (LEE, 1996b).

### **2.3.1 RALSTONIA SOLANACEARUM**

A primeira descrição de *Ralstonia solanacearum* foi feita por Smith em 1896 quando foi denominada *Bacillus solanacearum*. Desde então, sua nomenclatura sofreu algumas modificações. Em 1914 passou a *Pseudomonas solanacearum*. Já em 1992 foi proposto um novo gênero por Yabuuchi e colaboradores, *Burkholderia*, para o qual transferiram sete espécies do gênero *Pseudomonas*, dentre elas *P. solanacearum*, que passou a ser denominada de *Burkholderia solanacearum* (YABUUCHI et al., 1992). Através da análise molecular da sequência do gene da região 16S do rRNA e análises quimiotaxonômicas em 1995 passou a ser denominada de *R. solanacearum* (YABUUCHI et al., 1995). O gênero *Ralstonia* se classifica no reino Procariotae, divisão Bactéria, classe Proteobacteria, subclasse b-Proteobacteria, ordem Burkholderiales, família Burkholderiaceae (EUZÉBY, 2009).

*Ralstonia solanacearum* é uma bactéria Gram-negativa em forma de bacilo com dimensões aproximadas de 0,5 x 1,5µm. Naturalmente habitante do solo e da água, aeróbica e não formadora de esporos. Os isolados virulentos não possuem flagelos e são imóveis, enquanto os isolados avirulentos têm alta motilidade possuindo de 1 a 4 flagelos. A bactéria acumula poli-β-hidroxibutirato como reserva de carbono e

energia. É fraca degradadora de gelatina e não utiliza arginina ou betaina como fonte de carbono. É tolerante a sais e cresce em temperatura entre 25 a 35°C, variando de acordo com os isolados (MEHAN et al., 1994).

## **2.4 VISUALIZAÇÃO E DETECÇÃO DE PHA**

Os grânulos de PHA podem ser detectados por vários métodos. A bioprospecção de bactérias produtoras de PHAs pode ser realizada pela avaliação da presença de corpos lipofílicos nas células, através do teste colorimétrico de *Sudan Black*. O corante *Sudan Black* é ligeiramente solúvel em solvente orgânico e insolúvel em água; ao ligar-se a estruturas hidrofóbicas confere coloração negra azulada, visível em microscópio óptico (LELLIOT; STEAD, 1987).

Após a coloração, a detecção dos grânulos de PHAs pode ser realizada utilizando um microscópio óptico comum (ANDERSON; DAWES, 1990). A Microscopia Óptica (MO) permite a análise de grandes áreas em curto espaço de tempo, além de ser de fácil utilização, rápida e pouco dispendiosa. Os melhores microscópios ópticos têm um poder de resolução de 0,2 micrômetros, ou aproximadamente 200 nanômetros e aumentam a resolução do olho nu em 500 vezes (RAVEN et al., 1996).

## **2.5 EXTRAÇÃO DE PHA**

O desenvolvimento de metodologia que permita a recuperação dos PHAs por processo simples, eficiente e menos poluente é uma proposta necessária e atrativa. É fundamental que o processo de extração e purificação seja de baixo custo, uma vez que essa etapa representa 50% ou mais do custo total do produto (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005). Portanto, são relatados diversos estudos na literatura com o propósito de criar metodologias para aumentar o rendimento de extração e melhorar a pureza do produto.

A extração é o último estágio da produção do bioplástico. Após o cultivo, a suspensão celular contendo PHAs é separada do caldo por processos convencionais, como filtração, centrifugação ou floculação, para posteriormente serem rompidas e o polímero extraído (NASCIMENTO, 2001). Vários métodos de extração foram desenvolvidos para a recuperação de PHAs, como extração do polímero por solventes, como clorofórmio, por digestão com hipoclorito de sódio, surfactante e quelante, enzimas, e rompimento mecânico (LEE et al., 1996; LEE, 1996a, KESSLER & WITHOLT, 2001; GARCIA, 2006; JACQUEL et al., 2008; CROCHEMORE, 2010; OLIVEIRA, 2010)

A maioria dos processos de extração de PHAs, propostos na literatura, envolve o rompimento das células com o uso de solventes, tais como: hidrocarbonetos clorados, cloreto de metila, clorofórmio e dicloroetano. Esses solventes rompem as células, solubilizando seus lipídios, inclusive os PHAs. Compostos orgânicos polares, como acetonas e alcoóis, também podem ser citados. Eles rompem o material celular não polimérico, deixando os grânulos de PHAs intactos (KESSLER e WITHOLT, 2001). O uso de solventes pode trazer alta pureza para o material formado (>99%), porém muitas vezes gera problemas ambientais e como são necessários grandes quantidades de solventes, cerca de 20 partes para 1 de polímero, gera um aumento significativo de custo (LEE, 1996a).

Métodos baseados na digestão da porção não PHA da célula, como por exemplo, a utilização de hipoclorito de sódio resulta na redução da massa molar desse biopolímero devido a ocorrência de grande degradação de P(3HB) durante a digestão. Normalmente, obtém-se um polímero com pureza maior que 95% (LEE, 1996a).

Já a digestão enzimática, é um método vantajoso por ser um processo seletivo e eficiente em termos energéticos, além de oferecer menor risco de danos ao produto quando comparado com outras metodologias, porém não é um processo economicamente atrativo (JACQUEL et al., 2008).

Um método mecânico alternativo desenvolvido para extração do P(3HB) baseia-se na ruptura celular por pérolas de vidro em um moinho de bolas, resultando em um produto com rendimento de extração 64% e pureza de 89% (GARCIA, 2006).

Assim, nenhum método é totalmente inócuo ao polímero quando se trata de isolamento ou extração de PHAs ou PHB, por isso inúmeros estudos têm sido

realizados para reduzir os danos que podem ocorrer ao polímero ainda na fase de extração (GARCIA, 2006; FIORESE, 2008; CROCHEMORE, 2010; OLIVEIRA, 2010).

## **2.6 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PHA**

A caracterização do bioplástico é necessária pelo fato de os PHAs pertencerem a uma grande família de diferentes poliésteres, com mais de 91 unidades monoméricas já identificadas. Assim, as suas propriedades irão depender da sua composição monomérica e poderá ser definida a sua aplicação devido suas características específicas (STEINBUCHEL & VALENTIN, 1995).

Diversas técnicas de identificação e caracterização de polímeros têm sido utilizadas, dentre as técnicas espectroscópicas pode-se citar espectrometria de massas, espectrometria de ressonância magnética, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e raios-X. Análises térmicas como, por exemplo, a termogravimetria (TG) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) podem também ser utilizadas, pelo fato de os polímeros serem compostos orgânicos, sendo suas características físicas e químicas fortemente influenciadas pela temperatura (SILVERSTEIN et al., 2007; CANEVAROLO et al., 2007).

O espectro de absorção no infravermelho é hoje um dos métodos mais rápidos para caracterizar os grupamentos funcionais de um composto químico (COSTA NETO, 2005). Através desta análise moléculas simples podem produzir espectros extremamente complexos, assim correlacionando as bandas formadas, a comparação de um espectro de um composto desconhecido com o de uma amostra conhecida constitui boa prova de identidade, pois é muito pouco provável que dois compostos diferentes tenham o mesmo espectro de infravermelho (SILVERSTEIN et al., 2007).

As características mais importantes de um espectro no infravermelho são os valores das frequências de absorção da molécula (bandas), parâmetro fundamental para sua identificação ou para a interpretação do espectro, visando à caracterização de grupamentos funcionais nele presentes (COSTA NETO, 2005).



