



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS - EQA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**BIOSSÍNTESE DE SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES POR
Ensifer Meliloti SEMIA 135 E SUA APLICAÇÃO NA ELABORAÇÃO DE FILME
BIODEGRADÁVEL**

LUANA LENCINA BIANCHIN
Engenheira de Alimentos

PROF. DR. CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT
Orientador

PROF. DR. MARIANO MICHELON
Coorientador

Rio Grande, RS
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS - EQA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**BIOSSÍNTESE DE SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES POR
Ensifer Meliloti SEMIA 135 E SUA APLICAÇÃO NA ELABORAÇÃO DE FILME
BIODEGRADÁVEL**

LUANA LENCINA BIANCHIN
Engenheira de Alimentos

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre
em Engenharia e Ciência de
Alimentos.

PROF. DR. CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT
Orientador

PROF. DR. MARIANO MICHELON
Coorientador

Rio Grande, RS
2023

Ficha Catalográfica

B578b Bianchin, Luana Lencina.

Biossíntese de substâncias poliméricas extracelulares por *Ensifer meliloti* SEMIA 135 e sua aplicação na elaboração de filme biodegradável / Luana Lencina Bianchin. – 2023.
78 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2023.

Orientador: Dr. Carlos André Veiga Burkert.

Coorientador: Dr. Mariano Michelin.

1. Rizóbios 2. Bactérias diazotróficas 3. Estresse abiótico
4. Filmes biopoliméricos I. Burkert, Carlos André Veiga II. Michelin, Mariano III. Título.

CDU 338.45

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

FICHA DE APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Luana Lencina Bianchin, com orientação do Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert e coorientação do Prof. Dr. Mariano Michelin, aprovada em 30 de agosto de 2023, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:

Documento assinado digitalmente
 **CARLOS ANDRE VEIGA BURKERT**
Data: 30/08/2023 18:10:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert

Documento assinado digitalmente
 **LUIZ ANTONIO DE ALMEIDA PINTO**
Data: 04/09/2023 09:00:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.Dr. Luiz Antônio De Almeida Pinto

Documento assinado digitalmente
 **VANESSA AMARAL RIBEIRO**
Data: 01/09/2023 10:09:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr.^a Vanessa Amaral Ribeiro

*Dedico este trabalho a todos que me apoiaram.
Obrigada, obrigada e obrigada.*

AGRADECIMENTOS

Gratidão à minha família pelo suporte e apoio em todos os momentos da minha vida.

Obrigada Néelson, Juce, Bibiani e Pituca por serem tudo pra mim!

Ao meu querido presente que ganhei nesse mestrado, meu colega e amigo Yuri, obrigada por todo apoio, companheirismo e por deixar essa etapa árdua muito mais engraçada, leve e cheia de cuidado e amor.

A toda minha família da Irlanda, por todo o suporte e carinho comigo, especialmente minha querida amiga e irmã Bruna Áquino, por estar sempre comigo.

Ao meu amigo Gabriel por toda a ajuda em mais essa etapa da minha vida, me motivando e me ajudando.

À minha amiga Bruna Ferrer por todo o companheirismo e suporte.

Minha amiga de anos, Renata, por ser sempre presente na minha vida!

À minha gêmea Camila por todo o suporte e motivação mesmo distante, sempre presente.

Aos companheiros de laboratório Jandler, Joice e Rui, por todos os aprendizados compartilhados.

Ao Luan, por toda a ajuda na etapa final de elaboração dos filmes, com muita didática e paciência, me ajudando muito.

Aos meus colegas e amigos Renan, Liliane e Carol, por dividirmos todas angústias e conhecimentos.

Ao meu orientador, Prof. Carlos André, e ao meu coorientador, Prof. Mariano, pela confiança, paciência e ensinamentos compartilhados.

À Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciências dos Alimentos, por todo o ensino de qualidade oferecido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro (código financeiro 001) durante todo o meu mestrado.

RESUMO

Substâncias poliméricas extracelulares (SPE) são excretadas por diversos micro-organismos, incluindo bactérias diazotróficas, sendo compostos majoritariamente de polissacarídeos, além de proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e substâncias húmicas. A secreção de SPE pelos rizóbios está associada ao processo de invasão e desenvolvimento de bacteroides e nódulos nas raízes das plantas, além de ser uma resposta a estresses ambientais. Por outro lado, a exploração de micro-organismos para a produção de SPE têm atraído a atenção dos pesquisadores devido às suas aplicações potenciais, em que estão incluídas as embalagens biopoliméricas, que reduzem impactos ambientais por sua biodegradabilidade, bem como o uso excessivo de materiais oriundos de recursos não-renováveis. Logo, o presente trabalho tem como objetivo principal avaliar o comportamento de *Ensifer meliloti* SEMIA 135 frente a diferentes condições de estresse para biossíntese de SPE, bem como avaliar o potencial de aplicação do biopolímero na formação de filmes biodegradáveis. O meio de cultivo usado foi o caldo YMA (*Yeast Mannitol*) em um meio ajustado com pH 7, composto por (g/L): manitol (10); K₂HPO₄ (0,1); KH₂PO₄ (0,4); MgSO₄.7H₂O (0,2); NaCl (0,1); extrato de levedura (0,4); MnCl₂.7H₂O (0,12); CaCl₂.2H₂O (0,15). Os cultivos foram realizados em frascos agitados a 30 °C e 200 rpm por 72 h. Diferentes estratégias para promover o aumento da biossíntese de SPE foram avaliadas. As condições de estresse foram: ácido (ácido acético, pH 3 e 5), alcalino (hidróxido de sódio, pH 9 e 11) e salino (cloreto de sódio, 0,2 a 1,0 M) em diferentes tempos de cultivo (24 h e 48 h). Os resultados mostraram um incremento de cerca de 130% na produção de SPE quando *Ensifer meliloti* SEMIA 135 foi submetido à adição de solução salina (0,6 M) em 48 h de cultivo, indicando a potencialidade desta estratégia para aumento da produção destes biopolímeros. As SPE foram utilizadas na formulação de filme, através da técnica de *casting*, usando uma solução filmogênica com a adição de 20% de plastificante (glicerol) em relação à massa de SPE. A espessura do filme foi de 0,046 mm. A permeabilidade ao vapor de água (7,85 g.mm/kPa.dia.m²) indicou que o filme não é adequado para uso como barreira à umidade, confirmando seu caráter hidrofílico. Em relação às propriedades mecânicas, resistência à tração e capacidade de alongação (52,90 MPa e 6,73%, respectivamente), o filme apresentou valores superiores a alguns filmes obtidos com polissacarídeos microbianos. Quanto à cor, o filme apresentou uma alta luminosidade (L* = 93,87). Desta forma, as SPE produzidas por *Ensifer meliloti* SEMIA 135 mostram-se promissoras para a elaboração de filmes biodegradáveis com potencial comercial.

Palavras-chave: rizóbios, bactérias diazotróficas, estresse abiótico, filmes biopoliméricos.

