

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec

Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

ANÁLISE DE DEGRADAÇÃO EM SOLO DE POLI(3-
HIDROXIBUTIRATO) PRODUZIDO POR *Ralstonia*
solanacearum

Bruno Moisés de Matos

Pelotas, 2015

BRUNO MOISÉS DE MATOS

**Análise de Degradação em solo de Poli(3-hidroxi-butirato) produzido por
*Ralstonia solanacearum***

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

Orientador Acadêmico: Prof. Dra. Patrícia Diaz de Oliveira
Orientador de Estágio: Prof. Dra. Angelita da Silveira Moreira

Pelotas, 2015

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M433a Matos, Bruno Moisés de
 Análise de degradação em solo de poli (3-hidroxi-
 butirato) produzido por *Ralstonia solanacearum* / Bruno Moisés de
 Matos. – 66f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação
 em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro
 de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2015. – Orientadora
 Patrícia Diaz de Oliveira.

 1.Biotecnologia. 2.*Ralstonia solanacearum*.
 3.Biopolímeros. 4.Poli (3-hidroxi-
 butirato). 5.Fermentação.
 6.Biodegradabilidade. 7.Degradação. I.Oliveira, Patrícia Diaz
 de. II.Título.

CDD: 631.47

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Patrícia Diaz de Oliveira

Msc. Karine Laste Macagnan

Msc. Victoria de Moraes Gonçalves

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus pelas oportunidades, dificuldades e pelo crescimento que esse período de graduação me proporcionou, e à Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realização da Graduação em Biotecnologia.

À minha orientadora acadêmica e professora, Patrícia Diaz de Oliveira, e à minha orientadora de estágio, professora Angelita da Silveira Moreira, pelo aceite em me orientar durante o Estágio e Trabalho de Conclusão de Curso de forma tão inesperada, porém calorosa.

À minha banca, Dra. Patrícia Diaz de Oliveira, Msc. Karine Laste Macagnan e Msc. Victória de Moraes Gonçalves, pela participação nessa etapa essencial para a minha formação.

A todos os integrantes do Laboratório de Biopolímeros, Karine, Mariane, Victória, Júlia, Vanessa, Andiará, Ana, Audrey, Matheus e Dener pela acolhida e amizade que criei nesse curto período e certamente irá durar.

À todos os meus demais professores que de algum modo fizeram parte da minha formação, em especial à Professora Cláudia Pinho Hartleben, a quem eu nunca esquecerei e sem a qual eu não teria encontrado meu caminho profissional durante esses 4 anos.

Ao Laboratório de Bacteriologia, pela disponibilização de espaço para instalação do experimento de degradação.

A todos os meus amigos presentes durante minha graduação e hoje presentes na minha vida nos momentos bons e ruins, em especial à Marina pela parceria e amizade inestimáveis.

À minha família querida, pelo apoio e palavras de carinho sempre que precisei, mesmo de tão distante. Sem vocês eu não teria chegado nem à metade, vocês são a melhor família do mundo!

A TODOS VOCÊS MEU MUITO OBRIGADO!

Resumo

DE MATOS, Bruno Moisés. ANÁLISE DE DEGRADAÇÃO EM SOLO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) DE *Ralstonia solanacearum*. 2015. 66 FOLHAS. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Atualmente, esforços em prol do meio ambiente tem se tornado um foco importante de investimentos e pesquisas, destacando-se a substituição de plásticos derivados do petróleo por opções biodegradáveis e biocompatíveis que perdurem menos tempo na natureza e, assim, gerem menos impacto ambiental. Os polidroxialcanoatos (PHAs) são polímeros produzidos por bactérias em situações de excesso energético, servindo como reserva em situações desfavoráveis ao crescimento. O poli(3-hidroxitirato), P(3HB), é o mais estudado dentre os PHAs, e possui propriedades que possibilitam sua aplicação como substituto direto do polipropileno (PP). O objetivo deste trabalho foi analisar a degradação do P(3HB) sintetizado por *Ralstonia solanacearum* em condições variáveis de solo. O rendimento da produção de P(3HB) foi determinado, bem como o consumo de glicose pela bactéria durante a fase de produção. A extração do polímero foi realizada com solvente orgânico clorofórmio, e os filmes poliméricos produzidos geraram 64 amostras que foram aplicadas em quatro condições de solo diferentes, as quais são: controle; solo comum; solo inoculado com *R. solanacearum* e solo inoculado com *Bacillus megaterium*. Outras 64 amostras de P(3HB) comercial foram produzidas e submetidas à degradação como comparativo. As amostras foram retiradas do solo, em triplicata, após um período de 30 dias, tendo sua perda de massa total e espessura mensuradas. Os demais períodos de 60, 90, 120 e 150 dias terão suas análises realizadas futuramente. Os resultados demonstraram que não houve variação estatística na massa das amostras de P(3HB) nos 30 primeiros dias de experimento, pressupondo-se que o processo degradativo começará no decorrer do experimento.

Palavras-chave: Biopolímeros; Poli(3-hidroxitirato); Fermentação; *Ralstonia solanacearum*; Biodegradabilidade; Degradação.

Abstract

DE MATOS, Bruno Moisés. ANALYSIS OF DEGRADATION IN SOIL OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) FROM *Ralstonia solanacearum*. 2015. 66 PAGES. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Currently efforts for the environment has become a major focus of investment and research, especially replacing of petroleum plastics by biodegradable and biocompatible options, that last less time in nature and thus generate less environmental impact. The polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polymers produced by bacteria when in energy excess, serving as a reserve in opposite situations. The polyhydroxybutyrate [P(3HB)] is the most studied among PHAs, and has properties that enable it's application as a direct replacement for polypropylene (PP). The objective of this work was the degradation analysis of P(3HB) of *Ralstonia solanacearum* in variable soil conditions. The yield of production of P(3HB) was determined, so as the consumption of glucose by bacteria during the production phase (fermentation). The extraction of the polymer was carried with organic solvent, chloroform, and the produced polymer films generated 64 samples, that were applied to 4 different soil conditions: control; common soil; soil inoculated with *R. solanacearum*; Soil inoculated with *Bacillus megaterium*. Other 64 samples of commercial P(3HB) were produced and subjected to degradation as a baseline. The soil samples were taken in triplicate, after a period of 30 days, having a total mass loss and thickness measured. The remaining periods of 60, 90, 120 and 150 days will be analyzed hereafter. The results showed no statistical change in mass of the samples of P(3HB) in the first 30 days of the experiment, assuming that the degradation process will begin during the experiment.

Keywords: Biopolymers; Poly(3-hydroxybutyrate); Fermentation; *Ralstonia solanacearum*; Biodegradability; Degradation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Microscopia Eletrônica de Transmissão demonstrando o acúmulo de PHAs em grânulos citoplasmáticos de <i>Cupriavidus necator</i> .	17
Figura 2	Ilustração das 8 vias conhecidas atualmente ligadas à produção de PHAs por bactérias.	19
Figura 3	Ilustração do <i>operon PhbCAB</i> e respectivas enzimas envolvidas na rota comum de produção de P(3HB).	21
Figura 4	Biodegradação de garrafas de Biopol® em sistema de lodo ativado, incubados por 0, 2, 4, 6, e 8 semanas.	28
Figura 5	Efeito da temperatura sobre a perda de massa molecular do P(3HB) e do P(3HB-co-3HV) através de hidrólise.	30
Figura 6	Variação da massa do P(3HB) em função do tempo decorrido em solo comum.	31
Figura 7	Ilustração de um ciclo fechado ideal de produção de P(3HB).	33
Figura 8	Microscopia Eletrônica de Varredura mostrando o P(3HB) após 0 (A), 30 (B), 60 (C), 90 (D) e 150 (E) dias sob degradação em solo.	35

Figura 9	Análise de consumo de glicose no tempo decorrente da fase de produção de P(3HB)	44
Figura 10	Gráfico de rendimento de produção do P(3HB) em função do tempo decorrido de fermentação.	45
Figura 11	Filmes poliméricos de P(3HB) de <i>Ralstonia solanacearum</i> (A e B) e filme de P(3HB) comercial, obtidos por secagem de solvente	46
Figura 12	Exemplos de amostras de P(3HB) de <i>Ralstonia solanacearum</i> e P(3HB) comercial utilizados no experimento de degradação	46
Figura 13	Variação da massa da triplicata de amostras de P(3HB) de <i>Ralstonia solanacearum</i> em cada um dos solos experimentais utilizados	47
Figura 14	Variação da massa da triplicata de amostras de P(3HB) comercial em cada um dos solos experimentais	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Microrganismos acumuladores de P(3HB).	23
Tabela 2	Varição em gramas da massa da triplicata de amostras expostas à 30 dias de degradação em cada solo experimental.	49
Tabela 3	Médias percentuais de variação de espessura das amostras dos solos experimentais.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PHA – Polihidroxialcanoato

P(3HB) – Poli(3-hidroxiacetato)

PP – Polipropileno

CDTec – Centro de Desenvolvimento Tecnológico

PE – Polietileno

PET – Poli(tereftalato) de etileno

PVC – Poli(cloreto) de vinila

scl-PHA – PHA de cadeia curta, do inglês *short-chain length PHA*

mcl-PHA – PHA de cadeia média, do inglês *medium-chain length PHA*

P(3HB-co-3HV) – Poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato)

P(4HB) – Poli(4-hidroxiacetato)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RNA – Ácido ribonucléico

UV – Radiação ultravioleta

DSC – Calorimetria Diferencial Exploratória

TGA - Termogravimetria

T_g – Temperatura de Transição Vítreia

GPC – Cromatografia de Permeação em Gel

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

AN – Meio ágar nutritivo

YM – Meio *Yeast Mold*

vvm – Circulação em litros de ar/litros de meio a cada minuto

rpm – Rotações por minuto

mm – Milímetro

mg – Miligrama

dL – Decilitro

μm – Micrômetro

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
2. Revisão bibliográfica.....	17
2.1. Biopolímeros.....	17
2.1.1. Polihidroxicanoatos.....	18
2.1.2. Poli(3-hidroxiбутирато).....	22
2.2. Produção de P(3HB).....	25
2.2.1. <i>Ralstonia solanacearum</i>	27
2.3. Extração de PHB.....	28
2.4. Degradação e biodegradação de biopolímeros.....	29
2.4.1. Degradação de P(3HB).....	32
2.4.2. Análises de degradação.....	36
3. Objetivos.....	39
4. Material e Métodos.....	40
4.1. Microrganismos.....	40
4.2. Produção de P(3HB).....	40
4.3. Extração de P(3HB).....	41
4.4. Determinação de rendimento de biopolímero.....	42
4.5. Obtenção de filmes comerciais.....	43
4.6. Experimento de degradação.....	43
4.7. Análises de degradação.....	45
4.7.1. Perda de massa.....	45
4.7.2. Análise de espessura.....	45
5. Resultados e Discussão.....	46
5.1. Inóculo inicial e processo fermentativo.....	46
5.2. Rendimento de Biopolímero.....	47
5.3. Filmes e amostras obtidos.....	48
5.4. Degradação de P(3HB).....	49
6. Conclusões e Perspectivas.....	55
7. Referências.....	56

1. INTRODUÇÃO

A realidade atual da humanidade é de mais de 7 bilhões de pessoas (POPULATION REFERENCE BUREAU, 2015), as quais diariamente e cotidianamente consomem produtos em grande quantidade, muitas vezes, associados à plásticos. O advento moderno trouxe o uso de plásticos derivados do petróleo para diversas aplicações, por sua durabilidade e dinamicidade de aplicação, estando os plásticos hoje presentes em praticamente quaisquer de nossos aparelhos, utensílios, objetos e embalagens descartáveis. O volume de consumo desses materiais gera automaticamente um enorme volume de descarte, o qual polui diretamente o ambiente e demora centenas de anos para decompor-se (LUENGO et al., 2003).