Outra técnica bastante utilizada para caracterização de polímeros é calorimetria diferencial de varredura (DSC), na qual é medida a absorção ou liberação de calor em função da temperatura em que ocorrem as mudanças químicas ou físicas no polímero. Alterações de temperatura da amostra são devidas a variações de entalpia endotérmicas ou exotérmicas decorrentes de transições físicas ou de reações químicas. As variações de entalpia são chamadas transições de primeira ordem, como fusão, cristalização, vaporização, solidificação e adsorção (GALEGO et al., 2000).

A transição térmica dita de segunda ordem conhecida como transição vítrea ( $T_g$ ) é acompanhada pela variação da capacidade calorífica da amostra, juntamente com variações dimensionais e viscoelásticas, mas não apresentam variações de entalpia. Assim, estas transições não geram picos nas curvas de DSC, manifestando-se na forma de uma alteração na linha de base (SPIER, 2005).

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 MICRORGANISMOS**

Foi utilizada para este estudo a linhagem de *Ralstonia solanacearum* cedida pelo Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Foi preservada por meio da técnica de repiques mensais em agar nutritivo (AN), estocadas sob refrigeração a 4°C.

### **3.2 PRODUÇÃO DE PHA**

A produção de PHA foi feita em duas etapas, sendo a primeira a multiplicação celular (F1). Para esta etapa foi utilizado o meio YM, o qual foi esterilizado por 20min a 121°C. O inóculo foi realizado em frascos *Erlenmeyers* de 250mL, contendo 80mL de meio YM e 20mL de YM + microrganismo (através da raspagem de duas placas cheias). As condições de cultivo foram 28°C e 150rpm por 24h em incubador agitador orbital.

Células multiplicadas (F1) no meio YM foram utilizadas na segunda fase, denominada de acúmulo ou produção de PHA (F2). Nesta próxima fase o meio utilizado foi o F4 segundo OLIVEIRA (2010), esterilizado por 20min a 121°C. Para a produção de PHA foram utilizados frascos *Erlenmeyers* de 500mL contendo 160mL de meio F4 e 40mL de inóculo. A fermentação foi mantida na temperatura de 28°C e 200rpm em período de tempo de 72h. Foram realizadas 5 fermentações para obter a massa celular suficiente.

### 3.3 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE CORPOS LIPOFÍLICOS

A investigação prévia da presença de corpos lipofílicos na linhagem estudada foi feita por método de coloração com *Sudan Black* (LELIOT & STEAD, 1987). Os esfregaços foram feitos em lâminas de vidro utilizando alçadas do inóculo da linhagem *Ralstonia solanacearum* fixadas em bico de *Bunsen*. O esfregaço foi coberto com o corante *Sudan Black* 0,3% m/v por tempo de 10min, logo as lâminas foram lavadas com xilol e posteriormente com água, foram secas com papel absorvente e cobertas com o corante safranina 0,5% por 15s. Após, foram lavadas com água e secas naturalmente. Por fim, foram visualizadas em microscópio óptico utilizando lente de imersão. As imagens foram captadas através de fotografias.

### 3.4 EXTRAÇÃO DO POLÍMERO

Ao completar 72h de fermentação o caldo foi centrifugado a 10000g por 15min, o *pellet* foi ressuspenso em solução salina 0,89% e novamente centrifugado por 10min. A massa celular foi transferida para placas de Petri e secas em estufa a 56°C.

A extração foi realizada utilizando para cada 0,5g de massa celular seca 20mL de clorofórmio. A amostra foi mantida em frasco de *Duran*, submetida a agitação magnética em temperatura de 58 °C em diferentes tempos (1h30min, 1h, 30min e 15min). Após, a massa celular foi separada do solvente por duas formas (DALCANTON modificado, 2006):

- (1) Amostra foi filtrada em papel filtro quantitativo e transferida para placa de Petri tampada para a lenta evaporação do solvente e formação do biofilme.
- (2) Amostra foi transferida para um funil de decantação e adicionados 20mL de água destilada, foi levemente agitada e esperou-se formar duas fases, sendo a inferior transferida para placa de Petri tampada para a lenta evaporação do solvente e formação do biofilme.

As duas formas de extração foram realizadas em triplicata para todos os tempos de agitação. Após, os filmes foram pesados para o cálculo de rendimento e fotografados digitalmente para registro das imagens.

### 3.5 DETERMINAÇÃO DE RENDIMENTO DO FILME

Após sua recuperação, os filmes foram pesados para o cálculo de rendimento.

Para a determinação de rendimento foi utilizada a seguinte equação (1).

$$\text{rendimento} = \frac{mf}{mcs} \times 100 \quad (1)$$

onde: *mf* é a massa total do filme recuperado e *mcs* é a massa celular seca utilizada para recuperação.

### 3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.6.1 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Para identificação dos biopolímeros produzidos pela linhagem *Ralstonia solanacearum*, os filmes poliméricos dissolvidos em clorofórmio e o padrão de P(3HB) foram dispostos em pastilhas de KBr. Para confecção das pastilhas, 1mg de amostra foi dissolvida em 1mL de clorofórmio. Para obtenção do espectro foi utilizado o espectrômetro IR com transformada de Fourier Shimadzu® modelo IR Prestige 21. As imagens foram adquiridas dentro de uma faixa de 4500-500cm<sup>-1</sup> com uma resolução de 4cm<sup>-1</sup> (CROCHEMORE modificado, 2010).

### **3.6.2 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)**

Para esta etapa foram utilizados apenas os filmes extraídos pela metodologia 1, nos tempos de agitação de 1h30min (amostra A), 1h (amostra B), 30min (amostra C) e 15min (amostra D). A DSC foi realizada com um aparelho Perkin Elmer, modelo Pyris 6. Usou-se uma atmosfera de nitrogênio a uma razão de 20ml.min<sup>-1</sup>.

As condições de análise DSC que as amostras foram submetidas são descritas a seguir:

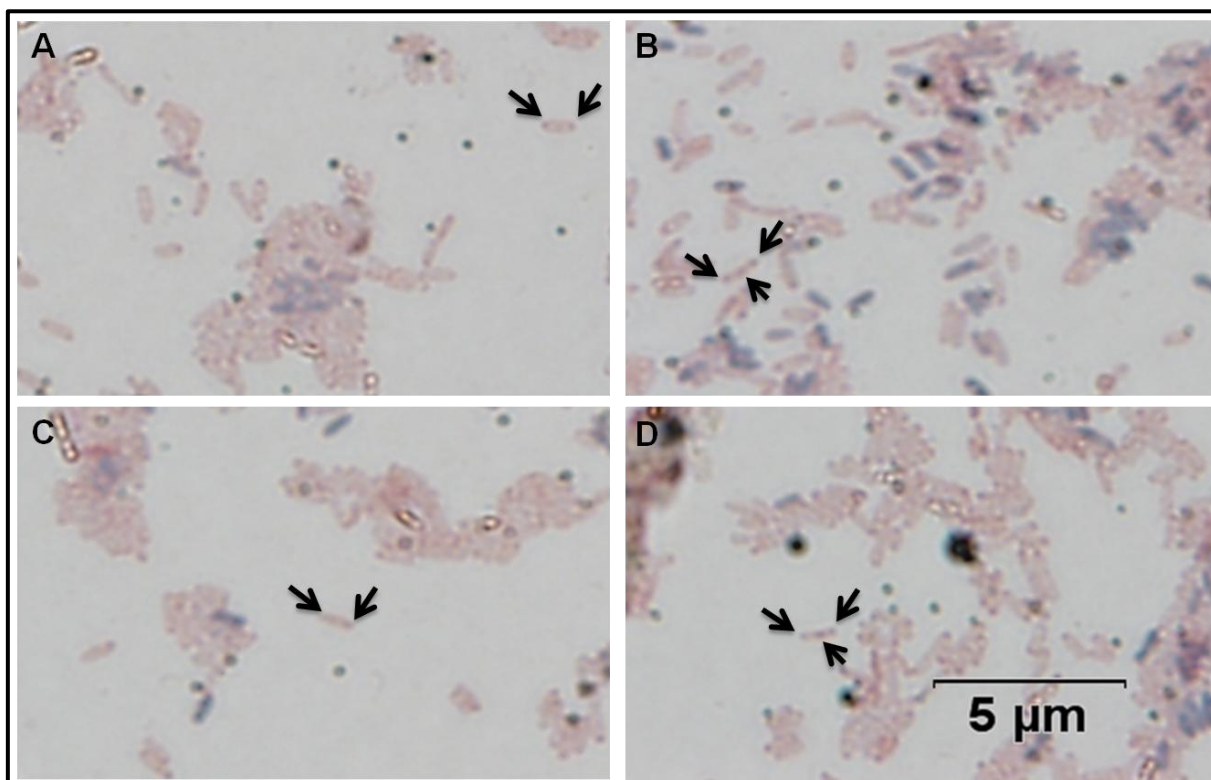
1. Isoterma de 20°C durante 1min;
2. Aquecimento de 20°C a 200°C com taxa de 10°C/min.;
3. Isoterma de 200°C durante 5min;
4. Resfriamento de 200°C a 20°C com taxa de 10°C/min.;
5. Isoterma de 20°C durante 5min;
6. Aquecimento de 20°C a 200°C com taxa de 10°C/min.