ABSTRACT

Extracellular polymeric substances (EPS) are excreted by several microorganisms, including diazotrophic bacteria, and are mainly composed by polysaccharides, in addition to proteins, nucleic acids, lipids and humic substances. Secretion of SPE by rhizobia is associated with the process of invasion and development of bacteroides and nodules on plant roots, in addition to being a response to environmental stress. On the other hand, the exploitation of microorganisms to produce SPE has attracted the attention of researchers due to its potential applications, which include biopolymeric packaging, which reduces environmental impacts due to their biodegradability, as well as the excessive use of materials from non-renewable resources. Therefore, the main objective of this work is to evaluate the behavior of *Ensifer meliloti* SEMIA 135 under different stress conditions for SPE biosynthesis, as well as to evaluate the potential application of the biopolymer in the formation of biodegradable films. The culture medium used was YMA broth (Yeast Mannitol) adjusted to pH 7, composed by (g/L): mannitol (10); K₂HPO₄ (0.1); KH₂PO₄ (0.4); MgSO₄.7H₂O (0.2); NaCl (0.1); yeast extract (0.4); MnCl₂.7H₂O (0.12); CaCl₂.2H₂O (0.15). Cultivations were carried out in shaken flasks at 30 °C and 200 rpm for 72 h. Different strategies to promote increased SPE biosynthesis were evaluated. The stress conditions were: acidic (acetic acid, pH 3 and 5), alkaline (sodium hydroxide, pH 9 and 12) and saline (sodium chloride, 0.2 to 1.0 M) at different cultivation times (24 h and 48 h). The results showed an increase of about 130% in the production of SPE when *Ensifer meliloti* SEMIA 135 was submitted to the addition of saline solution (0.6 M) in 48 h of cultivation, indicating the potential of this strategy to increase the production of these biopolymers. The SPE were used in the film formulation, through the casting technique, using a filmogenic solution with the addition of 20% plasticizer (glycerol) in relation to the mass of SPE. The film thickness was 0.046 mm. Water vapor permeability (7.85 g.mm/kPa.day.m²) indicated that the film is not suitable for use as a moisture barrier, confirming its hydrophilic character. Regarding the mechanical properties, tensile strength and elongation (52.90 MPa and 6.73%, respectively), the film showed higher values than some films obtained with microbial polysaccharides. As for color, the film showed a high luminosity (L* = 93.87). Thus, the SPE produced by *Ensifer meliloti* SEMIA 135 are promising for the development of biodegradable films with commercial potential.

Keywords: rhizobia, diazotrophic bacteria, abiotic stress, biopolymeric films.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

Tabela 1- Estresses ácido e alcalino na produção de SPE por <i>Ensifer meliloti</i> SEMIA 135 em 72 h de cultivo.	32
Tabela 2 - Estresses ácido e alcalino na produção de biomassa por <i>Ensifer meliloti</i> SEMIA 135 em 72 h de cultivo	33
Tabela 3 - Estresse salino na produção de SPE por <i>Ensifer meliloti</i> SEMIA 135 em 72 h de cultivo	34
Tabela 4- Estresse salino na produção de biomassa por <i>Ensifer meliloti</i> SEMIA 135 em 72 h de cultivo	35

CAPÍTULO IV

Tabela 1- Parâmetros do cultivo* de <i>Ensifer meliloti</i> SEMIA 135.....	49
Tabela 2 - Teores de C, N e H nas amostras de SPE produzidas por <i>Ensifer meliloti</i> SEMIA 135.....	50
Tabela 3 – Formulações utilizadas nos testes preliminares para produção de filmes.....	53
Tabela 4 - Propriedades físicas, mecânicas e ópticas obtidas do filme de SPE.....	54
Tabela 5 - Propriedades mecânicas dos filmes de SPE de diferentes micro-organismos.....	56

LISTAS DE FIGURAS

CAPÍTULO III

- Figura 1** - Biomassa ao longo do cultivo de *Ensifer meliloti* SEMIA 135 submetido a diferentes pH.36
- Figura 2** - Biomassa ao longo do cultivo de *Ensifer meliloti* SEMIA 135 submetido a diferentes concentrações salinas.....37

CAPÍTULO IV

- Figura 1** - Espectro de absorção no infravermelho para a amostra de EPS de *Ensifer meliloti* SEMIA 135.....51
- Figura 2** - Etapas do processo da obtenção do filme de SPE.52
- Figura 3** - Diferentes formulações de filmes obtidos nos testes preliminares.....53
- Figura 4** - Microscopia eletrônica de varredura da seção transversal dos filmes de SPE de *Ensifer meliloti* SEMIA 135.....57
- Figura 5** - Microscopia eletrônica de varredura da superfície dos filmes de SPE de *Ensifer meliloti* SEMIA 135.....58

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	14
1. INTRODUÇÃO GERAL	15
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
CAPÍTULO II.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES – SPE.....	19
2.2 MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE SPE.....	20
2.3 ESTRESSE SALINO, ALCALINO E ÁCIDO	21
2.4 USO DE BIOPOLÍMEROS COMO EMBALAGENS.....	22
2.5 FORMAÇÃO DE FILMES.....	23
CAPÍTULO III	26
1. INTRODUÇÃO.....	28
2.1 MATERIAL	29
2.1.1 Micro-organismo	29
2.2 MÉTODOS.....	29
2.2.1 Cultivos para Produção de SPE.....	29
2.2.1.1 Manutenção da cultura.....	29
2.2.1.2 Preparo do inóculo.....	29
2.2.1.3 Cultivos em frascos agitados	30
2.2.2 Condições de Estresse	30
2.2.2.1 Estresse alcalino	30
2.2.2.2 Estresse salino	30
2.2.2.3 Estresse ácido	30
2.2.3 Determinação de SPE e Biomassa.....	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	31
4. CONCLUSÃO.....	37

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
CAPÍTULO IV	40
1. INTRODUÇÃO.....	42
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1 MATERIAL	43
2.1.1 Micro-organismo	43
2.2 MÉTODOS.....	44
2.2.1 Produção das Substâncias Poliméricas Extracelulares (SPE).....	44
2.2.2 Parâmetros do Cultivo	44
2.2.2.1 Biomassa e pH.....	44
2.2.2.2 Produtividades	44
2.2.2.3 Fator de conversão de biomassa em produto.....	45
2.2.3 Análise Elementar CHN	45
2.2.4 Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR).....	46
2.2.5 Formação do Filme Biopolimérico.....	46
2.2.6 Caracterização do Filme Biopolimérico	46
2.2.6.1 Testes preliminares	46
2.2.6.2 Solubilidade em água.....	47
2.2.6.3 Permeabilidade ao vapor d'água (PVA).....	47
2.2.6.4 Propriedades ópticas	48
2.2.6.5 Propriedades mecânicas.....	48
2.2.6.6 Propriedades microestruturais	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	49
3.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS SPE	49
3.2 FORMAÇÃO DO FILME BIOPOLÍMERO	52
3.2.1 Caracterização do Filme Biopolimérico	52
3.2.1.1 Testes preliminares	52
3.2.1.2 Propriedades físicas	54
3.2.1.3 Propriedades mecânicas.....	55
3.2.1.4 Propriedades ópticas	56
3.2.3.5 Propriedades microestruturais	56
4. CONCLUSÃO.....	58