Buscando soluções ecologicamente corretas para o problema, pesquisas tem se voltado para os bioplásticos, plásticos biodegradáveis e biopolímeros microbianos, os quais possuem várias características químicas e físicas similares a alguns derivados fósseis utilizados na indústria (BRITO et al., 2011). Dentre tais candidatos, os polihidroxicanoatos (PHAs) destacam-se por propriedades biológicas importantes, como a rápida biodegradabilidade e biocompatibilidade, ou seja, é um composto atóxico para seres vivos em geral (CHEN, 2010). Tais características permitem que esses polímeros integrem-se aos ciclos biológicos

naturais de elementos como o carbono e o nitrogênio, após sofrerem processo de degradação (LEE, 1996).

O poli(3-hidroxi-butirato) [P(3HB)] é um biopolímero da família dos PHAs, com propriedades muito próximas às do polipropileno (PP) e conhecido por ser produzido por diversas espécies bacterianas, originalmente como reserva carbônica (GOUDA et al., 2001).

Sabendo-se que biopolímeros possuem alta degradabilidade quando comparados a plásticos petrolíferos, faz-se necessário que produtos produzidos sejam padronizados e avaliados quanto a essa propriedade, em diferentes condições (ROSA et al., 2002). A presença de microrganismos que possuam enzimas hidrolíticas, ou mesmo depolimerases específicas, facilita o processo de degradação, gerando assim moléculas que integram-se aos ciclos biológicos (JENDROSSEK & HANDRICK, 2002).

A partir da necessidade de determinação do tempo de degradação do P(3HB) produzido pela bactéria *Ralstonia solanacearum*, foi realizado um experimento no qual, amostras do biopolímero em estudo e de um polímero comercial foram submetidas à degradação em solo e comparadas quanto a seu potencial de degradação, objetivando-se determinar a porcentagem de perda de massa do polímero produzido.

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi realizado durante o período de estágio curricular supervisionado, no período de 5 de agosto a 10 de dezembro de 2015, no Laboratório de Biopolímeros, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Campus Capão do Leão da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), sendo este o período correspondente à realização dos experimentos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BIOPOLÍMEROS

Dentre as substâncias mais utilizadas pelo ser humano, pode-se destacar a presença do petróleo e de seus derivados poliméricos, dentre eles os plásticos, largamente utilizados na indústria, comércio e cotidiano, sendo exemplos, o polipropileno (PP), o polietileno (PE), o poli(tereftalato de etileno) (PET) e o poli(cloreto de vinila) (PVC). Com a população mundial em 7,3 bilhões de pessoas (POPULATION REFERENCE BUREAU, 2015), o consumo desses materiais tem atingido níveis alarmantes, gerando mais de 150 milhões de toneladas de resíduos não biodegradáveis ao ano.

Plásticos de origem fóssil são recalcitrantes para a microbiota do solo em que se encontram, levando mais de 100 anos para se degradar, e mesmo polímeros biodegradáveis disponíveis atualmente ainda demandam maiores avanços na produção e na relação custo benefício (REDDY et al., 2003).

O aumento do preço do petróleo aliado a um avanço da cultura ambiental tem proporcionado olhares de grande interesse a uma classe que pode futuramente substituir os plásticos, os biopolímeros (LUENGO et al., 2003).

Os biopolímeros são materiais formados por monômeros obtidos a partir de um organismo vivo, podendo apresentar diversas propriedades e aplicações, como a alta resistência e biocompatibilidade dos bioplásticos (TORINO, 2015).

Dentre os bioplásticos, mais de 160 tipos de materiais já foram catalogados e analisados (LUENGO et al., 2003), dentre esses os PHAs (SUDESH, 2000), além de outros compostos como amido e blendas poliméricas. Biopolímeros bacterianos são obtidos de forma geral através do metabolismo de diversas bactérias, capazes de converter fontes de carbono em biopolímeros de alta biodegradabilidade e biocompatibilidade e, portanto, possibilidades de larga aplicação na indústria alimentícia e na área da saúde (MOSCOVICI et al., 2015).

Estudos demonstram que é possível elevar a produção de biopolímeros por microrganismos em laboratório a rendimentos de até 90% da massa celular seca (SUDESH, 2000), o que configura grandes possibilidades futuras de produção industrial, em especial bioplásticos, mediante o conhecimento de suas propriedades funcionais como a cristalinidade e resistência, e estabelecimento de produção economicamente rentável.

2.1.1. POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)

Os polihidroxicanoatos são poliésteres sintetizados e acumulados por microrganismos, na forma de grânulos intracelulares de reserva energética e carbônica, que apresentam biocompatibilidade e biodegradabilidade, gerando grandes interesses em sua aplicação (Figura 1) (DOI, 1990).

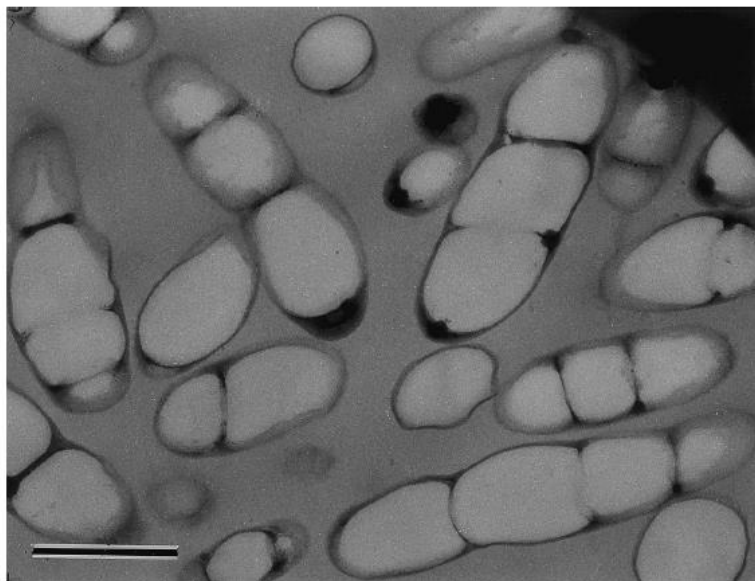


Figura 1 - Microscopia Eletrônica de Transmissão demonstrando o acúmulo de PHAs em grânulos citoplasmáticos de *Cupriavidus necator* (Fonte: SUDESH et al., 2000).

Comumente são formados por cadeias curtas, de 3 a 5 carbonos, denominadas *short-chain length PHA* (cadeias curtas; *scl-PHA*), ou cadeias médias, com 6 a 14 carbonos, denominadas *medium chain length* (cadeias médias; *mcl-PHA*) (JENDROSSEK et al., 2009), compondo a parcela mais estudada dentre os biopolímeros.

A descoberta de como as bactérias são capazes de acumular polímeros se deu em 1923, a partir das pesquisas lideradas por Leimogne, que identificou a presença de ácido 3-hidroxibutírico em culturas de *Bacillus megaterium* lisadas, assim concluindo que a origem do ácido estava no acúmulo de poli(3-hidroxibutirato) no interior das bactérias. Mais tarde, foi descoberto que a indução desse processo

se dava pela alta concentração de carboidratos, juntamente com a ausência ou limitação de um nutriente, como Fósforo, Enxofre ou Nitrogênio, visto que o polímero serve como reserva energética para a bactéria (LEIMOGNE, 1926).

Por apresentarem propriedades suficientemente similares aos plásticos convencionais, ou seja, termoplasticidade, resistência, impermeabilidade e cristalinidade, os PHAs apresentam-se como alternativa viável aos mesmos (MADISON & HUISMAN, 1999; CROCHEMORE et al., 2012).

Dentre os PHAs, o mais estudado é o poli(3-hidroxi-butirato) e suas formas combinadas com outros monômeros, como o poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) [P(3HB-co-3HV)] e o poli(4-hidroxi-butirato) [P(4HB)]. Também outras variantes do P(3HB) foram desenvolvidas a partir da variação do número de carbonos presentes nos monômeros (hidroxipentanoatos, hidroxihexanoatos, hidroxieptanoatos, etc), a fim de alcançar as propriedades desejáveis para a aplicação do biopolímero (REDDY et al., 2003).

Atualmente oito vias metabólicas diferentes são conhecidas na produção bacteriana de PHAs (Figura 2).

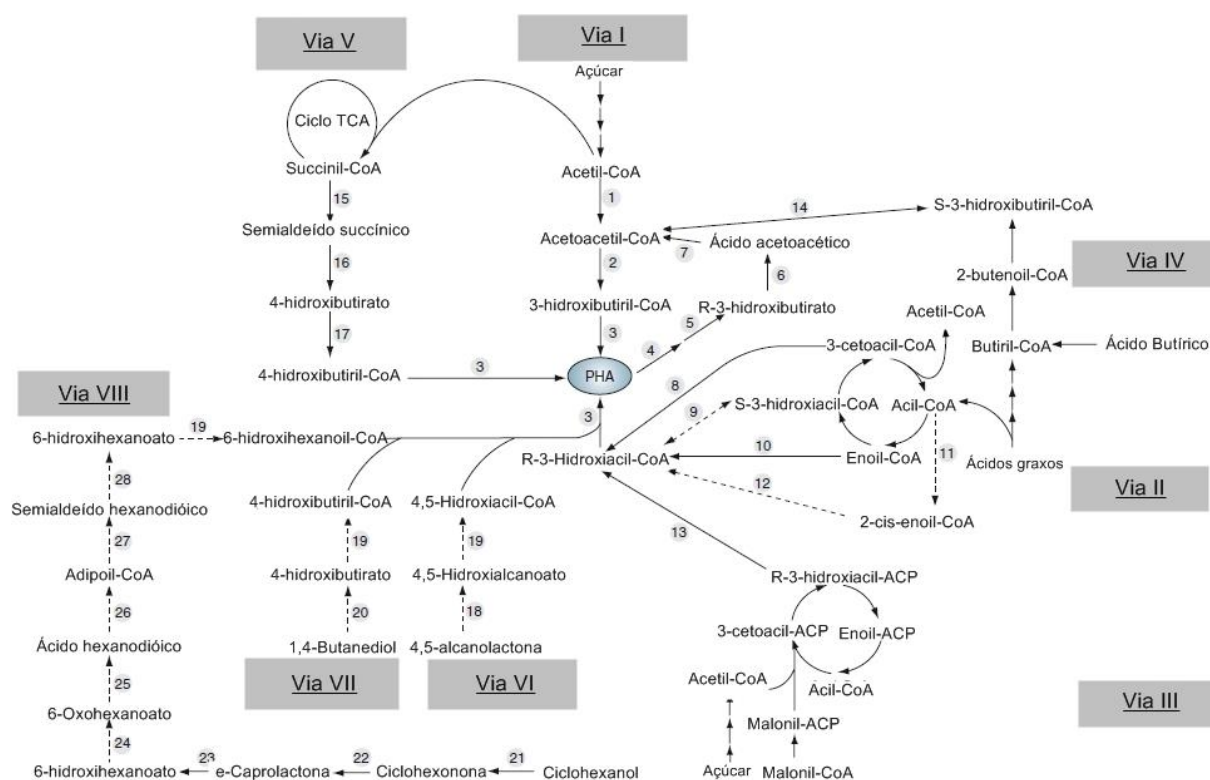


Figura 2 - Ilustração das oito vias metabólicas conhecidas atualmente ligadas à produção de PHAs por bactérias. Adaptado de CHEN et al., 2010.