Para verificar a influência da história térmica na obtenção das amostras, foram observados os valores de temperatura de fusão cristalina ( $T_m$ ) no primeiro ciclo de aquecimento. Contudo, a fim de eliminar a história térmica do material as  $T_m$  foram obtidas também no segundo ciclo de aquecimento.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE CORPOS LIPOFÍLICOS

Os esfregaços da amostra corados e visualizados em lente de imersão de microscópio óptico, com câmera fotográfica acoplada, puderam ser registrados em fotografias demonstradas na Fig. 5.



**Figura 5** - Esfregaço do inóculo 24h corado com *Sudan Black* visualizado em lente de imersão em microscopia óptica.

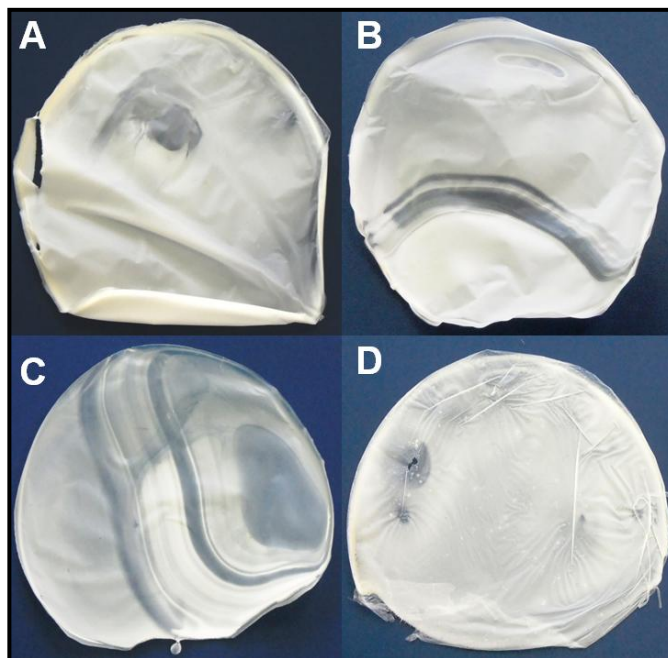
O corante *Sudan Black* atua por difusão simples, corando corpos lipofílicos como os grânulos de PHAs, gerando uma coloração negro azulada (LELLIOT; STEAD, 1987), a qual possibilita sua visualização em microscópio óptico e indica resultado positivo (ANDERSON; DAWES, 1990). Assim, pode-se inferir que a linhagem de *Ralstonia solanacearum* é potencialmente produtora de PHAs, apresentando pontos negros azulados.

Quanto à disposição dos grânulos nas células, observando-se as micrografias, as amostras corresponderam ao relatado na literatura para o gênero bacteriano analisado, ou seja, os esfregaços apresentaram no mínimo dois grânulos distribuídos um em cada pólo da célula (observar setas na Fig. 5 – quadros A e C). Esta distribuição é encontrada em grande parte das células no estágio inicial de acúmulo de PHAs. Já a presença de um terceiro grânulo, também observado em nossas análises, normalmente ocorre na região central do bacilo (observar setas na Fig. 5 – quadros B e D) (JENDROSSEK et al., 2007, CROCHEMORE, 2010; OLIVEIRA, 2010).

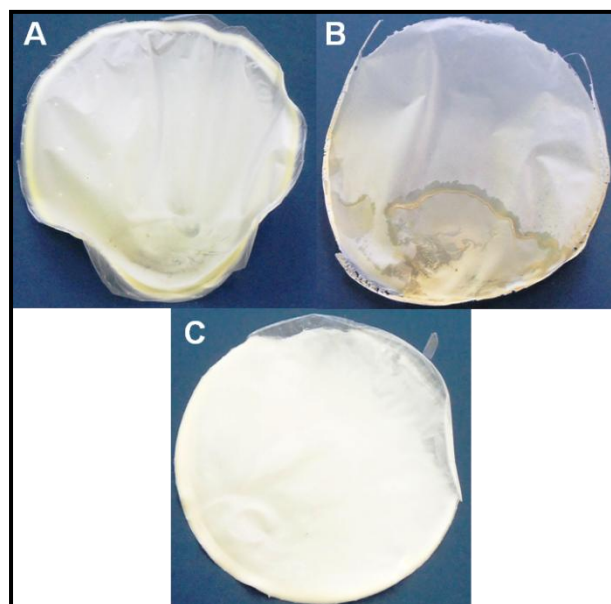
Essa observação também foi realizada por Jendrossek et al., 2007, que relataram que algumas bactérias, como *Xanthobacter autotrophicus*, *Caryophanon luttum*, *Rhodospirillum rubrum*, *Ralstonia eutropha* e *Escherichia coli* recombinante, também apresentaram o mesmo padrão de formação dos grânulos de PHA no início do estágio de formação; o autor sugeriu que um novo grânulo pode ser formado próximo ao local de formação do septo de divisão celular. Aparentemente, o início da síntese de formação dos grânulos de PHA pode ser diferente em diferentes bactérias, dependendo das classes de PHA sintases que este microrganismo possui (JENDROSSEK et al., 2007).

## **4.2 EXTRAÇÃO DE PHB**

Os resultados mostrados nas Fig. 6 e 7 são dos filmes poliméricos obtidos pela evaporação lenta extraídos a partir das metodologias 1 e 2, respectivamente, conforme item 3.4.



**Figura 6** - Filmes poliméricos formados por meio da extração com clorofórmio utilizando a metodologia 1 (papel filtro), com os tempos de agitação de (A) 1 h e 30 min, (B) 1 h, (C) 30 min e (D) 15 min; em 72 h de cultivo.



**Figura 7** - Filmes poliméricos formados por meio da extração com clorofórmio utilizando a metodologia 2 (funil de decantação), com os tempos de agitação de (A) 1h, (B) 30min e (C) 15min; em 72h de cultivo.