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
CAPÍTULO V	64
5. CONCLUSÃO GERAL	65
CAPÍTULO VI.....	66
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
6.1 RESÍDUOS GERADOS E DESTINO	67
6.2 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	67
CAPÍTULO VII.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
APÊNDICES	78

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

Há um crescente interesse pelos biopolímeros de origem microbiana, já que esses exibem vantagens na sua obtenção com relação às outras fontes, tais como: produção independente de condições climáticas, possibilidade de utilização de matérias-primas regionais, maior rapidez na obtenção do produto acabado e necessidade de espaço relativamente pequeno. Além disso, os polímeros de origem microbiana apresentam maior uniformidade em suas propriedades físico-químicas devido à especificidade do micro-organismo utilizado e à possibilidade de controle dos parâmetros de cultivo, tais como pH, temperatura, taxa de aeração, velocidade de agitação, tempo de cultivo e composição do meio de cultura (OLIVEIRA, 2013; FREITAS; ALVES; REIS, 2011).

Neste sentido, destacam-se as substâncias poliméricas extracelulares (SPE), que podem ser excretadas por diversos micro-organismos, sendo estas uma mistura complexa formada majoritariamente por polissacarídeos, além de proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e substâncias húmicas (VU et al., 2009). As SPE são sintetizadas por micro-organismos e acumuladas no ambiente extracelular, apresentando uma ampla variedade de combinações estruturais que dão origem a diferentes propriedades e, assim, possibilidades de aplicações distintas (MOSCOVICI, 2015).

Bactérias diazotróficas, micro-organismos que constituem associações simbióticas com leguminosas, possibilitando a fixação biológica de nitrogênio atmosférico ao reduzi-lo à amônia, são reconhecidas como produtoras de SPE com potencial comercial (CASTELLANE et al., 2015; CASTELLANE et al., 2017; OLIVEIRA; AMARAL; BURKERT, 2018; OLIVEIRA, MICHELON; BURKERT, 2020; ROESLER et al., 2021).

Existem várias pesquisas para o estabelecimento de condições de cultivo com o intuito de aumentar a produção de polímeros por micro-organismos, bem como reduzir custos, principalmente com o meio de cultivo. Baseiam-se, principalmente, na mudança de fonte de carbono com a utilização de resíduos agroindustriais (OLIVEIRA, AMARAL, BURKERT, 2018; GONZÁLEZ, 2019; OLIVEIRA; MICHELON; BURKERT, 2020; ROESLER, 2021) e variação das condições operacionais tais como temperatura, aeração, agitação, pH e razão C/N, entre outras (STAUDT; WOLFE; SHROUT, 2012; CRUZ, 2021; SANTOS, 2022).

Por outro lado, com este mesmo intuito, uma estratégia ainda pouco explorada é a submissão do micro-organismo a uma condição de estresse durante o cultivo. Como exemplos, o uso de estresse ácido (LUVIELMO et al., 2016) e estresse alcalino (SHEHNI et al., 2011) no cultivo de *Xanthomonas campestris* para produção de goma xantana e a utilização de estresse

salino na produção de SPE por cianobactérias (OZTURK; ASLIM, 2010) resultaram em um maior rendimento dos biopolímero. No trabalho de Trindade, Munhoz e Burkert (2018), o estresse alcalino levou a incrementos de 133,80%, 73,69% e 164,86% na produção de xantana quando sacarose, glicerol bruto ou uma mistura de ambos foram usados como fonte de carbono, respectivamente. E, apesar do comportamento reológico similar, a viscosidade inicial das suspensões de goma foi menor quando o estresse alcalino foi empregado

Segundo Galdeano et al. (2009), materiais sintéticos são resistentes ao ataque químico e biológico, o que faz com que os mesmos tenham durabilidade e suas propriedades mantidas por períodos prolongados, logo o tempo necessário para a sua degradação é longo, causando impactos ambientais. Diante disto, o uso de polímeros biodegradáveis caracteriza-se como uma possível alternativa para reduzir tais efeitos. Entre os biomateriais com potencial aplicação na formação de filmes, têm-se destacado as SPE microbianas, conforme proposto por Piermaria et al. (2009) e Alves et al. (2011), obtendo-se filmes com ótimas propriedades. No entanto, não há menção na literatura de filmes biodegradáveis obtidos a partir de SPE rizobianas.

O Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Escola de Química e Alimentos (EQA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) vem se dedicando ao estudo da produção de SPE de bactérias diazotróficas, avaliando o potencial de produção de diferentes microorganismos, tais como *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816 (OLIVEIRA; AMARAL; BURKERT, 2018; GONZÁLEZ, 2019; OLIVEIRA; MICHELON; BURKERT, 2020; ROESLER et al., 2021), *Mesorhizobium huakuii* SEMIA 6454 (GONZÁLEZ, 2019) e *Rhizobium haultense* SEMIA 6450 (OLIVEIRA; MICHELON; BURKERT, 2020). Neste contexto, o presente trabalho visa contribuir na elucidação de alguns aspectos da produção e aplicação de SPE de *Ensifer meliloti* SEMIA 135.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o comportamento de *Ensifer meliloti* SEMIA 135 frente a diferentes condições de estresse para biossíntese de SPE, bem como avaliar o potencial de aplicação do biopolímero na formação de filmes biodegradáveis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o comportamento do micro-organismo *Ensifer meliloti* SEMIA 135, em termos de produção de substâncias poliméricas extracelulares (SPE), quando submetido a condições de estresse ácido (pH 3 e 5), alcalino (pH 9 e 11) e salino (0,2 M a 1 M), em diferentes tempos de cultivo (24 h ou 48 h).
- Elaborar filme biopolimérico, utilizando substâncias poliméricas extracelulares (SPE) de *Ensifer meliloti* SEMIA 135 como biopolímero e glicerol como plastificante, caracterizando-o com relação às propriedades de barreira, mecânicas, ópticas e estruturais.

CAPÍTULO II

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SUBSTÂNCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES – SPE

Os biopolímeros de origem microbiana, que são conhecidos como Substâncias Poliméricas Extracelulares - SPE (EPS, do inglês *Extracellular Polymeric Substances*), são constituídos por uma mistura de polímeros de alta massa molar. A composição química das SPE é muito heterogênea e complexa. No entanto, de um modo geral, são os polissacarídeos que predominam (WIMPENNEY; PETERS; SCOURFIELD, 1993), também podendo ser constituídos por proteínas, substâncias húmicas, ácidos nucleicos (JAHN; NIELSEN, 1995), glicoproteínas e fosfolipídios (PHILLIPS et al., 2010). A concentração de cada componente das SPE influencia diretamente nas suas características e, conseqüentemente, nas suas aplicações tecnológicas (OMOIKE; CHOROVER, 2006; SHI et al., 2017).