Tais vias tem como pontos em comum o Acetil-CoA, coenzima responsável por suprir as necessidades de 3-hidroxiacil-CoA às várias vias que o utilizam para formação de PHAs, e as enzimas responsáveis pela síntese dos PHAs, as PHA sintases, em conjunto a outras enzimas componentes dos ciclos metabólicos relacionados. Além das PHA sintases, os microrganismos capazes de produzir PHAs possuem uma depolimerase, que age para a rápida degradação desses polímeros em caso de necessidade energética (CHEN, 2010).

As propriedades dos PHAs variam muito de acordo com a composição dos monômeros constituintes, havendo maior resistência e rigidez em homopolímeros. A cristalinidade varia da mesma forma, dentre 55 e 80% (DOI, 1990; LEE, 1996). Apesar da total biocompatibilidade e biodegradabilidade, alguns PHAs, com exceção do P(3HB), apresentam como problemática de produção o fato de seus pontos de degradação e fusão térmica serem próximos, o que dificulta a modelagem do polímero sem que haja perdas no processo (LEE, 1996).

Dentre os principais obstáculos para a perpetuação dos PHAs como polímeros de aplicação industrial e para o cotidiano, destaca-se o custo produtivo, dependente do rendimento, fonte carbônica e condições operacionais de fermentação, e também os custos relacionados ao processo de extração e obtenção do biopolímero, geralmente dependentes do uso de um solvente orgânico (SUDESH et al., 2011).

2.1.2. POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)

O P(3HB) e seus copolímeros são os poliésteres mais estudados dentre os PHAs, compostos inicialmente de 4 átomos de carbono. Atualmente sua produção é conhecida em cerca de 75 espécies de diversos gêneros como forma de reserva energética e carbônica, a exemplo dos gêneros *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*,

Ralstonia, *Rhizobium*, *Rhodospirillum* e *Pseudomonas*, dentre outros (BHAGOWATI et al., 2015).

Algumas propriedades do P(3HB) são semelhantes às do polipropileno (PP), como insolubilidade em água, alta cristalinidade e alto grau de polimerização, além da proximidade das temperaturas de fusão de ambos (ANDERSON & DAWES, 1990; REDDY et al. 2003). Além disso, os pontos de fusão e degradação do P(3HB) (180 °C e 220 °C, respectivamente) apresentam uma distância térmica suficiente para o manuseio do material sem maiores preocupações com a degradação (DUARTE et al., 2004).

A via metabólica de síntese do P(3HB) mais utilizada é composta de três reações catalisadas por três enzimas diferentes, codificadas pelo *operon PhbCAB* (Figura 3).

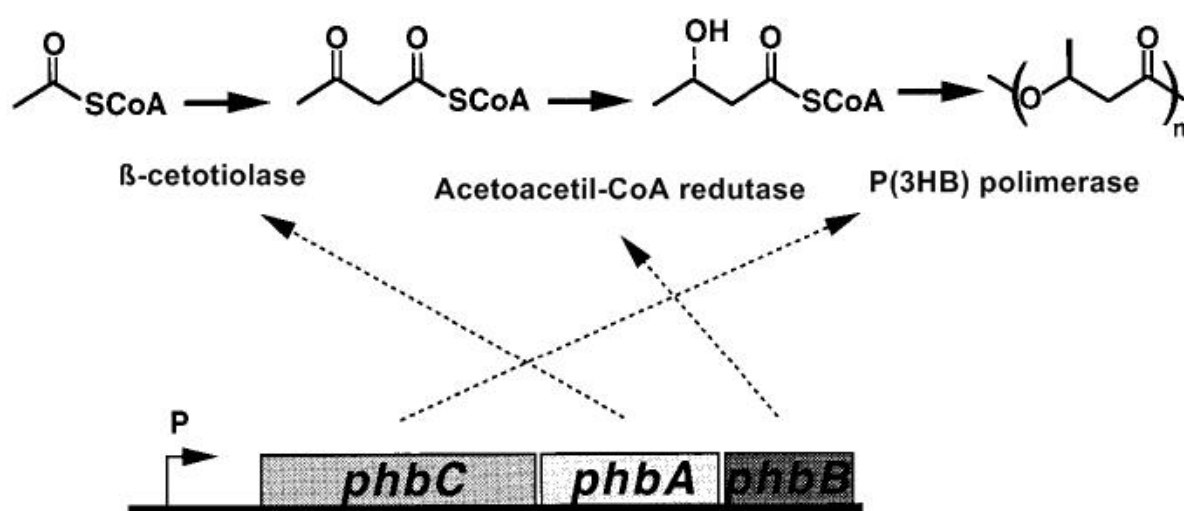


Figura 3 - Ilustração do *operon PhbCAB* e respectivas enzimas envolvidas na rota comum de produção de P(3HB) (MADISON & HUISMAN, 1999).

A primeira reação consiste na condensação de dois Acetil-CoA em Acetoacetil-CoA, catalizada pela enzima β -cetotiolase (gene PhbA). A segunda reação é uma redução, na qual é formado o (R)-3-hidroxi-butiril-CoA através da ação da acetoacetil-CoA redutase (gene PhbB) e por fim, a enzima PHB sintetase (gene PhbC) utiliza os monômeros de (R)-3-hidroxi-butiril na polimerização do P(3HB). O *operon PhbCAB* comumente é precedido de promotores sensíveis à variação de concentração de nutrientes e minerais como fósforo, magnésio, potássio e nitrogênio, motivo pelo qual a restrição de algum desses componentes é comum em protocolos de produção de P(3HB) (MADISON & HUISMAN, 1999).

Além das aplicações relacionadas à substituição de plásticos fósseis na produção de embalagens e recipientes, o P(3HB) também apresenta aplicabilidade nas áreas médica e farmacêutica. Na área médica é aplicado como material biocompatível para moldes e filmes utilizados em processos de tratamento ou cirurgia dentária e óssea. Já na área farmacêutica, tem sido estudado como matéria-prima de sistemas de entrega de fármaco (*drug delivery*) controlado através de microcápsulas, microesferas e filmes de aplicação tópica (BORNATSEV et al., 2007).

2.2. PRODUÇÃO DE P(3HB)

A grande maioria dos gêneros bacterianos, cuja produção de P(3HB) é conhecida, está ilustrada na Tabela 1.

Tabela 1. Lista de alguns dos gêneros acumuladores de P(3HB). Fonte: HA, 2001.

<i>Acinetobacter</i>	<i>Gamphosphaeria</i>	<i>Photobacterium</i>
<i>Actinomycetes</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Halobacterium</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Aphanothece</i>	<i>Hypomicrobium</i>	<i>Rhodobacter</i>
<i>Aquaspirillum</i>	<i>Lamprocystis</i>	<i>Rhodospirillum</i>
<i>Azospirillum</i>	<i>Lampropedia</i>	<i>Sphaerotillus</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>Leptothrix</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Spirulina</i>
<i>Beggiatoa</i>	<i>Methylocystis</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Beijerinckia</i>	<i>Methylosinus</i>	<i>Syntrophomonas</i>
<i>Caulobacter</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Chloroflexus</i>	<i>Microcoleus</i>	<i>Thiocapsa</i>
<i>Chlorogloea</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Thiocystis</i>
<i>Chromatium</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Thiodictyon</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Mycopana</i>	<i>Thiopedia</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Thiospa</i>
<i>Derxia</i>	<i>Nitrococcus</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Ectothiorhodospira</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Xanthobacter</i>
<i>Escherichia</i>	<i>Oceanospirillum</i>	<i>Zoogloea</i>
<i>Ferrobacillus</i>	<i>Paracoccus</i>	

Ademais, atualmente novas alternativas de produção vêm sendo desvendadas, como a utilização de engenharia genética para manipulação produtiva do P(3HB) em bactérias e a utilização de biobalística para implantação de genes de produção em plantas (BHATIA et al., 2015; PARVEEZ et al., 2015).

Em termos gerais, os microrganismos produtores são agrupados de acordo com o tamanho das cadeias poliméricas que produzem, ou ainda, em dois grupos distintos, sendo o primeiro formado pelos microrganismos que, para produção do

biopolímero, dependem da ativação de um promotor ligado a um nutriente que normalmente é limitado durante o processo produtivo, como os gêneros *Ralstonia* e *Bacillus*, e o segundo grupo correspondente às bactérias que não dependem desse fator e produzem o biopolímero durante o crescimento, a exemplo de cepas recombinantes ou engenheiradas de *Escherichia coli* e algumas espécies de *Pseudomonas* (REDDY et al., 2003; BHATIA et al., 2015).

Para a seleção de bactérias produtoras de P(3HB), deve-se levar em consideração fatores relacionados ao rendimento de polímero, como a taxa de crescimento bacteriano, a taxa de consumo de uma fonte de carbono, (preferencialmente de baixo custo), a taxa de síntese polimérica da estirpe em questão e máximo acúmulo de polímero possível, visando um rendimento que viabilize a produção do biopolímero (LEE, 1996). Atualmente, a tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) possibilita também a análise do padrão genético das estirpes produtoras, e assim a determinação de qual cepa possui a genética adequada aos melhores padrões produtivos (KHAN et al., 2013).

Os processos produtivos mais viáveis são realizados com bactérias dependentes de promotores, através de cultivos em uma fase estacionária de crescimento em meio comum com nutrientes em equilíbrio, seguida de uma fase em

meio saturado em fonte de carbono e limitado quanto a um nutriente essencial (Fósforo, Enxofre ou Nitrogênio) (BYROM, 1987; KHANNA & SRIVASTAVA, 2005).

2.2.1. *Ralstonia solanacearum*

A primeira descrição de *Ralstonia solanacearum* se deu em 1896, sendo a bactéria incluída primeiramente no gênero *Pseudomonas* e posteriormente *Burkholderia*. Somente em 1995, YABUUCHI e colaboradores identificaram corretamente a bactéria e a incluíram no gênero *Ralstonia*, de acordo com suas similaridades genômicas quanto à região 16S do RNA ribossômico.