Os filmes evaporados na placa apresentaram aspecto liso com as bordas rugosas, o que pode ser resultado da lenta evaporação ocorrida pelo fato de a placa contendo o clorofórmio + P(3HB) ser tampada. Crochemore (2010) e Oliveira (2010) também encontraram resultados semelhantes. Tais características finais do filme



foram comentadas por Dalcanton (2006), onde o modo de evaporação do solvente é o principal fator para se obter a aparência do filme, na qual uma evaporação mais rápida produz um filme mais rugoso e uma evaporação mais lenta produz um filme mais liso.

Os resultados da metodologia 1, mostraram que todos os filmes formados apresentaram textura flexível, no entanto o tempo de agitação teve uma influencia perceptível na textura do filme. O filme extraído com a agitação de 1h30min apresentou a textura maleável e a agitação de 15min a menos maleável. O tempo de agitação não influenciou na cor do filme obtido. E a cor branca obtida para todos os filmes é a cor desejada para este tipo de matéria prima (PHB).

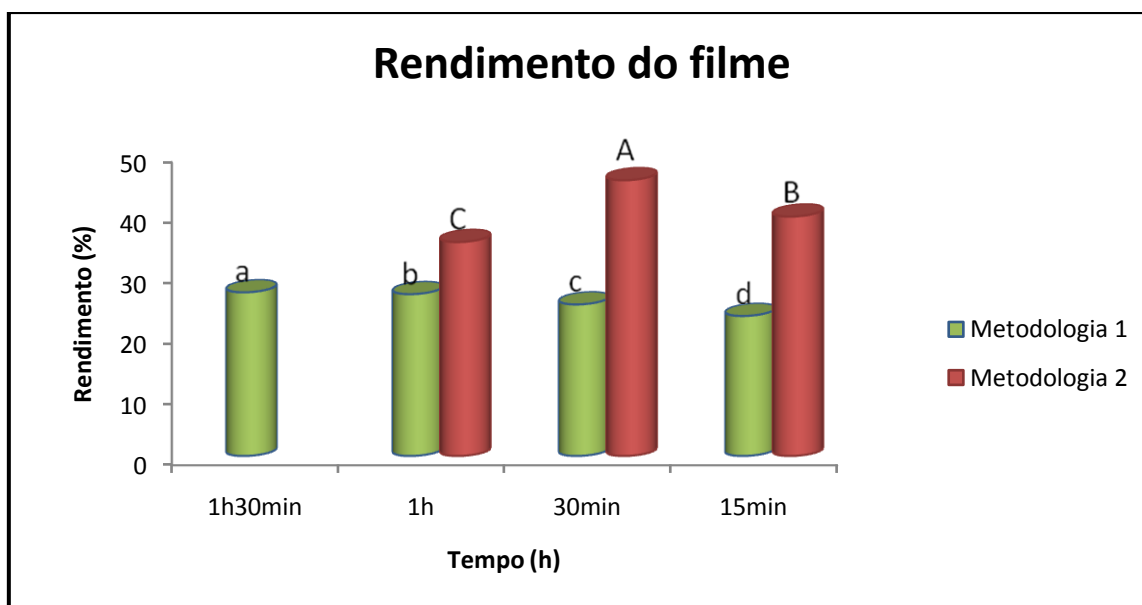
Os resultados da metodologia 2, mostraram que todos os filmes formados apresentaram textura flexível, no entanto o tempo de agitação teve uma influencia perceptível na textura do filme. O filme extraído com a agitação de 1h apresentou a textura mais maleável e a agitação de 15min a menos maleável. O tempo de agitação não influenciou na cor do filme obtido. E a cor amarelada obtida para todos os filmes não é a cor desejada para este tipo de matéria prima (PHB).

Comparando-se os resultados obtidos pelos dois métodos de extração pode-se afirmar que a textura maleável observada nos filmes foi bastante semelhante nos dois métodos de extração. A flexibilidade do filme foi proporcional ao tempo de agitação, pois quanto maior e menor tempo de agitação obteve-se um filme mais flexível e menos flexível, respectivamente. Assim, a aparência apenas diferiu na coloração, de modo que os filmes obtidos pela metodologia 1 (Figura 6) apresentaram-se mais esbranquiçados, e os obtidos pelo método de extração 2 (Figura 7) encontraram-se amarelados. Para solucionar o problema da coloração, possivelmente seja necessária uma filtração após a separação de fases no funil de decantação.

Os filmes formados foram utilizados na caracterização por espectroscopia no infravermelho e calorimetria diferencial de varredura, bem como no rendimento da extração do biopolímero.

### 4.3 DETERMINAÇÃO DE RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DO BIOPOLÍMERO

Os rendimentos da extração dos biopolímeros para os filmes obtidos através das duas metodologias de extração utilizadas podem ser observados na Fig. 8.



**Figura 8** - Porcentagem de rendimento dos filmes utilizando as metodologias de extração com papel filtro (1) no intervalo de tempo de 1h30min – 15min, e com funil de decantação (2) no intervalo de tempo de 1h – 15min. Letras minúsculas e maiúsculas diferentes significam que as médias da metodologia 1 e 2 diferiram estatisticamente, respectivamente, pelo teste de Tukey  $p < 0,05$ .

Utilizando a metodologia 1 o rendimento foi 27; 26,7; 25 e 23,1% para os tempos de extração de 1h30min, 1h, 30min e 15min, respectivamente. Pode-se perceber que o rendimento foi proporcional ao tempo de extração, pois para o maior e menor tempo obteve-se o maior e o menor rendimento respectivamente.

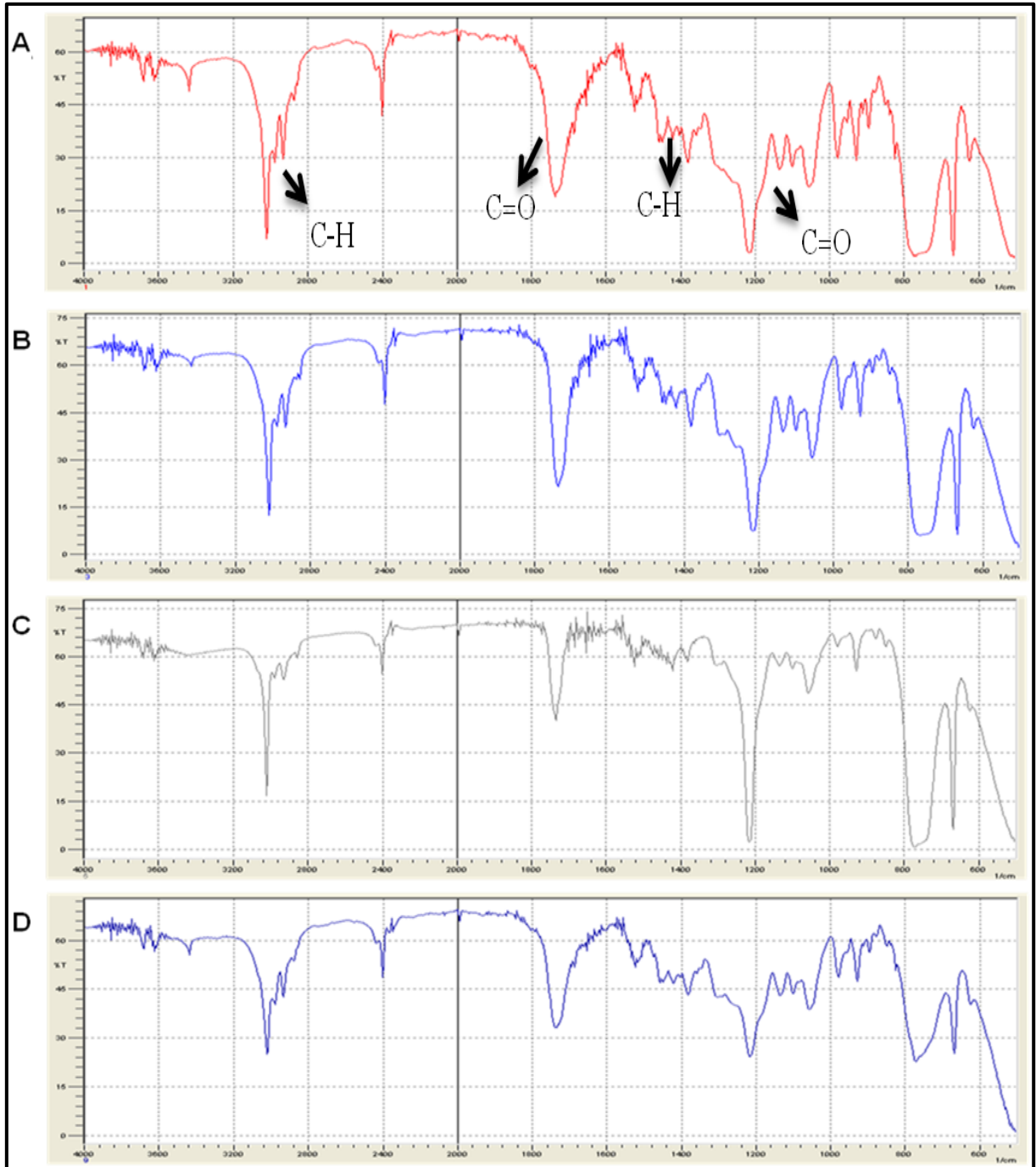
Já para a metodologia 2 a porcentagem de rendimento não foi proporcional ao tempo de extração. O melhor rendimento, 45,5%, foi obtido no tempo de 30min, seguido do de 15min com a porcentagem de 39,5% e o menor rendimento para esta metodologia foi obtido pela extração em 1h, 35,3%.