Destaca-se que a sigla EPS foi usada como uma abreviatura para polissacarídeos extracelulares, exopolímeros ou exopolissacarídeos (COSTA; RAAIJMAKERS; KURAMAE, 2018). No entanto, os agregados de células microbianas formam biofilmes, criando uma rede de substâncias poliméricas extracelulares, que incluem quaisquer substâncias de origem biológica (GEESEY, 1982). Thomas Neu, Hans-Curt Flemming e seus colaboradores também conceituaram a sigla EPS para integrar as substâncias poliméricas extracelulares ou secreções bacterianas. A abreviatura foi estruturada para ressaltar a ampla gama de moléculas tais como proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídios que compreendem estas secreções (DECHO, 2013).

Os polissacarídeos constituem o principal componente das SPE, sendo que a capacidade de algumas bactérias em produzi-los é reconhecida há décadas. Os polissacarídeos extracelulares são classificados como polissacarídeos capsulares ou exopolissacarídeos, logo quando bactérias são cultivadas em cultura líquida e em seguida centrifugadas, os polissacarídeos extracelulares que permanecem associados à célula bacteriana são referidos como cápsula, enquanto aqueles que permanecem no sobrenadante são referidos como exopolissacarídeos (BRANDA et al., 2005).

Vários setores da indústria de alimentos, farmacêutica, petrolífera, cosmética, têxtil, de tintas, produtos agrícolas, entre outras, utilizam polissacarídeos microbianos, devido às suas características estruturais e, conseqüentemente, às suas propriedades. Logo, dependendo de sua estrutura química, são utilizados como emulsificantes, estabilizantes, ligantes, agentes

gelificantes, coagulantes, lubrificantes e formadores de filme. Esses biopolímeros emergiram rapidamente como uma nova e importante fonte industrial de material polimérico, competindo gradualmente, sob o ponto de vista econômico, com gomas naturais de algas marinhas e plantas (LOPES; ANDRADE; MANO, 1991; LOPES; ANDRADE, 1995). Comparado com as plantas, os polissacarídeos microbianos são mais adequados à produção em larga escala, independentemente das condições climáticas e sazonalidade, bem como permitindo um melhor controle do processo. Além disso, a diversidade microbiana permite a obtenção de polissacarídeos com propriedades específicas, ampliando as possibilidades de aplicação (KHAN et al., 2022).

2.2 MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE SPE

Bactérias fixadoras de nitrogênio são geralmente produtoras de SPE (BECKER; PÜHLER, 1998). Dentre estas, as da ordem Rhizobiales, pertencentes às famílias Rhizobiaceae (gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Ensifer*) e Phyllobacteriaceae (*Mesorhizobium*), sintetizam SPE (BECKER; PÜHLER, 1998; CASTELLANE; LEMOS, 2007).

Bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium* constituem o grupo dos rizóbios, as quais são Gram-negativas, aeróbias, capazes de produzir desde homopolissacarídeos, como simples glicanas, até heteropolissacarídeos complexos (MONTEIRO et al., 2012; RIBEIRO, 2015; RIBEIRO; BURKERT, 2016). De acordo com Monteiro et al. (2012), existem alguns tipos de biopolímeros produzidos por essas bactérias, como succinoglicanas, poliglicuranas e glicanas cíclicas, sendo estes constituídos por D-glicose, D-galactose e ácido D-glicurônico, contendo ou não piruvato, sendo este último geralmente ligado às ramificações e grupos O-acetil.

Segundo Reinhold-Hurek e Hurek (1998), os rizóbios são bactérias estudadas para produção de biopolímeros com potencial industrial e são classificados como bactérias diazotróficas. Os micro-organismos diazotróficos possibilitam a fixação biológica do nitrogênio atmosférico ao reduzi-lo via enzimática à amônia, sendo desta forma acessível aos organismos vivos. Os autores afirmam também que plantas constituem associações simbióticas com bactérias diazotróficas para obter este benefício. A simbiose entre leguminosas e rizóbios é um caso dessas associações, onde estas bactérias fixam nitrogênio como endossimbiontes, dentro de nódulos radiculares em um microambiente rico em nutrientes. Estas associações são muito específicas entre estes parceiros simbióticos, significando que só certas combinações entre estes organismos são efetivas para o processo de fixação (SCHULTZE; KONDOROSI, 1998).

A fonte de carbono comumente utilizada no cultivo destas bactérias é o manitol (FERNANDES JÚNIOR et al., 2010; PRIYANKA et al., 2015; RAZIKA et al., 2012), mas diversos estudos têm abordado a substituição do manitol por outras fontes de carbono, como o glicerol (CASTELLANE; LEMOS, 2007), glicose e galactose (CASTELLANE; LEMOS, 2007; RAZIKA et al., 2012) e sacarose (CASTELLANE; LEMOS, 2007; CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014; CASTELLANE et al., 2015; CASTELLANE et al., 2017; MORETTO et al., 2015, RAZIKA et al., 2012). Devido ao alto custo para utilização dos açúcares citados acima, fontes de carbono alternativas vêm sendo pesquisadas, como o uso de coprodutos agroindustriais, tais como: glicerol oriundo do biodiesel (RIBEIRO, 2015; OLIVEIRA; AMARAL; BURKERT, 2018); coprodutos lácteos, como permeado de soro (TRINDADE, 2018; GONZÁLEZ, 2019) e colostro bovino (GONZÁLEZ, 2019); melão de soja (OLIVEIRA; MICHELON; BURKERT, 2020); e hidrolisado de cascas de soja (ROESLER, 2021).

2.3 ESTRESSE SALINO, ALCALINO E ÁCIDO

Para as condições ótimas de crescimento, os organismos unicelulares precisam de um ambiente intracelular específico e balanceado. Diferentes condições no ambiente externo podem resultar em uma variedade de perturbações que podem reduzir a atividade enzimática, interromper o fluxo metabólico, danificar as estruturas celulares e alterar os gradientes químicos levando a célula a uma condição de instabilidade. Entretanto, as células são capazes de manter a homeostase mesmo diante de mudanças no ambiente externo (GASCH et al., 2000).

A resposta aos diferentes tipos de estresse é uma característica fundamental na adaptação dos organismos vivos às condições adversas do ambiente (MELO, 2006). Logo, pesquisas vêm sendo realizadas para compreender o comportamento dos micro-organismos frente a condições de estresse. Luvielmo et al. (2016) demonstraram que 9,4 g/L de goma xantana foram obtidos após 72 h de cultivo, enquanto 11,8 g/L de goma xantana foram obtidos após 1 h de estresse alcalino, utilizando hidróxido de sódio 10 M até atingir um pH de 12, o que representa um aumento de 25,7% na produção. Depois de 24 h de estresse alcalino, a quantidade de biopolímero aumentou para 16,5 g/L, representando um aumento de 74,8% na produção de xantana em relação ao processo convencional sem estresse alcalino. De acordo com os mesmos autores, os resultados encontrados indicam que o estresse alcalino pode induzir as células a produzirem uma quantidade maior de xantana como um mecanismo de

proteção contra condições adversas do meio.

