

## Engenharia de Alimentos

# REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUO DE EXTRAÇÃO QUÍMICA DE P(3HB) NO MEIO DE CULTIVO DE *Ralstonia solanacearum*

Ana Cláudia da Silva Pôrto, Dener Acosta de Assis, Karine Laste Macagnan, Mariane Igansi Alves, Amanda Ávila Rodrigues, Patrícia Diaz de Oliveira, Lígia Furlan, Angelita da Silveira Moreira, Claire TondoVendruscolo

*Laboratório de Biopolímeros, Centro de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS*

*\*E-mail: anaclaudia1294@gmail.com*

**RESUMO** – Plásticos biodegradáveis são polímeros que se degradam completamente ao ataque microbiano em um curto espaço de tempo, sob condições apropriadas do meio ambiente. Entre eles destacam-se os polihidroxialcanoatos (PHAs), principalmente o poli(3-hidroxi-butarato) - P(3HB), por sua semelhança com o polipropileno (PP), podendo ser utilizado em um amplo campo de aplicações como embalagens para produtos de limpeza, higiene, cosméticos e alimentos e ainda em produtos e artefatos médico-farmacêuticos. Atualmente estão sendo desenvolvidos estudos visando encontrar formas de reduzir-se os custos de produção. O objetivo deste estudo foi avaliar a possibilidade de uso de resíduo de extração no meio de cultivo de *Ralstonia solanacearum*, em diferentes proporções, para redução futura de custos no processo. O inóculo foi produzido em frascos *Erlenmeyers* de 250 mL aletados, contendo meio *Yest Malte* (YM) padrão (controle) e com substituição parcial da água por diferentes concentrações (15, 25 e 50 %), do resíduo aquoso da extração do polímero de P(3HB). Os cultivos foram mantidos na temperatura de 32 °C, 150 rpm, no tempo de 24h, em agitador incubador orbital. A maior concentração celular foi obtida a partir de meio padrão e de meio contendo 15 % de resíduo de extração, sem apresentar diferenças estatísticas, tanto para DO quanto para rendimento de MCS. Assim, o reaproveitamento de resíduo em uma proporção de 15 % no meio de cultivo, parece ser uma boa alternativa para diminuir os custos no processo.

**Palavras-chave:** Polihidroalcanoato, Poli(3-hidroxi-butarato), Biopolímero, *Ralstonia solanacearum*.

## 1 INTRODUÇÃO

Os plásticos biodegradáveis, mormente os bioplásticos são destacados por Sartori (1998) como sendo polímeros que se degradam completamente ao ataque microbiano em um curto espaço de tempo, sob condições apropriadas do meio ambiente. Dentre os biopolímeros em desenvolvimento estão os polihidroxialcanoatos (PHAs). Além da vantagem em serem biodegradáveis, os PHAs ainda apresentam outras importantes características como serem biocompatíveis, serem produzidos a partir de recursos renováveis como açúcares e

ácidos graxos e terem propriedades termoplásticas e características físicas e mecânicas semelhantes às do polipropileno, polímero derivado do petróleo. Podem ser utilizados em um amplo campo de aplicações como embalagens para produtos de limpeza, higiene, cosméticos e alimentos. Por serem biocompatíveis, podem ser empregados na área médico-farmacêutica em fabricação de fios de sutura, próteses ósseas, suportes de culturas de tecidos para implantes e encapsulação de fármacos para liberação controlada (VASCONCELOS, 2002).

Para Srivastava e Khanna (2005), dentre os polímeros constituintes da família dos PHAs o P(3HB) é um dos mais profundamente estudado e caracterizado, este é um homopolímero composto de unidades monoméricas de 4 átomos de carbono ( $R = CH_3$  e  $n = 1$ ) e possui uma certa semelhança com o polipropileno (PP), devido a sua massa molar, temperatura de fusão, cristalinidade e resistência à tração, porém o P(3HB) não é tóxico, apresenta melhor resistência a luz ultravioleta e melhor propriedade de barreira a gases, gordura e odor, características desejáveis para a produção de embalagens de diversos produtos.

Atualmente estão sendo desenvolvidos alguns estudos visando encontrar formas de reduzir estes custos sem perder o máximo rendimento do polímero, porém ainda existem poucos trabalhos publicados na área. Utilizando a *Ralstonia eutropha*, Dalcanton (2006) utilizou meio sintético para simular o resíduo gerado pela indústria amilácea como substrato de baixo custo para a produção de P3HB; no Instituto de Pesquisas Tecnológicas - IPT (IPT, 1993), foram realizados estudos utilizando melão invertido de cana-de-açúcar como substrato, ambos obtendo bons resultados, quando comparados à produção do biopolímero com glicose como fonte de carbono.

