

Análise da biodegradação de filmes de Poli(3-hidroxibutirato) a partir de duas metodologias de incorporação de corantes orgânicos naturais

KETNEN RIEFFEL DAS CHAGAS¹; MARIA LUIZA DE OLIVEIRA ZANINI²;
YASMIM DE MACEDO CORRÊA³; JOÃO VITOR DE SOUZA GERINGER⁴;
ISABELA BOLDRINI DUTRA RASCH⁵ PATRICIA SILVA DIAZ⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas 1 – rieffelketnen@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – luizaznn@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – yasmimcorress2@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – joaogeringer@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas - @isabelabrasch@gmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas – bilicadiaz@yahoo.com

1. INTRODUÇÃO

Os plásticos derivados de fonte petroquímica podem causar danos aos diferentes ecossistemas, atingindo também animais e humanos (Atlas do Plástico, 2020). A preocupação com as questões ambientais têm influenciado na busca por materiais alternativos que possam substituir os plásticos convencionais. Desta forma, dentre as possíveis alternativas, os biopolímeros se mostram promissores. Isso se deve às propriedades como alta biodegradabilidade e por serem produzidos a partir de fontes renováveis, gerando menor impacto ambiental. Essas características revelam-se atrativas no desenvolvimento de materiais chamados de plásticos ecológicos (Atlas do Plástico, 2020; Maier, 2018).

Dentre os biopolímeros, destaca-se o Poli-(3-hidroxibutirato) [P(3HB)], sintetizado por diversas classes de microrganismos como reserva intracelular de carbono e energia (De Aguiar et al., 2021). Este polímero é biocompatível, e pode ser utilizado desde a área médica até na produção de embalagens alimentícias (Loureiro, 2021). No entanto, para gerar maior apelo comercial e aumentar sua gama de aplicações, deve-se pensar na aplicação de cores na produção dos produtos feitos a partir deste biopolímero (Pagnan et al., 2018).

Trabalhos como de Pagnan et al. (2018) e Jung et al. (2020) exploram novas abordagens de coloração de P(3HB), sendo encontradas várias metodologias de obtenção dos biopolímeros coloridos. Algumas metodologias realizam a coloração a partir da inserção de corantes ao biopolímero ou através da modificação genética de microrganismos para que se tornem capazes de produzir simultaneamente PHB e corante (Latos-Brožio; Masek, 2020; Park; Ahn; Choi, 2022). Com isso, visam reduzir custos e o tempo de obtenção do biopolímero.

A partir da aplicação de corantes ao P(3HB), torna-se necessário compreender sua influência nas propriedades físico-químicas do material. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi analisar e comparar a biodegradação de filmes de PHB corados com cúrcuma a partir de duas metodologias. Foram submetidos ao teste de biodegradação em solo filmes de PHB corados após o processo de obtenção do polímero (Das Chagas et al., 2022) e corados durante a fermentação submersa de microrganismo que naturalmente sintetiza P(3HB) (Zanini, 2023).

2. METODOLOGIA

2.1. Metodologia de produção de P(3HB) colorido por fermentação submersa

O meio de cultivo *Yeast Malt* (Extrato de Malte: 2,7 g/L (KASVI®); Extrato de Levedura: 2,7 g/L (KASVI®); Peptona: 4,5 g/L (KASVI®) e Sacarose: 35 g/L) foi preparado e teve seu pH ajustado para 6 (Jeanes, 1974) após a adição do corante cúrcuma (3 g/L). Em seguida, 5 mL de suspensão do microrganismo *Ralstonia solanacearum* cepa RS foram adicionados a frasco *Erlenmeyer* aletado contendo 195 mL de YM adicionado de cúrcuma. Estes foram mantidos por 24 h, a 32 °C e 150 rpm em incubador agitador orbital (Sartorius 780 BBraun-Certomat BS-1).

O caldo fermentado foi centrifugado e o *pellet* celular obtido foi submetido à secagem em estufa a 48 °C até o peso constante. A extração do P(3HB) foi conduzida a partir dos *pellets* em tubos de ensaio com tampa de rosca, com adição de clorofórmio na proporção de 40:1 (v/m). Os tubos foram submetidos a aquecimento em 56 °C e agitação em vórtex. As etapas subsequentes de extração seguiram o protocolo de Macagnan et al. (2017), com secagem pelo método de *casting*.

2.2 Metodologia de produção de P(3HB) colorido através da adição de corante após o processo fermentativo

5 mL de suspensão de *Ralstonia solanacearum* cepa RS foram adicionados a frasco *Erlenmeyer* aletado contendo 195 mL de YM sem corante, com pH ajustado para 6. O processo fermentativo e de obtenção do *pellet* celular se deu conforme o tópico 2.1.