Ozturk e Aslim (2010) realizaram uma investigação para determinar a correlação entre a resistência ao sal e a produção de SPE por três isolados de cianobactérias. Os referidos autores afirmam que o estresse salino é um dos mais importantes para micro-organismos, no entanto não existe muito conhecimento relacionado a esse comportamento. Os autores analisaram no seu trabalho o efeito da concentração de cloreto de sódio (0,2 e 0,4 M) na produção de SPE por três linhagens (*Synechocystis* sp. BASO444, *Synechocystis* sp. BASO511 e *Synechocystis* sp. BASO507). Observaram aumento significativo e regular na produção de SPE por *Synechocystis* sp. BASO444, de 500 mg/L, sem NaCl, para 650 mg/L com 0,4 M de NaCl. Condições de alta salinidade causam efeitos de estresse no micro-organismo que, como resposta, elevam a produção de SPE, com o intuito de aliviar os efeitos do estresse sobre o crescimento e atividade metabólica (MOSHABAKI ISFAHANI et al., 2018).

Shehni et al. (2011) utilizaram ácido acético para aumentar a produção de xantana a partir do *Xanthomonas campestris* b82, sendo que o ácido utilizado é um ácido carboxílico orgânico relativamente fraco que às vezes é usado em pequenas quantidades na formação de goma xantana. Assim, duas concentrações de ácido acético (de 1,56 e 6,25 mM), em um (após 24 h), dois (após 24 e 26 h) ou três pulsos (após 22, 24 e 26 h) foram adicionadas ao meio, com posterior 72 h de incubação a 28-30°C. O aumento na concentração de xantana foi observado de acordo com as concentrações e números de pulsos de adição de ácido acético, sendo que a formação de xantana aumentou quando foram alimentados dois pulsos de 6,25 mM após 24 e 26 h de incubação. Observaram também que o aumento da concentração do ácido não apresentou um efeito significativo na síntese de xantana. Sendo assim, os autores concluíram que os resultados encontrados mostraram efeito positivo da adição de ácido acético na biossíntese de xantana por *Xanthomonas campestris* b82.

2.4 USO DE BIOPOLÍMEROS COMO EMBALAGENS

O uso de revestimentos de proteção e embalagens adequadas pela indústria de alimentos se tornou um tema de grande interesse devido ao seu potencial para aumentar a vida útil de muitos produtos alimentícios e ainda minimizar o impacto ambiental gerado pelos resíduos e descarte de polímeros sintéticos, tais como polimetacrilato de metila (acrílico), poliestireno, policloreto de vinila (PVC), polietileno e polipropileno. Sendo assim, incentiva-se a exploração e pesquisas de novos produtos de base biológica para materiais de embalagem,

como filmes comestíveis e biodegradáveis de recursos renováveis (BRITO et al., 2011).

O processo de biodegradação baseia-se na conversão de compostos orgânicos em compostos simples através do ciclo elementar do carbono, nitrogênio e enxofre, levando em consideração a ação de micro-organismos e enzimas encontrados no solo. Embalagens e polímeros biodegradáveis por sua vez são fontes de nutrientes e, em condições normais de umidade, pressão e temperatura, são consumidos e degradados (LANDIM et al., 2016).

Neste sentido, nas últimas duas décadas, houve um crescente interesse público e científico com relação ao uso e desenvolvimento de biopolímeros. Além de possuírem as propriedades físicas e químicas semelhantes aos plásticos sintéticos convencionais, eles podem ser obtidos a partir de fontes renováveis (RHIM; PARK; HA, 2013). Entretanto, ainda há limitações de aplicação quando comparados aos materiais sintéticos, por serem menos flexíveis e apresentarem alto custo (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

Pesquisas estão sendo realizadas para a aplicação dos biopolímeros na elaboração de filmes. Dependendo da matriz polimérica, o filme tem diferentes características tecnológicas, como por exemplo: filmes formados por polissacarídeos e proteínas possuem excelentes propriedades mecânicas, porém apresentam alta permeabilidade ao vapor de água; o contrário ocorrendo com os filmes compostos de lipídios (GALLO et al., 2000).

2.5 FORMAÇÃO DE FILMES

Os filmes biopoliméricos são formados por polímeros naturais como os polissacarídeos, proteínas e lipídios (MUZZARELLI, 2001). Diversas matérias-primas estão sendo pesquisadas para obtenção de filmes biopoliméricos, onde os mais utilizados são os polissacarídeos, com destaque para o amido, celulose, quitina, quitosana, xantana e alguns polipeptídeos naturais (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006). A degradação destes polímeros na natureza ocorre por fungos que secretam endo e exoenzimas e por micro-organismos específicos que degradam o polissacarídeo até aos produtos finais CO₂ e água (SHIGEMASA et al., 1999).

Definem-se como filmes biodegradáveis as finas películas obtidas a partir de material biodegradável, tais como polissacarídeos, proteínas e lipídios oriundos das mais diversas fontes, utilizando também solventes e plastificantes, tendo sua utilização baseada principalmente na proteção dos alimentos através de barreiras a agentes externos, desta forma protegendo os produtos e elevando o tempo de vida útil dos mesmos (KROCHTA, 2002).

Dentre as técnicas mais utilizadas na obtenção de filmes destaca-se o método de *casting*, o qual consiste na dispersão ou solubilização de biopolímeros em um solvente adicionado de

plastificantes, obtendo assim uma solução filmogênica que após estar seca é capaz de formar um filme (SOARES, 2012).

Os plastificantes comumente usados na produção de filmes são os polióis, tais como o glicerol e o sorbitol, devido à compatibilidade destes com diversos polímeros (LEE; CHOI, 1998). O glicerol caracteriza-se como uma molécula altamente higroscópica, de baixa massa molar, baixo custo, atóxico e de alto ponto de ebulição. Este plastificante é considerado como um dos mais efetivos em termos de propriedades térmicas e mecânicas, uma vez que possui a capacidade de reduzir o número de pontes de hidrogênio, interferindo no espaço molecular, bem como pelo fato de que possui a capacidade de se inserir e posicionar-se dentro da rede tridimensional do biopolímero (HAN et al., 2006; HERNANDEZ-IZQUIERDO; KROCHTA, 2008).

Sabe-se pouco em relação à aplicação de SPE em filmes. No entanto, Piermaria et al. (2009) elaboraram filmes a partir de Kefiran, um polissacarídeo obtido pela microflora de grãos de Kefir. Nesse estudo, os autores avaliaram diferentes concentrações de polissacarídeos e glicerol. Foi possível a formação de filmes transparentes comestíveis, sendo a melhor performance obtida com concentração de 10 g/kg de polissacarídeos e a utilização de 25 g de glicerol por 100 g de Kefiran. Tais valores permitiram obter uma matriz com menor permeabilidade ao vapor de água e excelente flexibilidade, ainda maior do que aquelas correspondentes ao polietileno de baixa densidade, que é comumente utilizado nas indústrias alimentícias.