Inicialmente, alguns isolados dessa bactéria foram identificados como fitopatógenos recorrentes. Hoje, sabe-se que mais de 200 espécies de plantas são suscetíveis à infecção, incluindo espécies de alto valor comercial como bananeiras, tomateiros e batateiros (POUEYMIRO, 2009).

A *Ralstonia solanacearum* é uma bactéria bacilar Gram-negativa presente ubiquamente na água e solo, cresce em temperaturas de 25 e 35 °C de acordo com a estirpe. Suas dimensões são próximas de 0,5x1,5 µm e possui diferenças morfológicas dentre isolados virulentos e saprófitas, sendo os últimos dotados de 1 a 4 flagelos, enquanto cepas virulentas não apresentam maquinário de motilidade (MEHAN et al., 1994).

Recentemente, SZNAJDER e colaboradores (2015), concluíram através de análises genômicas e de microscopia que os grânulos de P(3HB) produzidos por *Ralstonia* spp. não são somente uma reserva energética celular como também constituem na verdade uma organela celular especializada, dotada de proteínas catalíticas e enzimas ancoradas à sua membrana superficial, à espera da necessidade metabólica de sua ação (SZNAJDER et al., 2015). O genoma dessas bactérias é bipartido, formado por um cromossomo e um megaplasmídeo, dotado de genes correspondentes à diversas proteínas catabólicas e enzimas hidrolíticas como proteases, pectinases e glucanases (GENIN, 2004).

A produção de P(3HB) por *Ralstonia* spp. apresenta-se como alternativa viável devido à possibilidade de rendimentos acima dos 80% através de processos fermentativos e com diversas fontes carbônicas, havendo alta produção e alto rendimento de biopolímero extraído a partir da adequação das condições de produção à cepa utilizada (BYROM, 1987; KHANNA & SRIVASTAVA, 2005). A via de produção utilizada por essa bactéria é a via I (Figura 2), correspondente ao operon CAB (CHEN, 2010).

2.3. EXTRAÇÃO DE P(3HB)

A maioria dos processos de recuperação de P(3HB) é baseado na compactação celular através de centrifugação, seguida de trituração e solubilização

do *pellet* formado com um solvente orgânico, a exemplo de organoclorados, misturas azeotrópicas e carbonatos cíclicos (RAMSAY, 1994). O clorofórmio é o solvente de uso mais comum, sendo aplicado em processos de decantação juntamente com água para a purificação do biopolímero, e apresentando como vantagem a não degradação do biopolímero a ser extraído pela temperatura aplicada ao processo, problemática encontrada no uso de outros solventes (HENDERSON, 1997).

Outros métodos de extração e purificação de P(3HB) em sido estudados no intuito de diminuir os custos de obtenção do biopolímero, a exemplo do uso de enzimas e outros solventes orgânicos. Digestões enzimáticas intercaladas por lavagens com água apresentam resultados próximos a 50% de rendimento de polímero, tendo como problemática a manutenção da temperatura ideal de reação de cada enzima durante o processo. Já o uso de solventes inorgânicos gera redução de rendimento durante a extração, visto que degradam restos celulares presentes no conteúdo com sucesso, mas também acabam degradando o biopolímero a taxas de até 50% (LEE, 1996).

2.4. DEGRADAÇÃO E BIODEGRADAÇÃO DE POLÍMEROS

Degradação é o processo de perda de propriedades físicas de um material, dependente diretamente das características do mesmo. Esse processo é dependente também de diversos fatores como temperatura, umidade, pH e

microbiota presente no local. O processo ocorre muito lentamente em plásticos sintéticos, aumentando o interesse em blendas poliméricas e polímeros naturais (ROSA & FILHO, 2003).

O processo de degradação pode ocorrer de várias formas de acordo com o agente atuante no mesmo. Seres macroscópicos podem agir no processo através da macrodegradação, diminuindo o tamanho das partículas e assim aumentando a velocidade de seu decaimento (SCOTT & GILEAD, 1995). A radiação incidente sobre o material também tem papel importante nesse processo através da fotodegradação, em especial pela radiação ultravioleta (UV). A degradação química de materiais ocorre quando espécies reativas entram em contato com tal material, gerando radicais livres e diminuindo a estabilidade do composto (RHAGAVAN, 1995). Um exemplo é ilustrado na Figura 4, em que um polímero biodegradável é exposto a um sistema de lodo ativado. Neste caso, o polímero foi totalmente degradado após o período de 8 semanas, após exposto ao sistema de lodo ativado (JENDROSSEK, 2002).

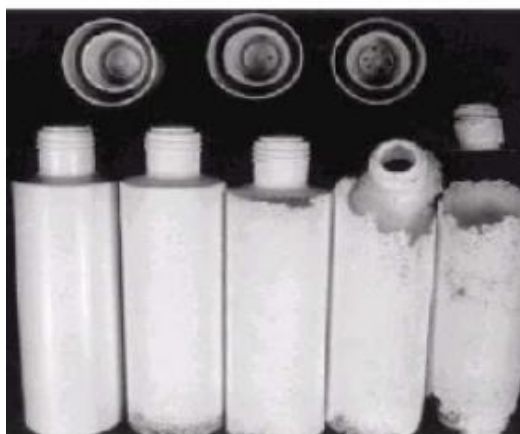


Figura 4 - Biodegradação de garrafas de Biopol® em sistema de lodo ativado, incubados por 0, 2, 4, 6 e 8 semanas. Fonte: JENDROSSEK, 2002.

A degradação abiótica corresponde aos processos de hidrólise e oxidação dos materiais. Na hidrólise, a quebra de ligações entre os carbonos e seus radicais, especialmente quando há presença de ácidos e bases provenientes da microbiota local, aceleram o processo degradativo, processo esse também ligado à oxidação, na qual ocorrem reações de inclusão de oxigênio à molécula em diversos pontos. Por fim essas reações resultam em aumento da instabilidade da molécula e aceleração de seu decaimento (PACHEKOSKI, 2001).

A degradação microbiológica, também conhecida como biodegradação, corresponde à ação de organismos presentes no local, como bactérias e fungos. É independente da presença de oxigênio, mas dependente da presença de micro-organismos e de condições mínimas de temperatura e umidade que permitam o metabolismo microbiológico (HARRIGAN, 2011). Através desse processo, os

materiais são convertidos em compostos mais simples, que por sua vez são reintegrados ao ambiente nos ciclos do carbono, nitrogênio e enxofre. Desses processos também derivam CO₂, CH₄ e alguns componentes microbianos (SCOTT & GILEAD, 1995).

A ação de fungos ocorre através de enzimas, como lipases, invertases, lactases, proteinases e amilases, que hidrolisam compostos. É dependente da presença de oxigênio e libera CO₂ durante o processo, havendo necessidade de compensação na emissão de gás carbônico pela fonte do polímero em questão para que haja viabilidade (RAVEN, et al., 1978). Bactérias, da mesma forma, agem sobre os materiais através de suas enzimas líticas, estando presentes em ambientes aeróbios ou anaeróbios e muitas vezes sendo o único ser a sobreviver em certos locais. Quando há limitação de minerais como nitrogênio, algumas bactérias tendem a acumular carbono em vesículas de reserva de energia (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1991).

2.4.1. BIODEGRADAÇÃO DE P(3HB)

Para evitar o uso de degradantes químicos que poderiam gerar alto impacto ambiental, várias espécies de microrganismos já foram catalogadas por sua capacidade de degradar P(3HB) através de suas enzimas hidrolíticas. Experimentos para medição de hidrólise em P(3HB) foram realizados em 1993, revelando que

temperaturas acima dos 28 °C aumentam exponencialmente a perda de massa do polímero, como ilustrado na Figura 5.

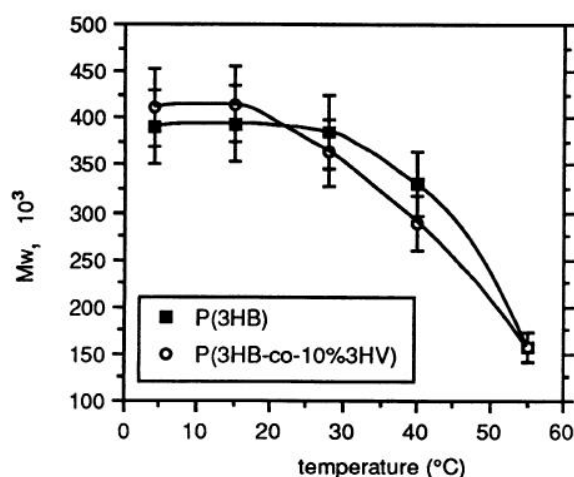


Figura 5 – Efeito da temperatura sobre a perda de massa molecular do P(3HB) e do P(3HB-co-3HV) através de hidrólise. Fonte: MERGAERT, 1993.

Temperaturas altas favorecem também a proliferação bacteriana, sendo a temperatura, portanto, um fator crucial para a aceleração do processo (MERGAERT, 1993). Todas as bactérias que sintetizam e utilizam o P(3HB) como fonte energética são também dotadas de mecanismos de despolimerização na superfície dos vacúolos poliméricos, que auxiliam na degradação.

O tempo médio de degradação de um biopolímero varia de algumas semanas a 2 anos, sendo a degradação do P(3HB) relatada após um período de 60 a 90 dias em condições comuns de solo. A massa molar do polímero tende a aumentar exponencialmente durante os primeiros 60 dias de exposição ao solo e aos microrganismos nele presentes, tanto pela absorção de água quanto pelo

crescimento de colônias bacterianas em contato direto com o material (BRITO, 2011; SCHRÖPFER, 2015). A variação de massa do P(3HB) em função do tempo em solo está representada na Figura 6.

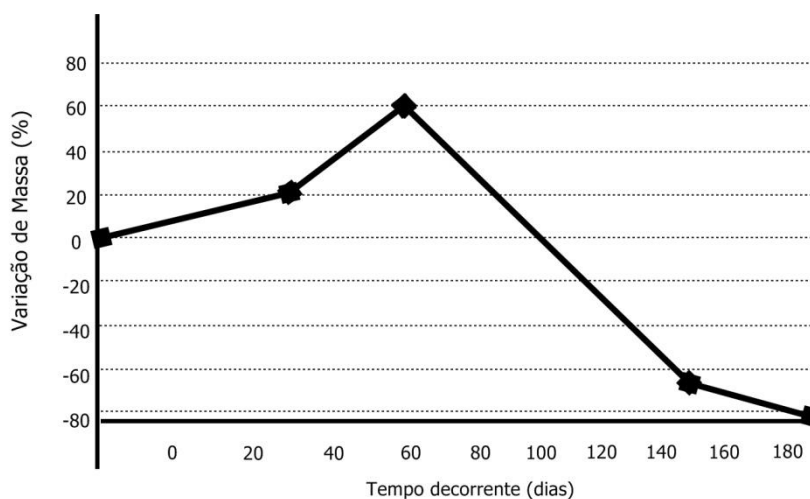


Figura 6 - Variação da Massa do P(3HB) em função do tempo decorrido em solo comum. Adaptado de SCHRÖPFER, 2015.