Após etapa de obtenção e secagem dos filmes, estes foram ressolvabilizados em clorofórmio em tubos de ensaio com tampa de rosca com 0,30 g do biopolímero e 0,15 g de cúrcuma, nas mesmas condições do tópico 2.1. A secagem dos filmes de P(3HB) foi realizada de acordo com a metodologia de *casting* (Macagnan et al. 2017).

2.3 Teste de biodegradação em solo

Os filmes de P(3HB) corados com cúrcuma durante a fermentação foram recortados em triângulos, foram pesados em uma balança de precisão, o teste foi feito em triplicata. 130 g de terra foram acrescentadas às sementeiras (6,5 x 6,5 x 6,0 cm), com adição de 1 L de água destilada para umidificação do solo.

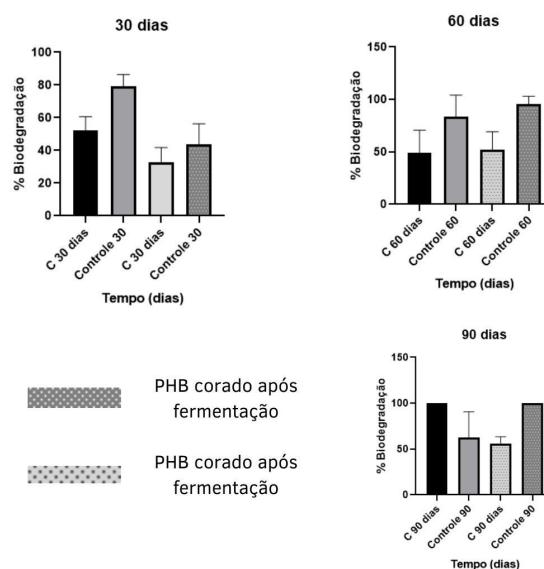
Os corpos de prova foram mantidos em sementeiras contendo solo com matéria-prima de *pinus* bioestabilizada e temperatura a 20°C durante 90 dias, com amostras coletadas a cada 30 dias. Durante o período houve acréscimo de água destilada conforme necessário para manter a umidade do solo, que foi analisada junto com os polímeros a cada 30 dias, através de cálculo gravimétrico e de percentagem de perda de massa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença estatística entre o percentual de biodegradação dos filmes submetidos ao teste em 30 dias e 60 dias (figura 1). Entretanto, após 90 dias de teste, observou-se diferença significativa entre os biopolímeros coloridos nas diferentes metodologias. Durante esse período, os obtidos por fermentação submersa com a adição do corante apresentaram taxa de biodegradação superior à outra metodologia testada. Sugere-se que a cúrcuma pode ter acumulado nos poros dos filmes (Das Chagas. al, 2022; Zanini et. al, 2023), o que diminuiria a superfície de contato do material com o solo, como observado por Jung et al. (2020).

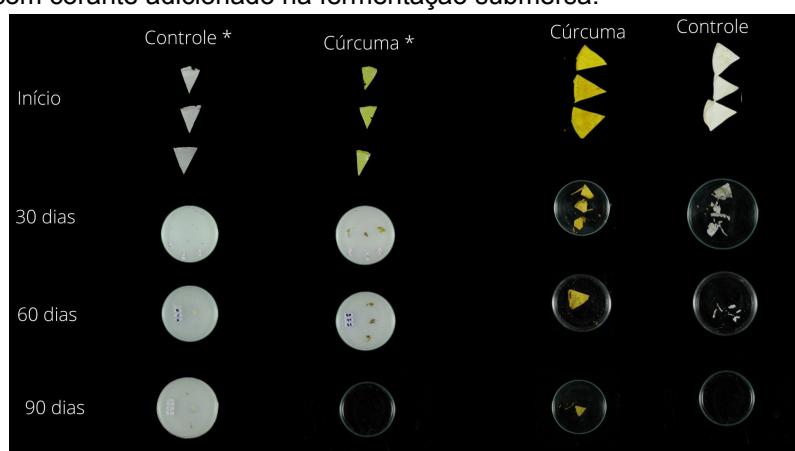
Esse fenômeno pode ter ocasionado menor percentual de degradação, uma vez que esse processo é influenciado por diversos fatores, como composição do solo, temperatura, pH, atividade microbiológica e a área de contato do biopolímero com o solo (Maier, 2018). Além disso, a cúrcuma possui efeitos antioxidantes e antimicrobianos, o que sugere que esse fator também pode ter influenciado no processo de biodegradação (Campos, 2017).

Figura 1. Gráficos de percentual de biodegradação de P(3HB) colorido a partir de duas metodologias de coloração, comparados ao controle em 30, 60 e 90 dias.