Alves et al. (2011) produziram SPE por *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 cultivada em um meio modificado suplementado com glicerol (subproduto). Os filmes produzidos se apresentaram transparentes, de fácil manuseio, mesmo apresentando certa rigidez e com baixa tensão na ruptura quando submetido a testes de tração. Apresentaram, também, alta permeabilidade ao vapor de água, mas exibiram boas propriedades de barreira ao dióxido de carbono, melhor do que alguns polímeros sintéticos. Os autores, ainda, realizaram testes preliminares quanto à biodegradabilidade dos filmes, os quais revelaram uma boa biodegradação em um experimento de 28 dias em placas de ágar com um inóculo preparado a partir de uma amostra de solo.

Gongi et al. (2022) estudaram a elaboração de filmes a partir da síntese de SPE produzidas pela microalga termofílica *Graesiella* sp. Os resultados mostraram uma estrutura compacta e homogênea. Apesar de sua baixa resistência à tração (16,24 MPa) e capacidade de alongação (4,76%), em comparação com outros filmes sintéticos, o filme exibiu uma resistência à perfuração, permeabilidade ao vapor de água (0,008 kg/s.m².Pa) e transparência ótima para

filmes. Além disso, os autores realizaram a aplicação do filme em embalagens de carne, aumentando a vida útil da carne durante o armazenamento a frio, limitando a deterioração microbiológica e reduzindo a perda de qualidade em relação à oxidação lipídica, degradação de proteínas e descoloração. Afirmam ainda que os filmes são uma possível alternativa para substituir embalagens sintéticas poluentes por um material natural, biodegradável e de qualidade alimentar.

De maneira similar, ácido hialurônico (SUN; ZHITOMIRSKY, 2009) e gelana (XU et al., 2007) são outros exemplos de polissacarídeos microbianos que foram testados para produzir filmes biodegradáveis. A goma xantana, por sua vez, vem sendo utilizada em misturas com outros biopolímeros (SOARES et al., 2005).

CAPÍTULO III

Biossíntese de Substâncias Poliméricas Extracelulares por *Ensifer meliloti* SEMIA 135 sob
Diferentes Condições de Estresse

RESUMO

O objetivo principal deste trabalho foi investigar os efeitos de diferentes estresses químicos (ácido, alcalino e salino) na produção de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) de *Ensifer meliloti* SEMIA 135. O meio de cultivo usado foi o caldo YMA (*Yeast Mannitol*) em um meio ajustado com pH 7, composto por (g/L): manitol (10); K₂HPO₄ (0,1); KH₂PO₄ (0,4); MgSO₄.7H₂O (0,2); NaCl (0,1); extrato de levedura (0,4); MnCl₂.7H₂O (0,12); CaCl₂.2H₂O (0,15). Os cultivos foram realizados em frascos agitados a 30 °C e 200 rpm por 72h. Diferentes estratégias para promover o aumento da biossíntese de SPE foram avaliadas. As condições de estresse foram: ácido (ácido acético, pH 3 e 5), alcalino (hidróxido de sódio, pH 9 e 11) e salino (cloreto de sódio, 0,2 a 1,0 M) em diferentes tempos de cultivo (24 h e 48 h). Os resultados mostraram um incremento de cerca de 130% na produção de SPE quando *Ensifer meliloti* SEMIA 135 foi submetido à adição de solução salina (0,6 M) em 48 h de cultivo, indicando a potencialidade desta estratégia para aumento da produção destes biopolímeros.

Palavras-Chaves: estresse abiótico, biopolímeros, bactérias diazotróficas.

1. INTRODUÇÃO

Substâncias Poliméricas Extracelulares - SPE (EPS, do inglês *Extracellular Polymeric Substances*) são constituídas por uma mistura de polímeros de alta massa molar. A composição química das SPE é muito heterogênea e complexa. No entanto, de um modo geral, são os polissacarídeos que predominam (WIMPENNEY; PETERS; SCOURFIELD, 1993), também podendo conter proteínas, substâncias húmicas, ácidos nucleicos (JAHN; NIELSEN, 1995), glicoproteínas e fosfolipídios (PHILLIPS et al., 2010).

As SPE podem ser produzidas por vários grupos de micro-organismos, tais como fungos filamentosos, leveduras e bactérias, sendo que diversos estudos vêm sendo conduzidos com o intuito de estabelecer as melhores condições visando aumentar a produção. Soma-se a isso o crescente interesse em recursos renováveis que está conduzindo também à expansão do mercado de SPE microbianas (PESSÔA et al., 2019).

Os rizóbios constituem um grupo de bactérias fixadoras de nitrogênio que produzem uma variedade de SPE, desde glicanas simples até heteropolímeros complexos. A secreção de SPE pelos rizóbios está associada ao processo de invasão e desenvolvimento de bacteroides e nódulos nas raízes das plantas, além de ser uma resposta a estresses ambientais. Existem diferentes tipos de polissacarídeos de superfície, como lipopolissacarídeos, polissacarídeos capsulares e polissacarídeos neutros e ácidos encontrados nos rizóbios. A produção de polissacarídeos simbioticamente ativos também pode fornecer adaptabilidade ao estresse para cepas de rizóbios contra mudanças nas condições ambientais (SENTHIL KUMAR; SWARNALAKSHMI; ANNAPURNA, 2017).

Estudos envolvendo a produção de SPE por rizóbios têm sido focados sobretudo na mudança da fonte de carbono comumente utilizada (manitol) por resíduos agroindustriais (OLIVEIRA, AMARAL, BURKERT, 2018; GONZÁLEZ, 2019; OLIVEIRA; MICHELON; BURKERT, 2020; ROESLER, 2021) e variação das condições operacionais tais como temperatura, aeração, agitação, pH e razão C/N, entre outras (STAUDT; WOLFE; SHROUT, 2012; SANTOS, 2022; CRUZ, 2021).

Por outro lado, tem sido reportado que um incremento na produção de biopolímeros microbianos pode ser conseguido como uma resposta a uma condição de estresse a que o micro-organismo é submetido, como na produção de goma xantana (TRINDADE; MUNHOZ; BURKERT, 2018; LUVIELMO et al., 2016; SHEHNI et al., 2011). Entretanto, tal estratégia não é reportada para os rizóbios. Desta forma, este trabalho propõe avaliar o efeito de diferentes

condições de estresse (ácido, alcalino e salino) na biossíntese de SPE por *Ensifer meliloti* SEMIA 135.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Escola de Química de Alimentos (EQA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), utilizando também a estrutura de outros laboratórios da unidade.

2.1 MATERIAL

2.1.1 Micro-organismo

A bactéria *Ensifer meliloti* SEMIA 135 utilizada no presente estudo foi fornecida pelo Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária - DDPa da Secretaria de Agricultura, Pecuária e Irrigação - SEAP (Porto Alegre, RS, Brasil).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Cultivos para Produção de SPE

2.2.1.1 Manutenção da cultura

A partir da cultura refrigerada a 8°C, foram realizados repiques sucessivos, sendo utilizado o ágar YMA (*Yeast Mannitol*), contendo (g/L): manitol (10); K₂HPO₄ (0,4); MgSO₄.7H₂O (0,2); NaCl (0,1); extrato de levedura (0,4); ágar (15). A bactéria foi incubada em estufa bacteriológica (Quimis QE316M2, Brasil) a 30°C por 48 h. A cepa foi mantida refrigerada (8 °C), sendo realizados repiques trimestrais.