Ao comparar as duas metodologias verificou-se que nas duas metodologias todos os tempos diferiram estatisticamente e os melhores rendimentos foram obtidos através da metodologia 2, utilizando o funil de decantação para a separação da massa celular do clorofórmio, independentemente do tempo de extração. O menor

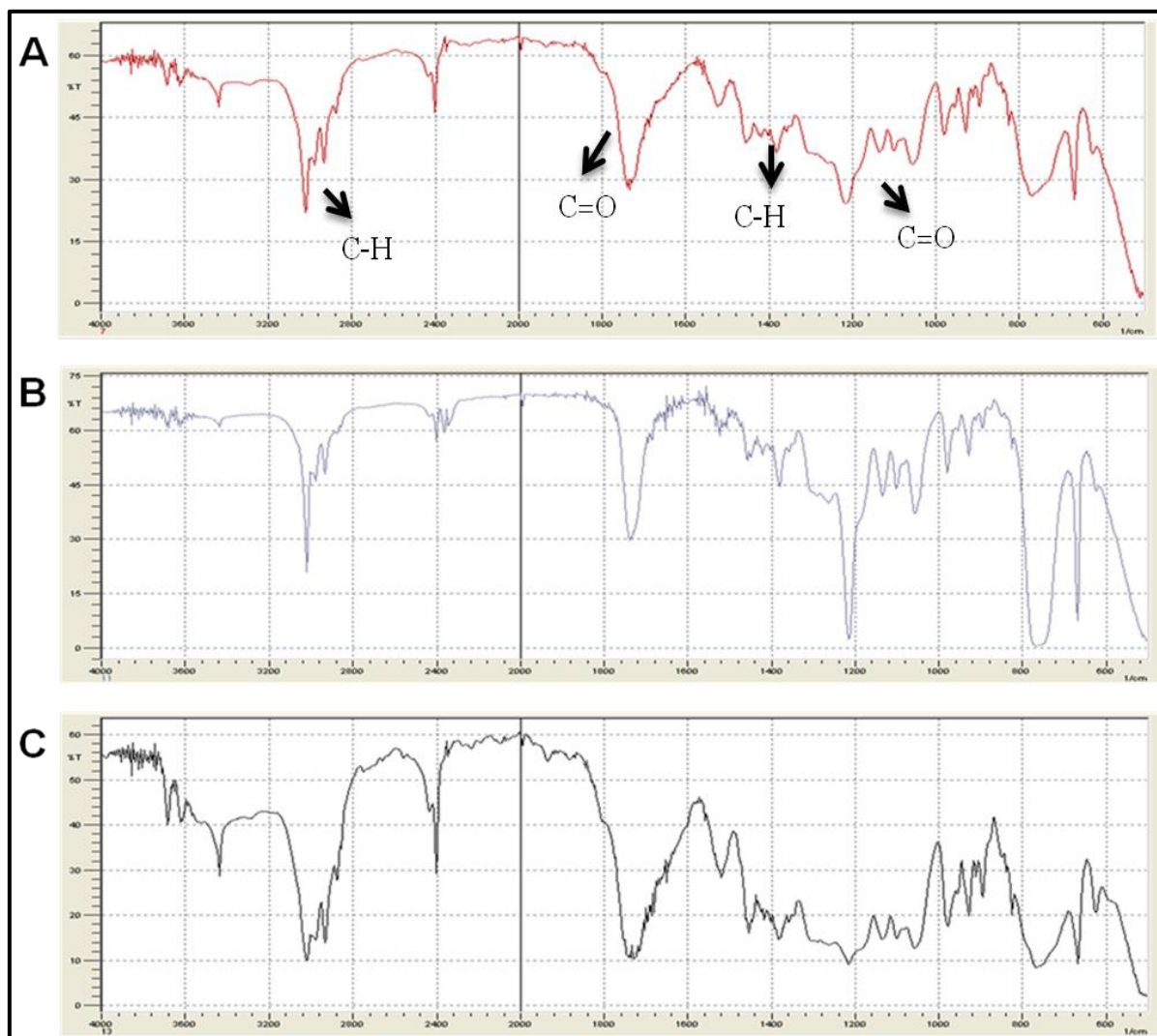
rendimento da metodologia 2 foi aproximadamente 8 pontos maior que o melhor rendimento da metodologia 1.

#### **4.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)**

A identidade química do filme formado a partir do polímero extraído foi confirmada por Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR). As principais bandas obtidas foram analisadas e o espectro FT-IR é mostrado nas Fig. 9 (amostras da metodologia 1) e 10 (amostras da metodologia 2). Foram obtidas bandas características de P(3HB) para as sete amostras analisadas.



**Figura 9** - Espectro FT-IR para os polímeros extraídos pela metodologia 1 com os tempos de agitação de (A) 1h30min, (B) 1h, (C) 30min e (D) 15min.



**Figura 10** - Espectro FT-IR para os polímeros extraídos pela metodologia 2 com os tempos de agitação de (A) 1h, (B) 30min e (C) 15min.

Os espectros apresentam as bandas características do P(3HB): as bandas de intensidade média encontradas próximas a  $3000\text{cm}^{-1}$  correspondem a deformação axial assimétrica e simétrica da ligação C-H no grupo metil e deformação assimétrica da ligação C-H no grupo metileno em  $2933\text{cm}^{-1}$ . A presença de bandas em  $1721\text{-}1727\text{cm}^{-1}$  é devido a deformação axial da ligação C=O no grupo éster. A banda média encontrada em  $1454\text{-}1459\text{cm}^{-1}$  corresponde a deformação assimétrica da ligação C-H nos grupos  $\text{CH}_2$ , enquanto a banda média encontrada em  $1378\text{cm}^{-1}$  é equivalente a esta deformação nos grupos  $\text{CH}_3$ . Já a banda de intensidade forte próxima a  $1281\text{cm}^{-1}$  é devido a deformação axial da ligação C-O no grupo éster. A série de bandas intensas localizadas entre  $1250\text{-}950\text{cm}^{-1}$  também correspondem a estiramento da ligação C-O do grupo éster. As bandas

características identificadas no biopolímero obtido neste estudo estão de acordo com os reportados na literatura por Khardenavis et al. (2007), Lugg et al. (2008) e Crochemore (2010), para P(3HB).