Os gêneros *Pseudomonas*, *Ilyobacter*, *Bacillus*, *Comamonas* e *Alcaligenes* estão dentre as bactérias ubíquas que, em contato com o P(3HB) podem degradá-lo (JENDROSSEK, 1993). Há interesse especial em bactérias que possuam especificamente enzimas depolimerases, pela possibilidade de obtenção dessas enzimas em forma purificada, e nesse sentido, estudos foram realizados para produção dessas enzimas em cepas engenheiradas (UEFUJI, 1997). Fungos também possuem capacidade de degradação e utilização de compostos carbônicos,

como o P(3HB), em seu metabolismo, em especial espécies do gênero *Aspergillus* (MERUGU, 2012).

Em 1997, Charles e colaboradores identificaram a via do megaplasma de *Rhizobium*, a qual é responsável tanto pela síntese quanto pela degradação de P(3HB) em bactérias do gênero. Sob essa perspectiva, o uso do P(3HB) como substituto de plásticos de origem fóssil também passa a ter valor ambiental, visto que as bactérias do gênero *Rhizobium* são essenciais na manutenção do ciclo do nitrogênio através da simbiose com plantas (CHARLES et al., 1997), além do ciclo do carbono. A Figura 7 ilustra um ciclo fechado de produção do biopolímero e o processamento do carbono durante tal ciclo, desde a formação da fonte carbônica por seres autótrofos até o retorno dos compostos degradados à atmosfera como CO_2 e água.

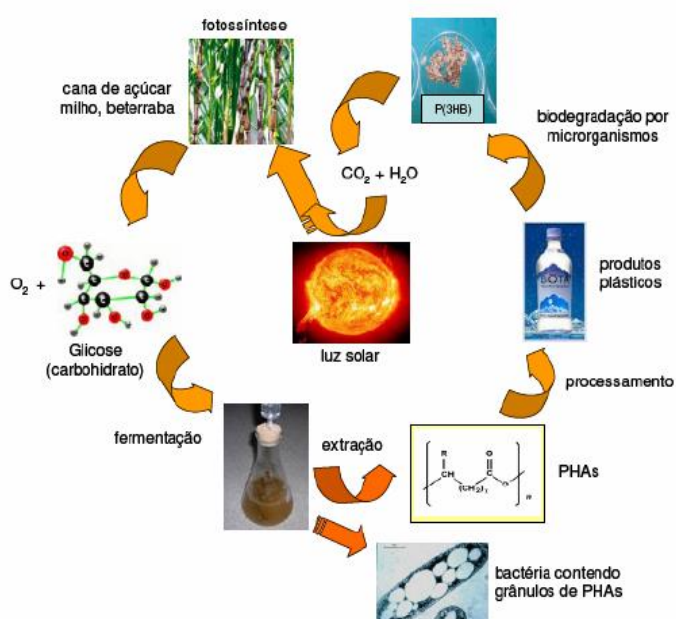


Figura 7 – Ilustração de um ciclo fechado ideal de produção de P(3HB). Fonte: GARCIA, 2006.

Devido a sua alta temperatura de degradação, acima dos 200 °C, o P(3HB) não apresenta taxas de degradação consideráveis em temperatura normal, sendo portanto esse aspecto desconsiderado na degradação do polímero (LI, 2002). Ademais, devido ao alto percentual de cristalinidade, a degradação associada a fatores físicos e abióticos não gera impactos significativos no decaimento do P(3HB) isoladamente, sendo, portanto a aplicação de degradação em solo microbiologicamente ativo a melhor opção para o processo (MERGAERT, 1993).

A presença de aditivos, ou seja, grupamentos funcionais que aumentam a degradação do polímero na presença de radiação ou calor, também representam um fator interessante para diminuição do período de degradação do polímero (BRITO, 2011).

2.4.2. ANÁLISES DE DEGRADAÇÃO

O primeiro aspecto a ser levado em consideração para a análise de degradação de um material é a perda de sua massa total. A perda de massa é o resultado conclusivo, que determina a taxa de degradação final frente às condições experimentais aplicadas. Juntamente à perda de massa, a medida de espessura também representa a alteração da amostra no decorrer do tempo, estando atrelada à perda de massa e à presença de umidade e microbiota. Da mesma forma, ensaios

para avaliação de umidade, pH e produção de nitrogênio e CO₂ no polímero também podem indicar processos degradativos na amostra (ROSA & FILHO, 2003).

Algumas análises são usualmente utilizadas para a avaliação de degradação de um material polimérico. A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é uma técnica que submete a amostra em estudo e uma amostra referencial às mesmas variações de temperatura, adicionando ou retirando energia do sistema para mantê-las as amostras sempre na mesma temperatura. Dessa forma, é gerado um gráfico de variação de entalpia de acordo com essa manutenção de temperatura na análise, cujos dados estão diretamente relacionados às características do material como temperatura de transição vítrea (T_g) e grau de cristalinidade (LUCAS, 2001).

A Termogravimetria é uma análise térmica que submete o material a uma curva crescente de temperatura, monitorando sua perda de massa durante o processo. A perda de massa frente à temperatura está associada ao grau de resistência, estabilidade e degradação de um material (SCHRÖPFER, 2015).

A Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) ou Cromatografia de Exclusão por Tamanho permite a avaliação da perda de massa molar pela amostra, visto que é baseada no tamanho das moléculas e sua passagem através dos poros presentes na matriz cromatográfica, gerando gráficos cujos picos indicam a presença da amostra e sua massa molar.

Uma das análises mais importantes para determinação das características químicas de um material é a Espectroscopia Infravermelho. Através da aplicação de radiação eletromagnética sobre a amostra, é possível determinar um padrão de absorção de radiação e associá-lo à configuração química da mesma, visto que determinados grupos funcionais geram padrões conhecidos de absorção de radiação (RAGHAVAN, 1995; HARWOOD, 1997).

Por fim, uma maneira prática de visualização das modificações na superfície e na estrutura polimérica de amostras em degradação, é através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), como ilustrado na Figura 8, que demonstra a degradação da superfície do material no decorrer do tempo até que ao fim de um período de 150 dias praticamente não houvesse mais polímero reconhecível na amostra.

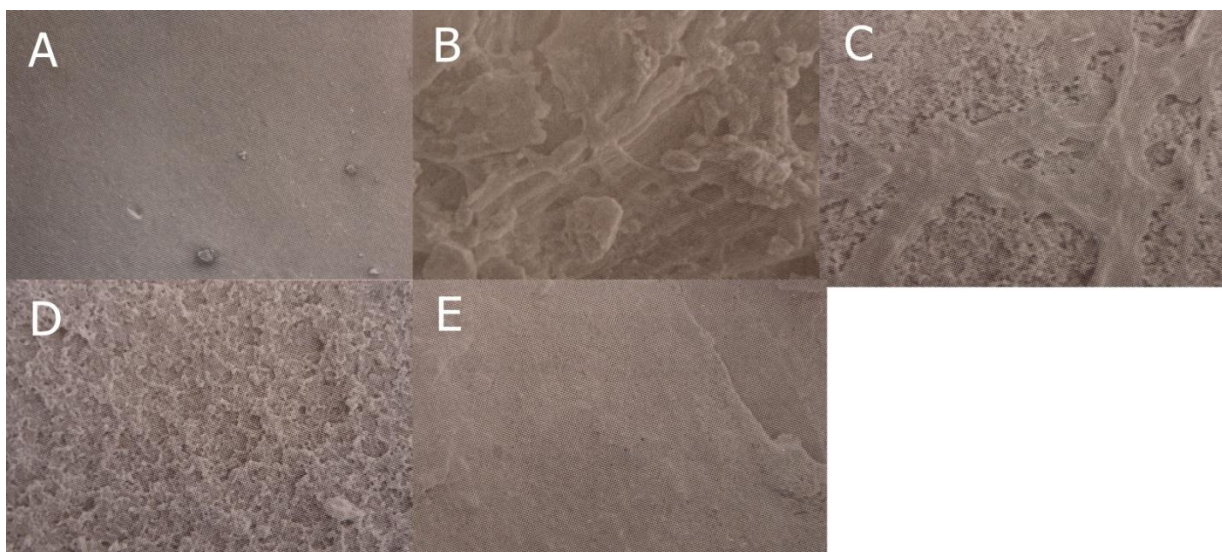


Figura 8 – Microscopia Eletrônica de Varredura mostrando a superfície do P(3HB) após 0 (A), 30 (B),

60 (C), 90 (D) e 150 (E) dias sob degradação em solo. Fonte: SCHRÖPFER et al., 2015.

3. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi determinar a taxa de degradação de amostras de P(3HB) de *Ralstonia solanacearum* e amostras de P(3HB) comercial, submetidas a 4 diferentes condições de degradação em solo microbiologicamente ativo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MICRORGANISMOS

A linhagem de *Ralstonia solanacearum* cepa RS utilizada faz parte da coleção de culturas de microrganismos do Laboratório de Bacteriologia – FAEM, da Universidade Federal de Pelotas, onde os experimentos foram realizados, sendo tal linhagem mantida sob constantes repiques em meio ágar nutritivo (AN) no Laboratório de Biopolímeros da mesma universidade.

4.2. PRODUÇÃO DO P(3HB)

Para a produção do biopolímero, duas etapas distintas foram realizadas. A fase 1, de crescimento celular escalonado, realizou-se em meio YM (*yeast mold*) para a multiplicação bacteriana, sendo tal meio esterilizado através de autoclavagem de 15 min a 121 °C. Repiques multiplicativos em meio AN foram previamente inoculados. Erlenmeyers de 500 ml foram utilizados para o inóculo, contendo 80ml de meio YM e 20ml de suspensão bacteriana. Após as primeiras 22 horas de cultivo, adicionou-se 100 ml de YM aos cultivos, no intuito de aumentar a multiplicação bacteriana. O período total de cultivo dessa fase foi de 44 horas, em agitador orbital a 150 rpm e 32 °C.

A fase seguinte da produção é a de acúmulo de biopolímero em meio mineral de produção F4. Para tal, um fermentador da marca Bioflo 310 e cuba de 14 litros foi

utilizado, contendo 5,6 litros de meio F4 esterilizado por 45 min a 121 °C. Assim, 20% de inóculo foram adicionados ao fermentador, totalizando um volume de fermentação de 7 litros. A fermentação foi mantida por 72 h a 250 rpm, 32 °C, 1 vvm, sob pH controlado 7,0.

Durante a segunda fase do processo fermentativo, já em fermentador, amostras foram coletadas em tempos de fermentação previamente determinados, com intervalos próximos à 3h dentre as amostras, para posterior análise de consumo de glicose e rendimento de polímero.

Assim, após a fermentação do polímero analisou-se: a produção em função do tempo, através de análise de massa celular seca e posterior extração de P(3HB), gerando dados gráficos de rendimento em função do tempo; O crescimento bacteriano, verificado por medição de Densidade Óptica (DO) em espectrofotômetro a 600 nm, e o consumo de glicose pela bactéria, determinado através de aplicação de kit comercial (LabTest). O teste de consumo de glicose é baseado na oxidação da glicose em ácido glucônico, reação que produz peróxido de hidrogênio, que reage com o kit e gera valor de absorbância proporcional à quantidade de glicose presente.