2.2.1.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado partindo de um tubo contendo a cultura microbiana reativada, sendo coletada com 10 mL água peptonada 0,1% (m/v), a fim de resultar em uma suspensão de células. Posteriormente, transferiu-se para frasco *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 90 mL de

caldo YMA, com a seguinte composição (g/L): 10 manitol; 0,1 K₂HPO₄; 0,4 KH₂PO₄; 0,2 MgSO₄.7H₂O; 0,1 NaCl; 0,4 extrato de levedura. Os frascos foram mantidos em incubadora refrigerada com agitação orbital (Tecnal TE-424, Brasil) a 30°C e 200 rpm, até atingir a densidade ótica (DO) de 0,8 a 600 nm (STAUDT; WOLFE; SHROUT, 2012).

2.2.1.3 Cultivos em frascos agitados

Os cultivos foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 100 mL de meio com a seguinte composição (g/L): 10 manitol; 0,1 K₂HPO₄; 0,4 KH₂PO₄; 0,2 MgSO₄.7H₂O; 0,1 NaCl; 0,4 extrato de levedura; 0,12 MnCl₂.7H₂O; 0,15 CaCl₂.2H₂O; pH ajustado em 7,0. Os frascos foram incubados a 30 °C e 200 rpm por 72 h, adicionando-se 10% v/v de inóculo (OLIVEIRA; MICHELON; BURKERT, 2020). Foram realizados cultivos submetidos ao estresse alcalino, salino e ácido (em 24 h ou 48 h após a inoculação), bem como um cultivo controle (sem estresse). Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

2.2.2 Condições de Estresse

2.2.2.1 Estresse alcalino

Em 24 h ou 48 h após o início do cultivo, foram adicionados 0,15 mL de hidróxido de sódio 10 M para atingir pH 9 e 0,35 mL para pH 11, baseado em Luvielmo et al. (2016), com adaptações. Após 72 h de cultivo, foram retiradas amostras para determinação da concentração de SPE.

2.2.2.2 Estresse salino

Nos tempos de 24 e 48 h, após o início do cultivos, foram adicionadas soluções de NaCl nas concentrações de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 M, baseado em Ozturk e Aslim (2010), com adaptações. Após 72 h, foram retiradas amostras para determinação da concentração de SPE.

2.2.2.3 Estresse ácido

Em 24 h ou 48 h após o início dos cultivos, foram adicionados 0,3 mL de ácido acético para obter pH 3 e 0,15 mL para pH 5, baseado em Shehni et al. (2011), com adaptações. Após 72 h de cultivo, amostras foram retiradas para a determinação da concentração de SPE.

2.2.3 Determinação de SPE e Biomassa

A recuperação do SPE do meio de cultivo foi realizada através da centrifugação (Eppendorf modelo 5804-R, Alemanha) a $13.000 \times g$ por 30 min a 4°C para separar a biomassa microbiana do sobrenadante. A fim de facilitar a separação, nos tubos foram adicionados o meio de cultivo e a mesma quantidade de uma solução de NaCl 0,89% (ALVES-GAUTÉRIO; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2015). O sobrenadante foi reservado para a precipitação das SPE pela adição de álcool etílico 96% (1:3 v/v). Esta solução ficou em repouso por 24 h a $\pm 8^\circ\text{C}$ (YANG et al., 2018, com modificações).

Posteriormente, com auxílio de uma espátula, as SPE precipitadas foram transferidas para placas de Petri, previamente pesadas, secando em estufa a 50°C por 24 h, sendo então pesadas. As SPE obtidas foram maceradas e armazenadas em dessecador com umidade controlada com brometo de cálcio.

A biomassa da solução foi monitorada nos tempos de 0, 24, 48 e 72 h (em triplicata) por absorvância em espectrofotômetro (Biospectro SP-220, China) a 600 nm, sendo expressa em massa seca (g/L), obtida a partir da curva padrão previamente determinada (Apêndice 1) (TRINDADE et al., 2017).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 1 apresenta os dados relativos aos estresses ácido e alcalino. Pode-se observar que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) para os diferentes pH, em relação ao controle, quando a adição de ácido ou álcali ocorreu em 24 h de cultivo. Em todos os pH testados houve uma redução da concentração de SPE em relação ao controle (sem estresse), com menores valores para os pH 3 e 5, que não diferiram entre si ($p > 0,05$). Já em relação à biomassa (Tabela 2), observa-se redução da produção de biomassa em 72 h de cultivo quando comparado ao controle, com exceção do pH 9, que foi estatisticamente igual ($p > 0,05$), indicando o efeito negativo das condições de estresse testadas sobre o crescimento celular. Por outro lado, conforme Figura 1A, é possível observar que, após a adição de ácido ou álcali, houve uma tendência à desaceleração do crescimento celular, o que não foi observado no controle, em que

houve um incremento de biomassa após 24 h de cultivo, o que pode ter contribuído para a redução da produção de SPE.

Com relação à adição em 48 h (Tabela 1), comportamento similar foi observado em relação à produção de SPE, com diminuição da concentração em relação ao controle, com exceção do pH 9, cuja produção foi estatisticamente igual ($p > 0,05$) ao controle. Da mesma forma, a biomassa em 72 h de cultivo foi estatisticamente diferente ao comparar-se com o controle ($p < 0,05$) para todos os pH testados (Tabela 2), sendo corroborado pelo comportamento observado na Figura 1B, com uma tendência de redução da biomassa nos pH mais extremos (3 e 11) a partir de 48 h. Luviemo et al. (2016) observaram diferenças estruturais após o estresse alcalino durante o cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* 280-95 para produção de xantana, incluindo um citoplasma mais vacuolizado e descontinuidades na membrana celular, indicando lise celular.

Tabela 1- Estresses ácido e alcalino na produção de SPE por *Ensifer meliloti* SEMIA 135 em 72 h de cultivo.

pH	Tempo de Adição da Solução Ácida/Alcalina	
	24 h	48 h
Controle*	1,02±0,04 ^{a,A}	1,02±0,04 ^{a,A}
3	0,24±0,04 ^{c,B}	0,55±0,08 ^{c,A}
5	0,26±0,04 ^{c,B}	0,63±0,15 ^{bc,A}
9	0,64±0,02 ^{b,B}	0,95±0,04 ^{ab,A}
11	0,61±0,12 ^{b,A}	0,66±0,19 ^{bc,A}

* Sem adição de solução ácida ou alcalina.

Valores médios ± desvio padrão (n=3).

Letras minúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa nas concentrações de SPE a 95% de confiança (teste Tukey) para os diferentes pH; letras maiúsculas iguais na mesma linha representam que não há diferença significativa entre as concentrações de SPE em diferentes tempos de adição a 95% de confiança (teste T).