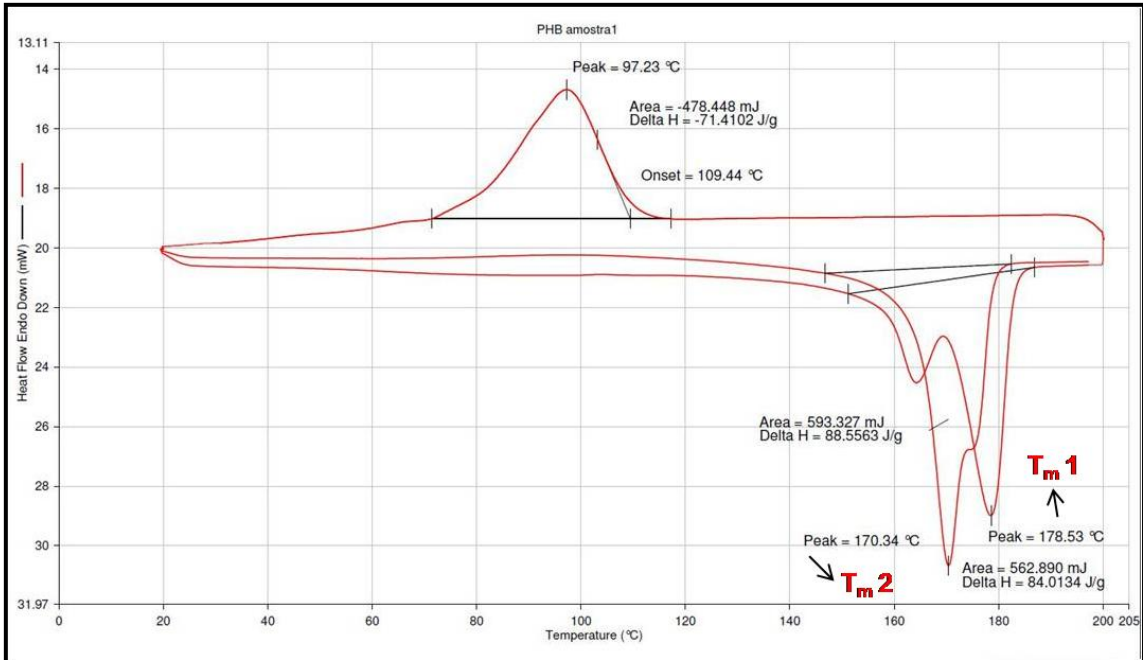
#### 4.5 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

Todas as amostras apresentaram dois picos endotérmicos no primeiro aquecimento. O pico de menor intensidade ocorre próximo a 162°C, enquanto que as temperaturas  $T_m$  correspondentes aos picos de maior intensidade dos polímeros foram, respectivamente: PHB amostra A (179°C), amostra B (177°C), amostra C (179°C), amostra D (178°C).

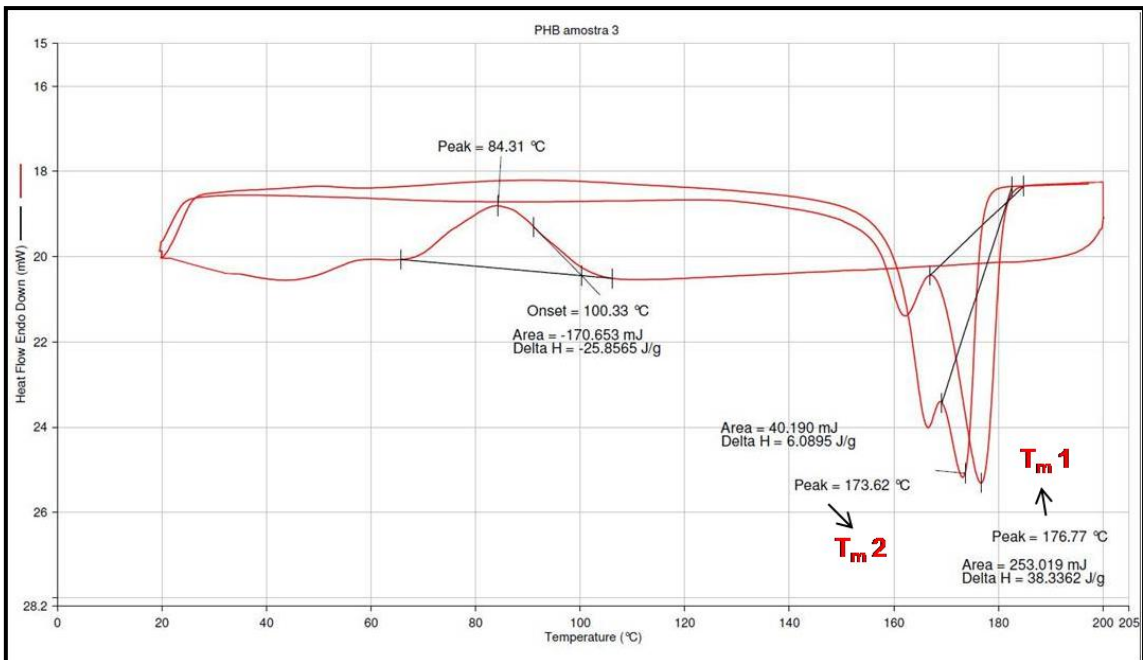
No segundo ciclo de aquecimento, ou seja, eliminando a história prévia de cristalização do material, pode-se observar a alteração dos picos endotérmicos. A amostra B apresentou dois picos endotérmicos em temperaturas menores àquelas observadas no primeiro aquecimento (166°C – de menor intensidade e 174°C – de maior intensidade). As amostras A, C e D apresentaram um pico de fusão com ombro, cujas temperaturas  $T_m$  também foram menores do que aquelas observadas no primeiro aquecimento. As temperaturas de fusão determinadas para essas amostras foram, respectivamente, 170°C, 176°C e 175°C. Os resultados podem ser observados na tab. 1 e Fig. 11, 12, 13 e 14.