4.3. EXTRAÇÃO DO P(3HB)

Para extração do P(3HB), inicialmente o caldo fermentado foi centrifugado a 11.000 rpm durante 30min a 4 °C. Os *pellets* celulares gerados foram ressuspensos

em solução salina (NaCl 0,89%) e centrifugados novamente, e, a partir disso, foram submetidos a secagem até atingirem peso constante à temperatura de 70 °C para posterior trituração manual em recipiente cerâmico.

Para o processo de extração com solvente orgânico clorofórmio, porções de 1 g de *pellet* triturado foram adicionadas a 40 ml do solvente e submetidas à agitação magnética durante 30min em temperatura de 58 °C. Após esse período, a solução extrativa contendo os resíduos celulares foi adicionada a um funil de decantação e a este, um mesmo volume de água destilada foi adicionado para separação das fases orgânica e aquosa. Placas de Petri de vidro foram utilizadas como recipiente para a evaporação da fase orgânica e formação do filme (MACAGNAN, 2014).

Após obtidos os filmes, os mesmos foram fotografados e divididos cada um em 8 amostras a serem submetidas ao experimento de degradação. Tais amostras tiveram seu peso, espessura, largura e comprimento medidos previamente à instalação do experimento.

4.4. DETERMINAÇÃO DE RENDIMENTO DE BIOPOLÍMERO

Amostras de 30 ml de cultivo foram retiradas da fase de produção/acúmulo de polímero nos tempos de 0, 2, 4, 7, 20, 23, 26, 29, 31, 44, 47, 50, 53 e 72 horas de fermentação. Foi realizada a extração do P(3HB) a partir da massa celular seca de

tais amostras, como mencionado anteriormente, e assim, determinação do rendimento de polímero em gramas em função do tempo de fermentação.

4.5. OBTENÇÃO DE FILMES COMERCIAIS

Poli(3-hidroxi-butirato) comercial foi adquirido para utilização como controle positivo de degradação (PHB Industrial SA, Biocycle). Porções de 1g do composto em pó foram adicionadas a 40ml de clorofórmio, de forma semelhante à da extração. Também foram mantidos por período de 30min para solubilização a temperatura de 58 °C, para a posterior evaporação do solvente e formação do filme. Da mesma forma, os filmes foram cortados e geraram as amostras a serem aplicadas no experimento, cujas dimensões foram previamente aferidas.

4.6. EXPERIMENTO DE DEGRADAÇÃO

As amostras de P(3HB) em estudo e comercial foram aplicadas em triplicata em 4 vasos contendo solo em diferentes condições de microbiota, mantidos sob temperatura ambiente. O solo utilizado no experimento foi obtido comercialmente (solo comum contendo húmus). Os seguintes tratamentos foram utilizados: vaso 1 corresponde ao controle, contendo solo esterilizado (V1); vaso 2 corresponde ao solo comum, adquirido de forma comercial e não estéril (V2); vaso número 3 recebeu solo esterilizado e inóculo de 200 ml de cultivo de *Ralstonia solanacearum* (V3), e vaso 4, contendo solo também esterilizado e inóculo de 200 ml de cultivo de

Bacillus megaterium (V4). Os inóculos utilizados foram obtidos com a adição de 20ml de suspensão bacteriana a 80ml de meio YM, e adição de mais 100ml de meio YM após 24h de cultivo, prosseguindo-se o cultivo por mais 24h, de forma semelhante à realizada para as fermentações.

Em cada um dos vasos foram submetidas amostras correspondentes a cada tempo de degradação escolhido para a análise, ou seja, após 30, 60, 90, 120 e 150 dias no solo. Sendo assim, 15 amostras de P(3HB) de *R. solanacearum* e outras 15 de P(3HB) comercial foram aplicadas a cada tratamento. As condições em que os solos experimentais permaneceram não foram controladas, visto que o intuito do experimento é a simulação de degradação em solo comum como o de aterros sanitários, contendo grande carga microbiana.

Até o presente momento, apenas as amostras correspondentes a 30 dias de experimento foram removidas de seus tratamentos em seus respectivos tempos, sendo posteriormente limpas e submetidas à secagem. A variação de massa em gramas e de espessura em milímetros de todas as amostras foi avaliada estatisticamente através do software Statistix 9.0 através de Teste de Tukey ($p < 0,005$).

4.7. ANÁLISES DE DEGRADAÇÃO

4.7.1. PERDA DE MASSA

A análise de perda de massa foi realizada retirando-se amostras em triplicata após 30 dias dos 4 tratamentos, e submetendo-as à limpeza e secagem (70 °C). As amostras então foram submetidas a dessecador até atingirem peso constante. Após, o peso de cada amostra foi aferido e comparado ao peso inicial da mesma, para avaliação de perda de massa e cálculo em porcentagem (1).

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{\text{Peso Final da Amostra}}{\text{Peso Inicial da Amostra}} \times 100 \quad (1)$$

4.7.2. ANÁLISE DE ESPESSURA

De forma semelhante à perda de massa, a análise de espessura buscou determinar através da medição das amostras a degradação de polímero em função do tempo. Todas as amostras tiveram sua espessura aferida em micrômetro digital antes de serem submetidas ao experimento e após seu período de exposição, em 7 pontos distintos distribuídos na amostra.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PRODUÇÃO DO INÓCULO E PROCESSO FERMENTATIVO

Durante o cultivo da bactéria na fase de multiplicação celular, o uso de adição de meio ao inóculo em intervalo de 24h demonstrou-se satisfatório, gerando uma DO de 12,0. Esse valor é compatível com o utilizado em protocolos de fermentação bacteriana, apresentando como vantagem o aumento do número de células viáveis pelo escalonamento de meio disponível (YILMAZ, 2005; DALCATON, 2010).

Durante a fermentação, pode-se observar que a DO, após a adição do inóculo no meio de produção, não se alterou no decorrer do processo (16,0-18,0). Isso indica que, de forma adequada, a bactéria acumuladora permaneceu em ritmo metabólico e de multiplicação estável, direcionando seu metabolismo ao acúmulo de reserva energética (ANDERSON & DAWES, 1990).

Durante o processo de fermentação, as taxas de glicose sofreram declínio desde o início das medições, indicando a metabolização e conversão da fonte carbônica em polímero de reserva (Figura 9).

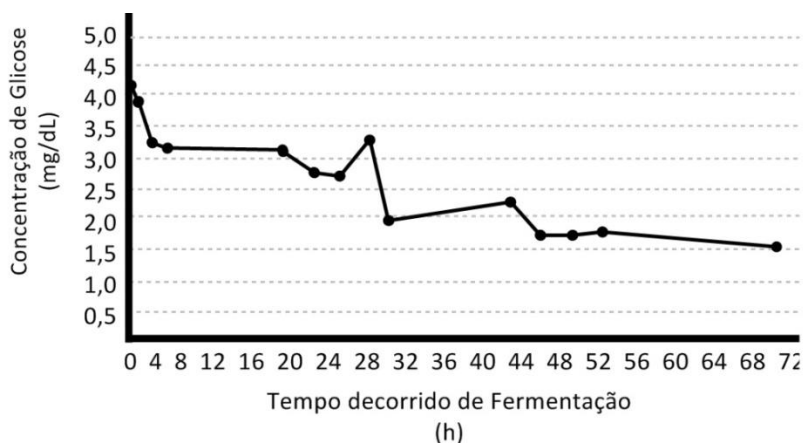


Figura 9 – Análise do consumo de glicose no tempo decorrente da fase de produção de P(3HB).

5.2. RENDIMENTO DE BIOPOLÍMERO

Durante o processo fermentativo, em congruência com a queda da concentração de glicose presente no meio, houve o aumento crescente da taxa de rendimento de polímero final em função do tempo decorrido. O rendimento em gramas de P(3HB) em relação ao tempo de fermentação está ilustrada na Figura 10.

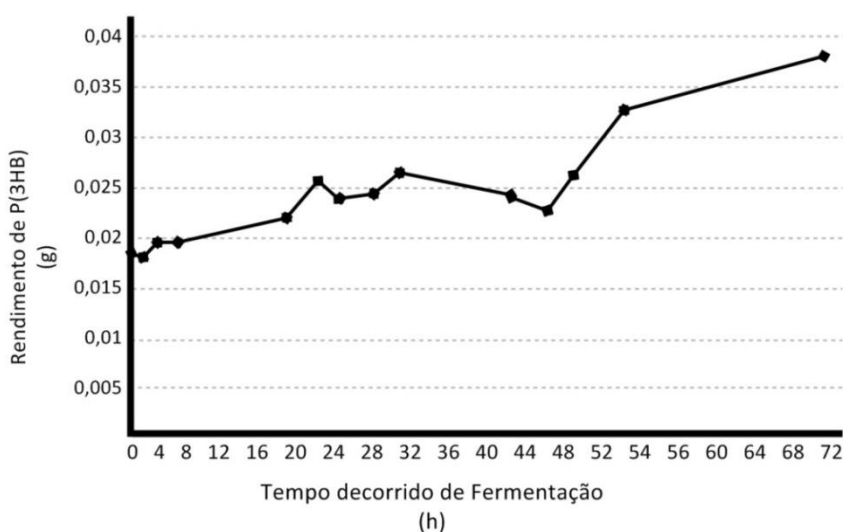


Figura 10 – Rendimento de produção do P(3HB) em função do tempo decorrido de fermentação.

O gráfico demonstra que houveram declínios durante o aumento do acúmulo de polímero, os quais estão de acordo também com picos de aumento de glicose durante o processo. A concentração de glicose disponível e o rendimento de P(3HB) estão interligados, sendo inversamente proporcionais (ANDERSON & DAWES, 1990), evidenciando-se através dos gráficos que houve a conversão da fonte de carbono utilizada em polímero.

5.3. FILMES E AMOSTRAS OBTIDOS

Os filmes produzidos a partir da extração estão ilustrados na Figura 10. O rendimento de polímero em peso foi de aproximadamente 90% em 72 h, gerando filmes poliméricos com espessura entre 120-150 μm .

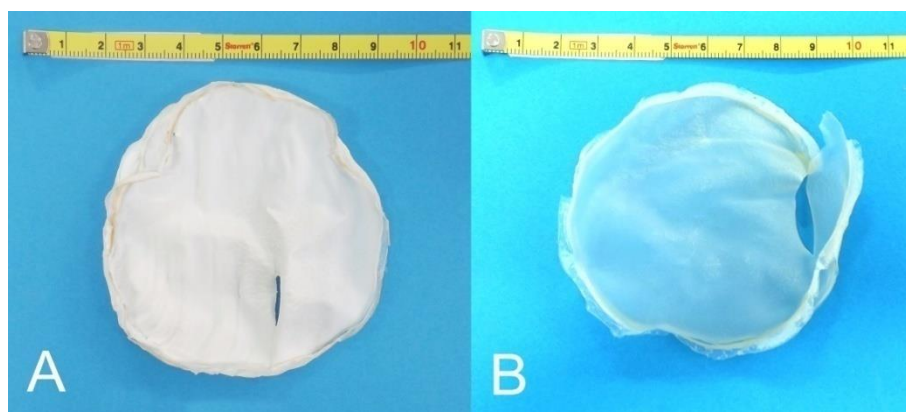


Figura 11 – Filmes poliméricos de P(3HB) de *R. solanacearum* (A) e filme de P(3HB) comercial (Biocycle) (B), obtidos por secagem do solvente.