Com base na importância do tema, objetivou-se com o presente estudo avaliar o uso de resíduo da etapa de extração do polímero no meio de cultivo de *Ralstonia solanacearum*, em diferentes proporções, para redução de custos no processo

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Microrganismo

Foi utilizada linhagem de *Ralstonia solanacearum* cepa RS, cedida pelo Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. A bactéria foi preservada por meio das técnicas de liofilização e repiques mensais em *Nutritive Yest Agar* (NYA), com composição em g/L, de peptona, 5,0 g; glicose, 5,0 g; extrato de levedura, 1,0 g; extrato de carne, 3,0 g e agar, 15,0 g (SCHAAD et al., 2001, modificado) estocadas sob congelamento a  $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  e refrigeração a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente.

### 2.2 Produção de inóculo

O inóculo, em volume de 100 mL por frasco, foi produzido em frascos Erlenmeyers de 250 mL aletados, utilizando meio *Yest Malte* (YM) padrão (controle) ou com diferentes proporções de resíduo aquoso da extração do polímero (15, 25 e 50 %), em substituição à água, inoculado com suspensão bacteriana, obtida através da raspagem de cultivo fresco em meio NYA sólido, incubados durante 48 h a  $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ , perfazendo uma

concentração de biomassa (DO) inicial de 1,5. Os cultivos foram mantidos na temperatura de 32 °C, 150 rpm, no tempo de 24h, em agitador incubador orbital.

A solução aquosa acrescentada no meio de cultivo foi gerada pela extração de P(3HB) partindo de massa celular seca (MCS) e clorofórmio, segundo metodologia de recuperação, líquido-líquido por diferença de polaridade, desenvolvida por Macagnan (2014). A MCS foi submetida ao aquecimento com clorofórmio por 30 min e a solução extrativa transferida para funil de separação e acrescida de água destilada para separação dos resíduos celulares da solução extrativa. A fase orgânica foi utilizada para obtenção do polímero e a fase inorgânica (resíduo da extração) utilizada neste trabalho como suplemento nutricional para o microrganismo no meio de cultivo da fase de inóculo.

### 2.3 Determinação de crescimento celular

O crescimento celular foi comparado através da turvação (DO) do meio causada pelo crescimento da biomassa, analisada por espectrofotometria a 600 nm, e pela concentração de massa celular seca (MCS), determinada por gravimetria. Um volume de 30 mL de caldo fermentado foi centrifugado em tubos previamente secos, identificados e pesados. O sobrenadante foi desprezado e o tubo contendo as células foi seco em estufa a 56 °C, resfriado em dessecador e pesado, até peso constante. Todas as análises foram realizadas em triplicata e as médias comparadas e analisadas estatisticamente pelo teste de *Tukey*  $p < 0,05$  no programa Statistix 9.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

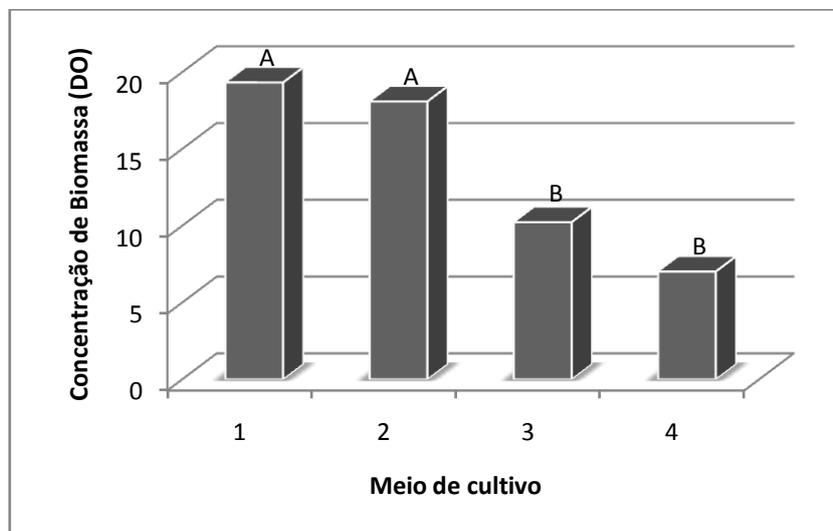
Os resultados obtidos de concentração celular em relação a DO e MCS são representados pelas Figuras 1 e 2, respectivamente.

A maior concentração celular, evidenciada pela DO e MCS, foi obtida através do uso do meio de cultivo padrão e utilizando 15 % de resíduo, sendo 19,3 e 18,1 e 3,8 e 3,4 g/L, respectivamente, sem haver diferença estatística entre esses meios. Já com as concentrações de 25 e 50 % de resíduo, houve um decréscimo considerável na multiplicação celular.