Ao comparar as duas metodologias, com base na fragmentação (figura 2), observa-se que em todos os períodos avaliados, os filmes obtidos pela metodologia de Das Chagas et al. (2022) demonstraram visualmente menor fragmentação, quando comparados com os coloridos durante a fermentação. Sugere-se que, devido à ausência de adição do corante durante o processo fermentativo, as variações de pH comuns nesse processo não influenciaram os filmes, resultando em uma maior estabilidade dos carotenóides presentes na cúrcuma. Isso se deve ao fato de que esses carotenóides são sensíveis a alterações no pH (Benucci et al., 2022).

Figura 2. Foto dos filmes de P(3HB) retirados a cada 30 dias, em que o asterisco (*) representa o filme com corante adicionado na fermentação submersa.



4. CONCLUSÕES

A escolha da metodologia de fabricação dos filmes biodegradáveis de P(3HB) e cúrcuma demonstrou ter um impacto significativo no percentual de biodegradação e na fragmentação desses materiais. A adição de corante durante o processo de fabricação parece influenciar negativamente a biodegradação, possivelmente devido ao acúmulo nos poros dos filmes. Além disso, a estabilidade dos carotenóides da cúrcuma desempenhou um papel importante na resistência dos filmes à fragmentação.

No entanto, a coloração realizada com a adição do corante durante o processo fermentativo se mostra mais vantajosa, visto que reduz a quantidade de resíduos, uma vez que elimina uma etapa de resolubilização. Isso conduziu a uma menor produção de produtos residuais, uma área em que a indústria tem se esforçado para reduzir o resíduos orgânicos (Costa et. al, 2018).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATLAS DO PLÁSTICO. [S. I.: s. n.], 2020. Disponível: <https://br.boell.org/sites/default/files/2020-11/Atlas%20do%20Pl%C3%A1stico%20-%20vers%C3%A3o%20digital%20-%2030%20de%20novembro%20de%202020.pdf>. Acesso: 08/2023.

BENUCCI, I.; LOMBARDELLI, C.; MAZZOCCHI, C.; ESTI, M. (2022). Natural colorants from vegetable food waste: Recovery, regulatory aspects, and stability— A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(3), p. 2715–2737. <<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12951>>.

DE AGUIAR, Luana Orlandi et al. Avaliação das propriedades do biopolímero polihidroxibutirato (PHB) extraído por vermes de *Zophobas morio* Fabricius. *Revista matéria*, [S. I.], 26 jan. 2021. Disponível: <https://www.scielo.br/j/rmat/a/vp65zDKRRb5VzvVcQXtcK7D/abstract/?lang=pt>. Acesso: 18 out. 2022.

JUNG, H. R.; CHOI, T. R.; HAN, Y. H.; PARK, Y. L.; PARK, J. Y.; SONG, H. S.; YANG, 2981 S. Y.; BHATIA, S. K.; GURAV, R.; PARK, H.; NAMGUNG, S.; KWON-YOUNG, C.; 2982 YANG, Y. (2020). Production of blue-colored polyhydroxybutyrate (PHB) by one-pot production and coextraction of indigo and PHB from recombinant *Escherichia coli*. *Dyes and Pigments*, 173, 107889.

LATOS-BROZIO, M.; MASEK, A. (2020). The application of natural food colorants as indicator substances in intelligent biodegradable packaging materials. *Food and Chemical Toxicology*, 135, 110975.

MAIER, Nina. Biodegradable Plastics: Approaches and experiences from 16 Members of the EPA Network. European Network of the Heads of Environment Protection Agencies (EPA Network) - Interest group on Plastics, [s. I.], 2018.

PAGNAN, C. S.; MOTTIN, A. C.; ORÉFICE, R. L.; AYRES, E.; CÂMARA, J. J. D. (2018). Annatto-colored Poly(3-hydroxybutyrate): A Comprehensive Study on Photodegradation. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(3), p. 1169–1178. <<https://doi.org/10.1007/s10924-017-1026-1>>.

Park, S. A.; Ahn, S. Y.; Choi, K. Y. (2022). Incorporation of Deoxyviolacein Functional Dye into PHB and Cellulose Double Layered-Biodegradable Polymer. *Journal of Polymers and the Environment*, 31, p. 1525–1535. <<https://doi.org/10.1007/s10924-022-02699-5>>.

Zanini, Maria Luiza de Oliveira. Obtenção de filmes de poli (3-hidroxibutirato) coloridos a partir da aplicação de corantes orgânicos naturais no processo fermentativo de *Ralstonia solanacearum* cepa RS. 2023. 102f. Mestrado em Ciências (Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.