A partir dos filmes produzidos, as amostras foram recortadas e catalogadas. Exemplos de amostras estão ilustrados na Figura 11. Experimentos de degradação de P(3HB) consideram a espessura e peso do polímero como fatores principais para avaliação do declínio, não havendo necessidade de padronização das amostras entre si, mas sim avaliação individual das mesmas (MERGAERT, 1993; SCHRÖPFER, 2015).

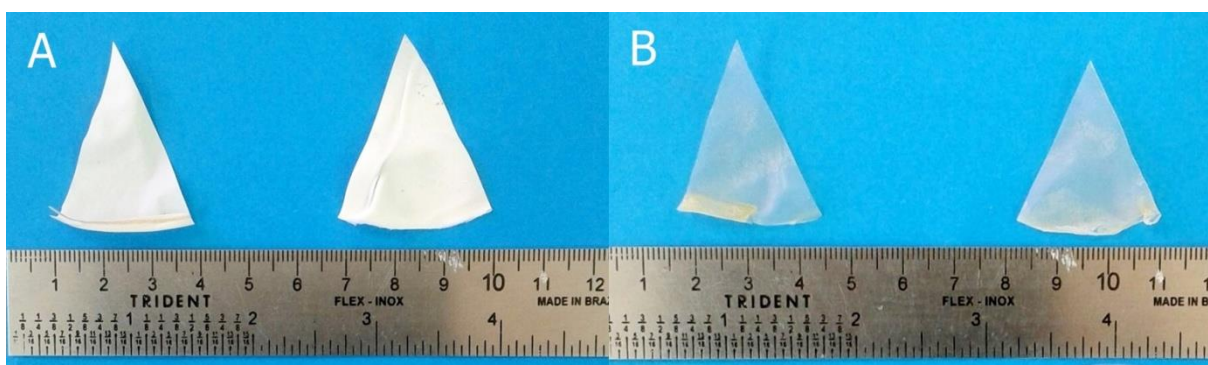


Figura 12 – Exemplos de amostras de P(3HB) de *R. solanacearum* (A) e P(3HB) comercial (Biocycle) (B) utilizadas no experimento de degradação.

5.4. DEGRADAÇÃO DE P(3HB)

Os resultados demonstraram que houve baixa variação no peso das amostras de P(3HB) de *Ralstonia solanacearum* retiradas após 30 dias de exposição aos tratamentos. Apesar de consideráveis em termos percentuais, os valores foram baixos e não representam diferenças estatísticas, de acordo com a literatura atual que prescreve que a degradação do P(3HB) inicie-se após os 60 a 90 dias em solo (JENDROSSEK, 2002; SCHRÖPFER, 2015).

Os dados referentes às massas das amostras retiradas após 30 dias de experimento estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Variação em gramas da massa da triplicata e média das amostras expostas a 30 dias de degradação, onde 1, 2 e 3 representam a triplicata colhida de cada tratamento (V1, V2, V3 e V4) ($p < 0,005$).

Amostras P(3HB) em estudo	Variação da massa do P(3HB) – <i>R. solanacearum</i> (g)	Média de Variação da massa do P(3HB) – <i>R. solanacearum</i> (g)	Amostras P(3HB) comercial	Variação da massa do (P3HB) comercial (g)	Média de Variação da massa do P(3HB) comercial (g)
V1 – 1	-0,0024	- 0,0013 (A)	V1 – 1	-0,0049	- 0,0043 (A)
V1 – 2	0		V1 – 2	-0,0029	
V1 – 3	-0,0016		V1 – 3	-0,0051	
V2 – 1	+0,003	0,0009 (A)	V2 – 1	-0,0021	- 0,0035 (A)
V2 – 2	-0,0005		V2 – 2	-0,0055	
V2 – 3	+0,0004		V2 – 3	-0,0031	
V3 – 1	+0,0037	- 0,0012 (A)	V3 – 1	-0,0024	- 0,0024 (A)
V3 – 2	-0,0037		V3 – 2	-0,0024	
V3 – 3	-0,0037		V3 – 3	-0,0026	
V4 – 1	+0,0034	0,0007 (A)	V4 – 1	-0,0016	- 0,0019 (A)
V4 – 2	-0,0003		V4 – 2	-0,0022	
V4 – 3	-0,001		V4 – 3	-0,0020	

Os valores percentuais de variação de peso das amostras em triplicata dos solos experimentais estão descritos na Figura 13.

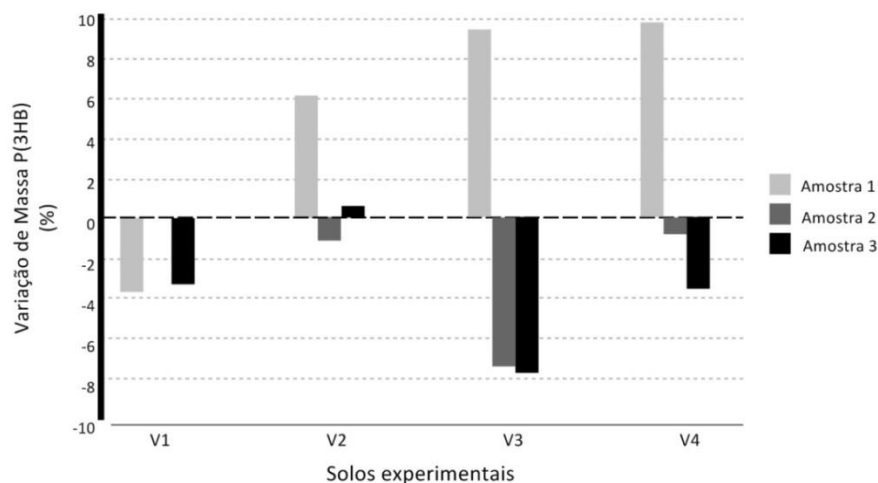


Figura 13 - Variação da massa da triplicata de amostras de P(3HB) de *Ralstonia solanacearum* em cada um dos solos experimentais utilizados.

A avaliação estatística através do Teste de Tukey demonstrou que não houve diferenças estatísticas dentre as médias de variação de peso das amostras.

Não houve relação aparente dentre os resultados de degradação de P(3HB) das amostras produzidas internamente. Apesar disso, no início do processo degradativo, as amostras de P(3HB) costumam ter variações em seu peso de acordo com as condições em que estão distribuídos no solo, variando-se tal valor de acordo com a umidade presente e a formação de colônias de microrganismos na superfície polimérica, fatores variáveis de forma geral (MERGAERT, 1993; BONARTSEV, 2007).

As amostras de P(3HB) comercial sofreram perda de peso total de forma padronizada, havendo similaridade dentre as porcentagens de variação de massa encontradas dentre as triplicatas, com exceção do solo 3. Ao contrário das amostras

de *R. solanacearum*, houve apenas resultados de perda de massa. A variação da massa das amostras em relação aos solos experimentais está descrita na Figura 14.

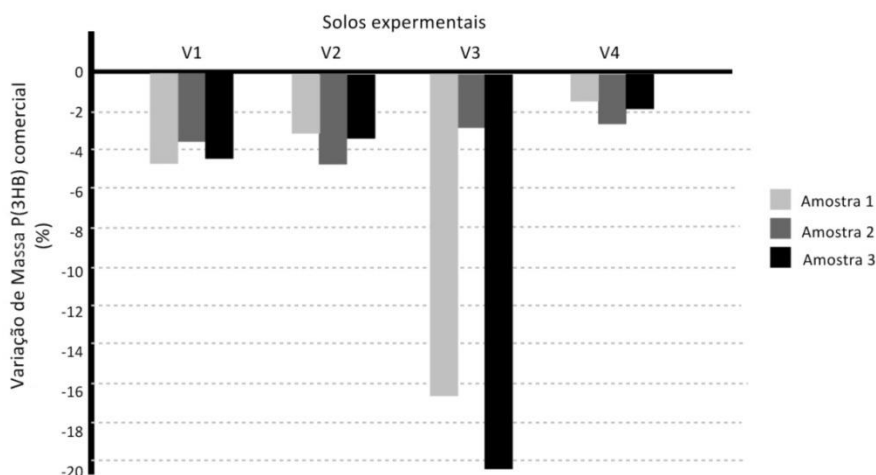


Figura 14 - Variação da massa da triplicata de amostras de P(3HB) comercial em cada um solos experimentais.

Observa-se que as amostras do solo V3, inoculado com *R. solanacearum*, foram as que apresentaram maiores variações gerais de massa tanto nas amostras de produção própria quanto nas amostras comerciais. Além disso, as amostras de P(3HB) comercial do solo V3 apresentaram um padrão incomum de perda de massa.

Em relação à espessura, o aumento de massa da amostra refletiu diretamente no aumento da espessura da mesma. Todas as amostras de P(3HB) comercial sofreram diminuição de espessura, bem como a grande maioria das amostras de P(3HB) de *R. solanacearum*. A variação da espessura média de cada solo-teste está ilustrada na Tabela 3.

Tabela 3. Variação em milímetros e variação estatística da espessura das amostras expostas a 30 dias de degradação, em que 1, 2 e 3 representam a triplicata de amostras retiradas de cada tratamento (V1, V2, V3 e V4) ($p < 0,005$).

Amostras P(3HB) – R. <i>solanacearum</i>	Variação em mm – R. <i>solanacearum</i>	Média de Variação em mm – R. <i>solanacearum</i>	Amostras P(3HB) comercial	Variação em mm – P(3HB) comercial	Média de Variação em mm – P(3HB) comercial
V1 – 1	- 0,017	- 0,016 (B)	V1 – 1	- 0,049	- 0,059 (B)
V1 – 2	- 0,005		V1 – 2	- 0,061	
V1 – 3	- 0,026		V1 – 3	- 0,068	
V2 – 1	- 0,002	0,0006 (AB)	V2 – 1	- 0,056	- 0,031 (AB)
V2 – 2	- 0,006		V2 – 2	- 0,033	
V2 – 3	+ 0,010		V2 – 3	- 0,006	
V3 – 1	0	- 0,0007 (AB)	V3 – 1	- 0,052	- 0,061 (B)
V3 – 2	0		V3 – 2	- 0,065	
V3 – 3	- 0,021		V3 – 3	- 0,068	
V4 – 1	+ 0,027	0,017 (A)	V4 – 1	+ 0,005	0,013 (A)
V4 – 2	+ 0,033		V4 – 2	+ 0,048	
V4 – 3	- 0,008		V4 – 3	- 0,012	

A maior variação estatística de espessura foi tida no solo V4, contendo inóculo de *Bacillus megaterium*, para ambas as amostras de P(3HB) de *Ralstonia solanacearum* e as amostras de P(3HB) comercial. Em relação aos demais tratamentos não houve diferenças estatísticas.