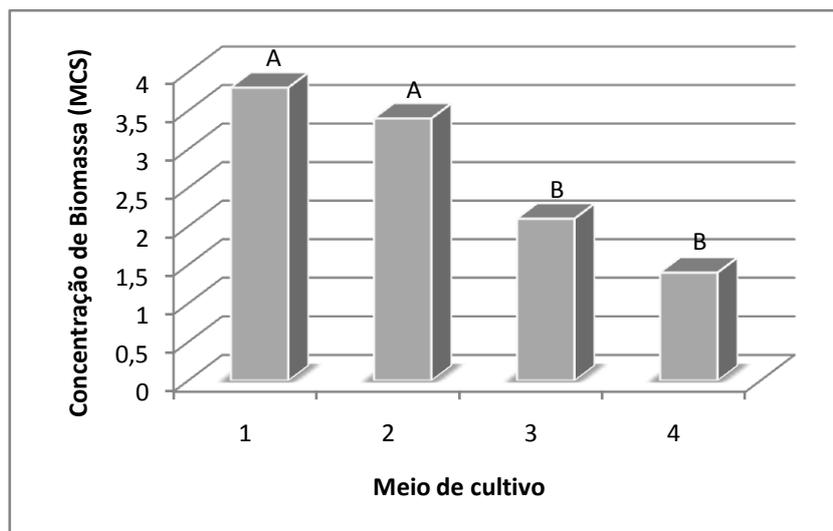
O decréscimo da concentração de biomassa com o uso de 25 e 50 % de resíduo no meio de cultivo pode ter sido ocasionada por toxicidade ou inibição resultante de metabólitos hidrossolúveis presentes no resíduo aquoso utilizado ou por excesso de nitrogênio, levando a morte celular ou inibição de crescimento; o que demanda, portanto, continuação dos estudos.

Já a utilização de 15 % de resíduo aquoso no meio de cultivo, parece ser uma boa alternativa para diminuir os custos de produção, uma vez que reduz o volume de água necessário no processo de produção e o volume de efluente do processo de recuperação, ainda servindo como fonte de nutrientes para o consumo bacteriano.

**Figura 1.** Concentração de biomassa (DO) obtida após 24 h de cultivo no meio de multiplicação celular YM padrão (1), e acrescentado de 15 (2), 25 (3) e 50 % (4) de resíduo de extração. Letras diferentes significam que as médias obtidas com as respectivas metodologias diferiram estatisticamente pelo teste de *Tukey*  $p < 0,05$ .



**Figura 2.** Rendimento de massa celular seca (MCS) obtida após 24 h de cultivo no meio de multiplicação celular YM padrão (1), e acrescentado de 15 (2), 25 (3) e 50 % (4) de resíduo de extração. Letras diferentes significam que as médias obtidas com as respectivas metodologias diferiram estatisticamente pelo teste de *Tukey*  $p < 0,05$ .



## 4 CONCLUSÃO

O reaproveitamento de resíduo aquoso de extração de P3(HB) em uma proporção de 15 % no meio de cultivo é possível, o que demonstra a viabilidade do mesmo como alternativa para redução de custos no processo.

## 5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FAPERGS, pelo apoio financeiro e a UFPel e CDTEC pelo espaço cedido para o desenvolvimento desse trabalho.

## 6 REFERÊNCIAS

- BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Tibtech**, v. 5, p. 246-250, 1987.
- DALCANTON, F. **Produção, Extração e Caracterização de Poli(3-Hidroxi butirato) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 2006.
- INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS – IPT. **Produção de plásticos biodegradáveis a partir de cana-de-açúcar por via biotecnológica**. Relatório n° 31478/93, n. 2, p. 103, 1993.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 607-619, 2005.
- KIM, B. S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 27, p. 774-777, 2000.
- SARTORI, D. M. **Obtenção de um mutante de *Alcaligenes eutrophus* melhorado geneticamente para a produção do co-polímero polihidroxi butirato-polihidroxi valerato (PHB-PHV)**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- VASCONCELOS, Y. Plástico de açúcar. **Revista Pesquisa FAPESP**, São Paulo. Disponível em: <[http://www.revistapesquisa.fapesp.br/show.php?id=revistas1.fapesp1.20021001.20021080.SEC7\\_4](http://www.revistapesquisa.fapesp.br/show.php?id=revistas1.fapesp1.20021001.20021080.SEC7_4)>.
- Acesso em: agosto de 2015. TZ, H. R. **Applied Sensory Analysis of Foods**. Boca Raton: CRC Press, v. 1, 1988. 259 p.
- NASCIMENTO, M. S.; SILVA, N.; CATANOZI, M. P. L. M. Emprego de sanitizantes na desinfecção de vegetais. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 112, p. 42-46, 2003.