**Tabela 1** - Propriedades térmicas de P(3HB).

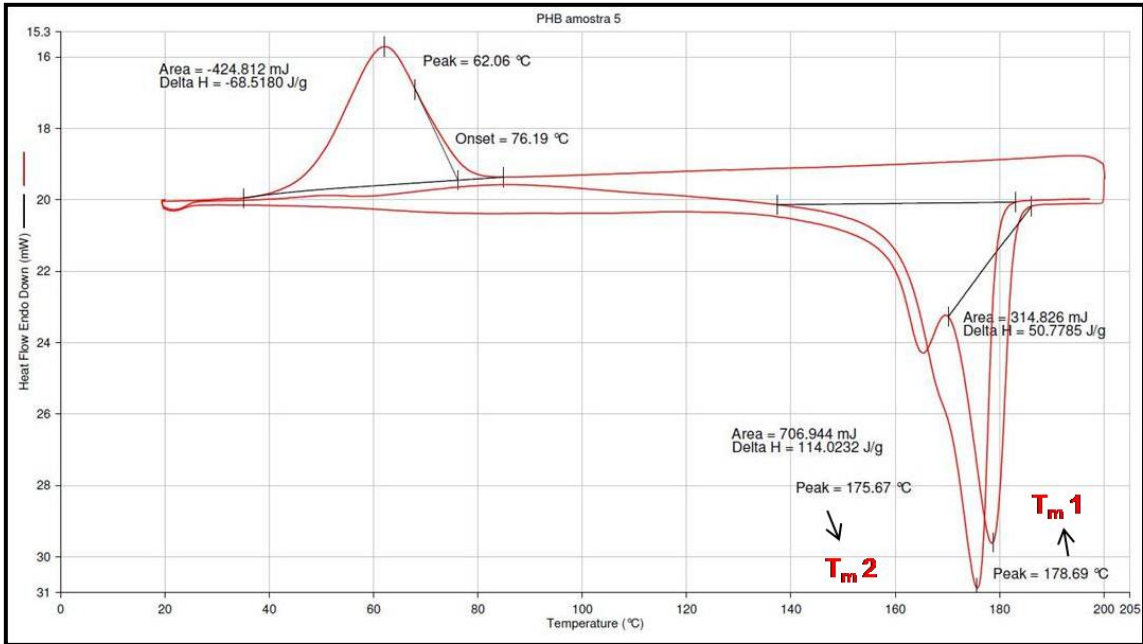
| <b>Amostras de PHB</b>                       | <b><math>T_m</math> (°C) 1</b> | <b><math>T_m</math> (°C) 2</b> |
|--|--------------------------------|--------------------------------|
| <b>P(3HB) Sigma (Crochemore et al. 2012)</b> | 170                            | 148                            |
| <b>A</b>                                     | 179                            | 170                            |
| <b>B</b>                                     | 177                            | 174                            |
| <b>C</b>                                     | 179                            | 176                            |
| <b>D</b>                                     | 178                            | 175                            |



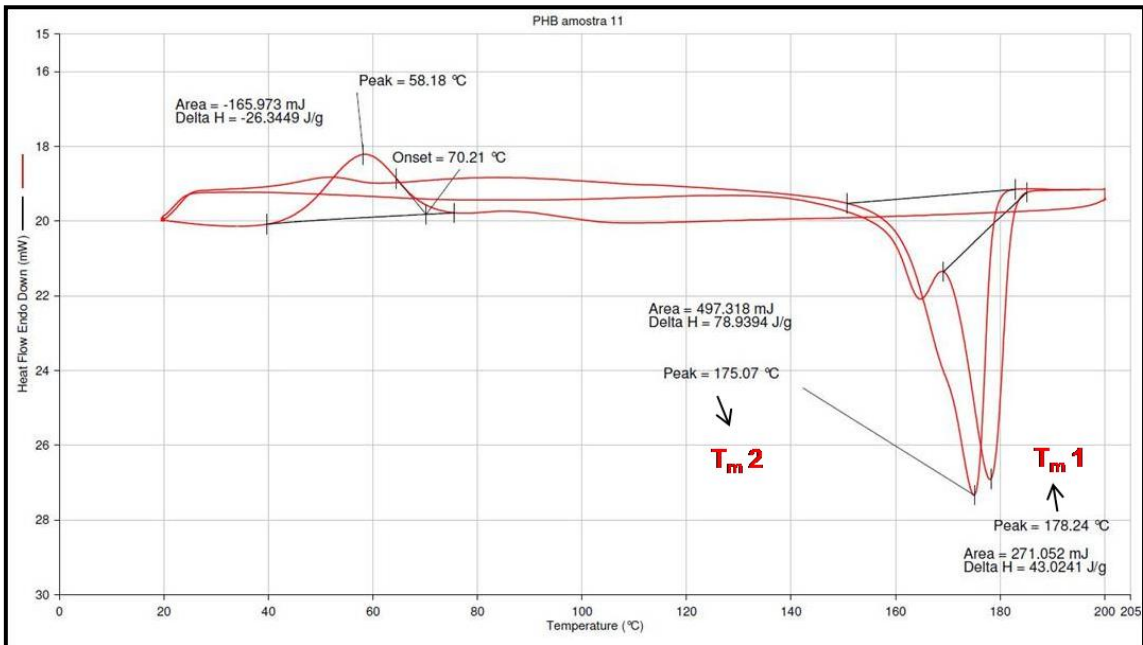
**Figura 11** - Curva DSC do polímero extraído pela metodologia 1 no tempo de 1h30min – amostra A.



**Figura 12** - Curva DSC do polímero extraído pela metodologia 1 no tempo de 1h – amostra B.



**Figura 13** - Curva DSC do polímero extraído pela metodologia 1 no tempo de 30 min – amostra C.



**Figura 14** - Curva DSC do polímero extraído pela metodologia 1 no tempo de 15min – amostra D.



Apenas o P(3HB) comercial Sigma e a amostra A apresentaram  $T_m$  inferiores aos valores da literatura, onde todas as outras temperaturas encontraram-se dentro do intervalo literário que é de 174°C a 180°C para P(3HB) (ANDERSON & DAWES, 1990; GOMEZ & BUENO NETO, 1997).

Crochemore e colaboradores (2012) utilizaram a mesma metodologia de extração com clorofórmio para cepas de *Pseudomonas* degradadoras de agrotóxicos e encontraram o valor de  $T_m$  do P(3HB) comercial Sigma 170 e 148°C no primeiro e segundo ciclo respectivamente; os valores de suas amostras encontram-se no intervalo de 164-168°C no primeiro ciclo e 131-156°C para o segundo ciclo, ou seja, valores de temperatura inferiores aos encontrados neste trabalho. Já Dalcanton (2006) extraiu PHB de *Ralstonia eutropha* e encontrou valores similares aos deste trabalho, a  $T_m$  dos bioplásticos tem valores de 175 a 176,3°C e 176,3°C para o padrão.

## 5. CONCLUSÃO

- As metodologias de extração empregadas possibilitaram a obtenção de filmes poliméricos em todos os tempos e formas de separação.
- Os filmes obtidos tiveram a identidade química característica de P(3HB) e temperaturas de fusão correspondentes às relatadas na literatura.
- O tempo de agitação para extração pode ser reduzido para 30min para as duas metodologias.
- A metodologia 1 deve ser usada quando cor for requisito principal, e a metodologia 2 quando o rendimento for prioridade.

## 6. REFERÊNCIAS

ALVES, F. A.; KLAIC, P. M. A.; RODRIGUES, A. A.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Estabilidade do Caldo Fermentado por *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* após Armazenamento. **Revista brasileira de tecnologia agroindustrial**, v. 3, p. 77-85, 2009.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Review**, v. 54, p. 450-472, 1990.

BORSCHIVER, S., ALMEIDA, L. F. M., ROITMAN, T. Monitoramento Tecnológico e Mercadológico de Biopolímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, nº 3, p. 256-261, 2008.

BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Tibtech**, v. 5, p. 246-250, 1987.

CANEVAROLO, S. V. **Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. São Paulo: ArtLiber Editora. p. 183, 2007.

CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 621-632, 2010.

COSTA NETO, C. **Análise Orgânica – Métodos e procedimentos para a caracterização de organoquímicos**. Editora UFRJ, Rio de Janeiro, v. 2, 2005.

COUTINHO, B. C., MIRANDA, G. B., SAMPAIO, G. R., SOUZA, L. B. S., SANTANA, W. J., COUTINHO, H. D. M. A importância e as vantagens do polihidroxi-butirato (plástico biodegradável). **Holos**, Ano 20, 2004.