A biodegradação de P(3HB) é um processo conhecido por, ao contrário de processos de degradação de plásticos comuns, minimizar a degradação do material

a um prazo máximo de 200 dias (JENDROSSEK, 2002), indicando que resultados mais conclusivos em relação à degradação de P(3HB) serão encontrados no decorrer do experimento.

De forma geral, observou-se pouca variação na massa das amostras, conforme resultados já esperados. Porém o processo será acompanhado até o tempo de 150 dias de exposição aos solos experimentais e espera-se observar resultados conclusivos que gerem o padrão de degradação do P(3HB) produzido por *Ralstonia solanacearum*.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Durante o processo fermentativo, a bactéria *Ralstonia solanacearum* demonstrou-se um forte candidato a produtor de P(3HB) industrialmente, com rendimentos altos e crescentes (90%) durante a fermentação, atrelados a correta conversão da fonte carbônica em polímero acumulado.

Quanto aos resultados relacionados à biodegradação do P(3HB) produzido por *Ralstonia solanacearum*, não foram observados resultados conclusivos aos 30 dias de exposição das amostras aos diferentes tratamentos. Apesar do tratamento V3 mostrar resultados preliminares promissores de contribuição no processo degradativo, somente aos 150 dias de exposição das amostras aos solos será possível determinar-se o padrão de degradação das mesmas.

Ao fim da coleta de resultados, as amostras colhidas serão submetidas à Microscopia Eletrônica de Varredura para análise visual de degradação da superfície polimérica.

7. REFERÊNCIAS

ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. (1990). Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Microbiological Reviews**, v.4, n.4, p. 450-472.

BHAGOWATI, P. PRADHAN, S.; DASH, H.; DAS, S. (2015). Production, optimization and characterization of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic by *Bacillus* spp.

Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, DOI:

10.1080/09168451.2015.1034651.

BHATIA, S.K.; SHIM, Y.; JEON, J.; BRIGHAM, C.; KIM, Y.; YANG, Y. (2015). Starch based polyhydroxybutyrate production in engineered *Escherichia coli*. **Bioprocess**

Biosyst Eng, DOI 10.1007/s00449-015-1390-y.

BRITO, G.F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E.M. MÊLO, T.J.A. (2011). Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.6.2, p. 127-139.

BONARTSEV, A.P.; MYSHKINA, V.L.; NIKOLAEVA, D.A.; FURINA, E.K.; MAKHINA, T.A.; LIVSHITS, V.A.; BOSKHOMDZHIEV, A.P.; IVANOV, E.A.; IORDANSKII, A.L.; BONARTSEVA, G.A. (2007). Biosynthesis, biodegradation, and application of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers - natural polyesters produced by diazotrophic bacteria. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, p. 295-307.

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

CHARLES, T.; GUOQIN, C.; PUNITA, A. (1997). Megaplasmid and Chromosomal Loci for the PHB Degradation Pathway in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. **Genetics Society of America**.

CHEN, Q.G.; (2010). Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications, **Microbiology Monographs**, v. 14, DOI: 10.1007/978-3-642-03287_5_2.

CROCHEMORE, A.G.; MATTOS, M.L.T.; VENDRUSCOLO, C.T.; CASTRO, L.A.S.; MOREIRA, A.S. (2012). Identification of pesticide-degrading *Pseudomonas* strains

as poly- β -hydroxybutyrate producers. **African Journal of Biotechnology**, v. 11(85), p. 15144-15149.

DALCATON, F.; IENCZAK, J.; FIORESE, M.; ARAGÃO, G.M. (2010). Produção De Poli(3-Hidroxibutirato) Por *Cupriavidus Necator* Em Meio Hidrolisado De Amido De Arroz Com Suplementação De Óleo De Soja Em Diferentes Temperaturas. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 3, p. 552-556.

DOI, Y. (1990) **Microbial polyesters**. Nova Yorque, EUA.

DUARTE, M.A.T.; C. F. JÚLIO; E. S. MARTINS; S. H. PEZZIN. Estudo da compactação a frio de poli(3-hidroxibutirato) – morfologia e resistência à compressão. **Revista Matéria**, v. 9, p. 386-391.

GARCIA, M.C.F. (2006). **Proposta de um processo de extração de poli(3-hidroxibutirato) produzido por Cupriavidus necator e seu efeito sobre as características do polímero**. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Engenharia de alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

GENIN, S.; BOUCHER, C. (2004). Lessons Learned From The Genome Analysis Of *Ralstonia Solanacearum*. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 42. p. 107–34.

GOUDA, M.; SWELLAN, A.; OMAR, S.; Production of PHB by a *Bacillus megaterium* Strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. **Microbiol. Res.**, v. 156, p. 201–207.

HA, C.; CHO, W.; Miscibility, properties, and biodegradability of microbial polyester containing blends. **Prog. Polym. Sci.** v. 27, p. 759-809.

HARRIGAN, A. (2011) Effect of soil temperature on the biodegradation rate of biopolymers. **ECOTEK**.

HARWOOD, P. (1997). **Further Chemistry**. Harper, Londres.

HENDERSON, A; JONES, C.; HENDERSON, R. (1997). Physiology of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production by *Alcaligenes eutrophus* growing in continuous culture. **Microbiology**, v. 143, p. 2361-2371.

JENDROSSEK, D.; KNOKE, I.; HABIBIAN, R.; STEINFICHEL, A. (1993).

Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate), PHB, by Bacteria and Purification of a Novel PHB Depolymerase from *Comamonas* sp. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 56, p. 403–32.

JENDROSSEK, D.; HANDRICK, R.; (2002). Microbial Degradation Of Polyhydroxyalkanoates. **Annu. Rev. Microbiol**. v. 56, p. 403–32.

JENDROSSEK, D. (2009). Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes). **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 10, p. 3195-3202.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. (1991) **Biologia Celular e Molecular**. Editora Guanabara, Rio de Janeiro.

KHAN, A.B.; KHATTAK, M.; TARAR, O.M.; HABIB, F.; JAMIL, K.; YASMIN, A.;

PARVEZ. (2005). Separation of Polyhydroxyalkanoates-Producing Bacterial Strains Using PHA Synthase Gene and Their Evaluation for PHA Deposition. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.56, n.4, p. 645-652.

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

LEE, S. Y.; (1996). Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 1-14.

LI, S.; HE, J.; YU, P.; CHEUNG, M.K.; (2003). Thermal Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) as Studied by TG, TG–FTIR, and Py–GC/MS. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 89, p. 1530–1536.

LUCAS, E.F. (2001). **Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica**. E-papers, Rio de Janeiro.

LUENGO, J.M.; GARCIA, B.; SANDOVAL, A.; NAHARRO, G.; OLIVERA, E.R.; (2003). Bioplastics from microorganisms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 251–260.

MADISON, L.; HUISMAN, G.; (1999). Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 63, n. 1, p. 21-53.

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

MERGAERT, J.; WEBB, A.; ANDERSON, C.; WOUTERS, A.; SWINGS, J.; (1993). Microbial Degradation of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) in Soils. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 3233-3238.

MERUGU, R.; (2012). Studies on PHB (Polyhydroxybutyrate) degradation by some species of *Aspergillus*. **International Journal of ChemTech Research**, v. 4, n. 3, p. 1111-1113.

MOSCOVICI, M.; (2015). Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. **Front. Microbiol**, v.6, p. 1012.

PACHEKOSKI, W.M. (2001). **Desenvolvimento de blendas poliméricas do polímero biodegradável poli-hidroxibutirato (PHB) com o polipropileno (PP)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

PARVEEZ, G.; BAHARIAH, B.; AVUB, N.; MASANI, M.; AHMAD, O.; TAMIZI, A.; ISHAK, Z.; (2015). Production of polyhydroxybutyrate in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) mediated by microprojectile bombardment of PHB biosynthesis genes into embryogenic calli. **Front. Plant Sci**, v.6, p. 598.

POPULATION REFERENCE BUREAU. **2015 Population Data Sheet**. Disponível em: <http://www.prb.org/pdf15/2015-world-population-data-sheet_eng.pdf>. Acesso em: 10 de novembro de 2015.

POTTER, M.; MULLER, H.; REINECKE, F.; WIECZOREK, R.; FRICKE, F.; BOWIEN, B.; FRIEDRICH, B.; STEINBUCHER, A.; (2004). The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. **Microbiology**, v. 150, p. 2301–2311.

POUEYMIRO, M.; GENIN, S.; (2009). Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, p. 44–52.

RAMSAY, J.A.; BERGER, E.; VOYER, R.; CHAVARIE, C.; RAMSAY, B.A. (1994).

Extraction Of Poly-3-Hydroxybutyrate using Chlorinated Solvents. **Biotechnology techniques**, v. 8, n. 8, p. 589-594.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; CURTIS, H. (1978). **Biologia Vegetal**. Editora

Guanabara, Rio de Janeiro.

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

RHAGAVAN, D. (1995). Characterization of Biodegradable Plastics. **Polymers Plast. Technol. Eng**, v. 34, n. 1, p. 41-63.

ROSA, D.; FILHO, R.P.; AGNELLI, J.A.M. (2002). Avaliação da Biodegradação de Poli- β -(Hidroxibutirato), Poli- β -(Hidroxibutirato-co-valerato) e Poli- ϵ -(caprolactona) em Solo Compostado. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 12, n. 4, p. 311-317.

SCOTT, G.; GILEAD, D. (1995) **Degradable polymers: principles & applications**.

Chapman & Hall, Londres.

SCHRÖPFER, S.B.; BOTTENE, M.K.; BIANCHIN, L.; ROBINSON, L.C.; LIMA, V.; JAHNO, V.D.; BARUD, H.; RIBERIRO, S.J.L. (2015). Biodegradation evaluation of bacterial cellulose, vegetable cellulose and poly(3-hydroxybutyrate) in soil.

Polímeros, v. 25, n. 2, p. 154-160.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y.; (2011). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Prog. Polym. Sci.**, v. 25, p. 1503-1555.

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

SZNAJDER, A.; PFEIFFER, D.; JENDROSSEK, D. (2015). Comparative proteome analysis reveals four novel polyhydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins in *Ralstonia eutropha* H16. **Appl Environ Microbiol**, v. 81, n. 10, p. 1847–1858.

TORINO, M.I.; FONT DE VALDEZ, G.; MOZZI, F. (2015) Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. **Front. Microbiol**, v. 6, n.834.

UEFUJI, M.; KASUYA, K.; DOI, Y. (1997). Enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: secretion and properties of PHB depolymerase from *Pseudomonas stutzeri*. **Polymer Degradation and Stability**, v. 58, p. 275-281.

YILMAZ, M.; SORAN, H.; BEYATLI, Y. (2005). Determination of poly-*b*-hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus* spp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 565–566.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H. & NISHIUCHI, Y. (1995). 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.