CROCHEMORE, A. G. **Bioprospecção de espécies de *Pseudomonas* isoladas de solo de várzea subtropical do Rio Grande do Sul para produção de Polihidroxi-butirato**. 2010. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciência) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

CROCHEMORE, A. G.; MATTOS, M. L. T.; VENDRUSCOLO, C. T.; CASTRO, L. A. S.; MOREIRA, A. S. Identification of pesticide-degrading *Pseudomonas* strains as poly- $\beta$ -hydroxybutyrate producers. **African Journal of Biotechnology**. v. 11(85), p. 15144-15149, 2012.

DALCANTON, F. **Produção, Extração e Caracterização de Poli(3-Hidroxi-butirato) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos**. 2006. Florianópolis. Dissertação (Mestrado em Engenharia de alimentos) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina.

EUZÉBY, J. P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: < <http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html>>. Acesso em: 14 jan. 2011.

FIORESE, M. L. **Estratégias de cultivo e recuperação e caracterização de poli(3-hidroxi-butirato) produzido por *Ralstonia eutropha***. 2008. 199f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GALEGO, N., ROZSA, C., SÁNCHEZ, R., FUNG, J., VÁSQUEZ, A., TOMÁS, J. S. Characterization and application of poly ( $\beta$ -hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. **Polymer Testing**, v. 19, p. 485-492, 2000.

GARCIA, M. C. F. **Proposta de um processo de extração de poli(3-hidroxi-butirato) produzido por *Cupriavidus necator* e seu efeito sobre as características do polímero.** Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

GOMEZ, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v.17, p.24-29, 1997.

HOLMES, P. A. Applications of PHB – A microbially produced biodegradable thermoplastic. **Physcal Technology**, v. 16, p. 32-36, 1985.

JACQUEL, N. et al. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). **Biochemical Engineering Journal**, v.39, p. 15-37, 2008.

JENDROSSEK, D.; SELCHOW, O.; HOPPERT, M. Poly(3-Hydroxybutyrate) Granules at the Early Stages of Formation Are Localized Close to the Cytoplasmic Membrane in *Caryophanon latum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 586-593, 2007.

KESSLER, B.; WITHOLT, B. Factors involved in the regulatory network of poly-hydroxyalkanoate metabolism. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 97-104, 2001.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A.K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 607-619, 2005.

KHARDENAVIS, A. A., KUMAR, M. S., MUDLIAR, S. N., CHAKRABARTI, T. Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, poly  $\beta$ -hydroxybutyrate. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3579-3584, 2006.

KUNASUNDARI, B., SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. **Express Polymer Letters**, v. 5, n° 7, p. 620–634, 2011.

LEE, S. Y. et al. Improvement of hydroxyvalerate fraction in poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate) by a mutant strain of *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, p. 255-258, 1996.

LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 1-14, 1996a.

LEE, S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Tibtech**, v. 14, p. 431-438, 1996b.

LELLIOT, R. A.; STEAD, D. E. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. **Palo Alto**, Blackwell, 1 ed., v. 216, p. 171-172, 1987.

LUENGO, J. M.; GARCÍA, B.; SANDOVAL, A.; NAHARROY, G.; OLIVEIRA, E. R. Bioplastics from microorganisms. **Current Opinion in Microbiology**, n. 6, p. 251-260, 2003.

LUGG, H., SAMMONS, R. L., MARQUIS, P. M., HEWITT, C. J., YONG, P., PATERSON-BEEDLE, M., REDWOOD, M. D., STAMBOULIS, A., KASHANI, M., JENKINS, M., MACASKIE, L. E., Polyhydroxybutyrate accumulation by a *Serratia* sp.. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 481-491, 2008.

MADISON, L. L., HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 21-53, 1999.

MEHAN, V. K.; LIAO, B. S.; TAN, Y. J.; ROBINSON-SMITH, A.; McDONALD, D.; HAYWARD, A. C. Bacterial wilt of Groundnut. Patancheru: Internacional Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. **Information Bulletin**, 35, p.28, 1994.

MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; GIL-TUNES, C.; VENDRUSCOLO, C. T. Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 469-474, 2001.

NASCIMENTO, J. F. **Estudo da processabilidade e da caracterização do poli (ácido 3- hidroxibutirico) - PHB obtido a partir de cana-de-açúcar.**

Campinas, SP. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química Universidade Estadual de Campinas.

OEDING, V., SCHLEGEL, H. G.  $\beta$ -ketothiolase from *Hydrogemonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism. **Biochemical Journal**, v. 134, p. 239-248, 1973.

OLIVEIRA, C. **Produção de polihidroxibutirato: bioprospecção de *Beijerinckia* sp. da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros do CDTec - UFPel.** 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

PIEMOLINI, L. T. **Modelagem estrutural da PHA sintase de *C. violaceum* para estudos de mutação sítio-dirigida.** 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, UFSC, Florianópolis.

PRADELLA, J. G. C. - **“Biopolímeros e Intermediários Químicos”**, relatório técnico nº 84396-205, Centro de Tecnologia de Processos e Produtos, Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP. 2006.

POPULATION REFERENCE BUREAU. GUIDE DE DÉMOGRAPHIE DU POPULATION REFERENCE BUREAU. Disponível em: <[http://www.prb.org/pdf/Pop\\_Handbook\\_Fr.pdf](http://www.prb.org/pdf/Pop_Handbook_Fr.pdf)>. Acesso em: 8 de maio de 2012.

QUEIRÓZ, J. H., MAUGERI, F. Otimização da produção de dextrana-sacarose de *Leuconostoc mesenteroides* a partir de melaço como fonte de carbono. **Revista de Microbiologia**, v. 20, p. 150-156, 1989.

RAMSAY, J.A., BERGER, E., VOYER, R., CHAVRIE, C., RAMSAY, B. A. Extraction of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate using chlorinated solvents. **Biotechnology Techniques**, v.8, p. 589-584, 1990.

RAVEN, P. H. Biology of plants. **New York: Worth Publisher**, p.728, 1996.

REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI, T.; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 137-146, 2003.

SERAFIM, L. S., LEMOS, P. C., LEVANTESI, C.; TANDOI, V.; SANTOS, H.; REIS, M. A. M. Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 51, p. 1 – 18, 2002.

SCHLEGEL, H. G., KALTWASSER, H., GOTTSCHALK, G. A submersion method for culture of hydrogen-oxidizing bacteria: growth physiological studies. **Archives of Microbiology**, v. 1, p. 38:209–222, 1961.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSIER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Editora Guanabara Dois, 2007.

SPIER, V. C. **Caracterização espectroscópica e cromatográfica de copoliésteres biodegradáveis**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade do Estado de Santa Catarina.

STEINBÜCHEL, A., VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 128, p. 219-228, 1995.

SUDESH K., ABE H., DOI Y.: Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 25, p. 1503–1555, 2000.



SUDESH, K.; MAEHARA, A.; GAN, Z.; IWATA, T.; DOI, Y. Direct observation of polyhydroxyalkanoate granule-associated-proteins on native granules and on poly(3-hydroxybutyrate) single crystals by atomic force microscopy. **Polymer Degradation and Stability**, v. 83, p. 281–287, 2004.

SUTHERLAND, I. W. Extracellular polysaccharides. *In*: A Multivolume Comprehensive Treatise Biotechnology. 2ed. (Rehm, H.J. and Reed, G. eds), p. 613-657. Weinheim :VHC, 1996.

TSUGE, T. Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.94. n.6, p. 579-584, 2002.

YABUUCHI, E.; KOSARO, Y.; OYIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v. 36, n. 12, p. 1251-1275, 1992.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff, 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. **Microbiology Immunology**, v. 39, n. 11, p. 897-904, 1995.