Para as condições ótimas de crescimento, os organismos unicelulares precisam de um ambiente intracelular específico e balanceado. Diferentes condições no ambiente externo podem resultar em uma variedade de perturbações que podem reduzir a atividade enzimática, interromper o fluxo metabólico, danificar as estruturas celulares e alterar os gradientes

químicos, levando a célula a uma condição de instabilidade. Entretanto, as células são capazes de manter a homeostase mesmo diante de mudanças no ambiente externo (GASCH et al., 2000).

Já comparando cada condição de estresse (pH) nos diferentes tempos de adição da solução ácida ou alcalina (Tabela 1), nota-se uma tendência de uma maior produção ($p < 0,05$) com adição em 48 h do que em 24 h (pH 3, 5 e 9), mesmo que inferiores ao controle. A exceção foi o pH 11, em que os valores obtidos de SPE foram estatisticamente iguais ($p > 0,05$) com adição em 24 h e 48 h. Em relação à biomassa, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação ao tempo de adição da solução ácida ou alcalina para todos os pH testados (Tabela 2).

Tabela 2 - Estresses ácido e alcalino na produção de biomassa por *Ensifer meliloti* SEMIA 135 em 72 h de cultivo

pH	Tempo de Adição da Solução Ácida/Alcalina	
	24 h	48 h
Controle*	1,25±0,03 ^{a,A}	1,25±0,03 ^{a,A}
3	0,75±0,02 ^{d,A}	0,71±0,08 ^{c,A}
5	0,98±0,07 ^{bc,A}	0,85±0,01 ^{bc,A}
9	1,13±0,04 ^{ab,A}	1,00±0,17 ^{b,A}
11	0,86±0,15 ^{cd,A}	0,65±0,01 ^{c,A}

* Sem adição de solução ácida ou alcalina.

Valores médios ± desvio padrão (n=3).

Letras minúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa nas concentrações de biomassa a 95% de confiança (teste Tukey) para os diferentes pH; letras maiúsculas iguais na mesma linha representam que não há diferença significativa entre as concentrações de biomassa em diferentes tempos de adição a 95% de confiança (teste T).

A Tabela 3 apresenta os dados relativos à produção de SPE por *Ensifer meliloti* SEMIA 135 para o estresse salino. Pode se observar que, quando a solução salina foi adicionada em 24 h de cultivo, houve uma tendência de redução da produção de SPE com as maiores concentrações de sal testadas (0,6 a 1,0 M) ao comparar-se com o controle ($p < 0,05$), enquanto apenas na menor concentração (0,2 M) houve um incremento na produção ($p < 0,05$). Por outro lado, com a adição em 48 h, aumentos expressivos foram observados para as concentrações de 0,2 M e 0,6 M, diferindo entre si e em relação ao controle ($p < 0,05$), obtendo-se o maior valor (2,36 g/L) para a concentração de 0,6 M, o que representa um acréscimo de cerca de 130% na

produção de SPE em relação ao controle (1,02 g/L). Já comparando-se os diferentes tempos de adição da solução salina para cada concentração testada, a adição em 48 h foi estatisticamente diferente ao comparar-se com 24 h ($p < 0,05$), com exceção da concentração de 0,4 M. De acordo com Ozturk e Aslim (2010), a produção de exopolissacarídeos microbianos é considerada uma estratégia metabólica para a sobrevivência e crescimento sob condições ambientais desfavoráveis, atuando como uma barreira difusional entre a parede celular e o ambiente extremo.

Em relação à biomassa obtida em 72 h de cultivo sob estresse salino, em todas as concentrações salinas testadas houve decréscimo da concentração comparado ao controle ($p < 0,05$), tanto para a adição em 24 h e 48 h (Tabela 4). Por outro lado, comparando-se os diferentes tempos de adição da solução salina para cada concentração testada, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre 24 h e 48 h em todas as concentrações salinas testadas, com maiores valores de biomassa em 48 h para as concentrações de 0,8 e 1,0 M; e em 24 h para 0,2 a 0,6 M (Tabela 4). Esses comportamentos também podem ser observados nas Figuras 2A e 2B.

Tabela 3 - Estresse salino na produção de SPE por *Ensifer meliloti* SEMIA 135 em 72h de cultivo

Concentração (M)	Tempo de Adição da Solução Salina	
	24 h	48 h
Controle*	1,02±0,04 ^{b,A}	1,02±0,04 ^{cd,A}
0,2	1,40±0,05 ^{a,B}	1,72±0,12 ^{b,A}
0,4	0,91±0,12 ^{b,A}	1,22±0,10 ^{c,A}
0,6	0,56±0,08 ^{c,B}	2,36±0,20 ^{a,A}
0,8	0,08±0,02 ^{d,B}	1,00±0,08 ^{cd,A}
1,0	0,06±0,05 ^{d,B}	0,84±0,09 ^{d,A}

* Sem adição de solução salina.

Valores médios ± desvio padrão (n=3).

Letras minúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa nas concentrações de SPE a 95% de confiança (teste Tukey) para as diferentes concentrações salinas; letras maiúsculas iguais na mesma linha representam que não há diferença significativa entre as concentrações de SPE em diferentes tempos de adição a 95% de confiança (teste T).

Tabela 4- Estresse salino na produção de biomassa por *Ensifer meliloti* SEMIA 135 em 72 h de cultivo

Concentração (M)	Tempo de Adição da Solução Salina	
	24 h	48 h
Controle*	1,25±0,03 ^{a,A}	1,25±0,03 ^{a,A}
0,2	0,74±0,02 ^{bc,A}	0,51±0,03 ^{d,B}
0,4	0,89±0,11 ^{b,A}	0,62±0,03 ^{c,B}
0,6	0,76±0,06 ^{bc,A}	0,54±0,07 ^{cd,B}
0,8	0,72±0,07 ^{c,B}	0,88±0,02 ^{b,A}
1,0	0,63±0,02 ^{c,B}	0,78±0,01 ^{b,A}

* Sem adição de solução salina.

Valores médios ± desvio padrão (n=3).

Letras minúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa nas concentrações de SPE a 95% de confiança (teste Tukey) para as diferentes concentrações salinas; letras maiúsculas iguais na mesma linha representam que não há diferença significativa entre as concentrações de SPE em diferentes tempos de adição a 95% de confiança (teste T).

Luvielmo et al. (2016) demonstraram que 9,4 g/L de goma xantana foram obtidos após 72 h de cultivo, enquanto 11,8 g/L de goma xantana foram obtidos após 1 h de estresse alcalino, utilizando hidróxido de sódio 10 M até atingir um pH de 12, o que representa um aumento de 25,7% na produção. Depois de 24 h de estresse alcalino, a quantidade de biopolímero aumentou para 16,5 g/L, representando um aumento de 74,8% na produção de xantana em relação ao processo convencional sem estresse alcalino. De acordo com os mesmos autores, os resultados encontrados indicam que o estresse alcalino pode induzir as células a produzirem uma quantidade maior de xantana como um mecanismo de proteção contra condições adversas do meio.

Ozturk e Aslim (2010) analisaram o efeito da concentração de cloreto de sódio (0,2 e 0,4 M) na produção de SPE por três linhagens de cianobactérias (*Synechocystis* sp. BASO444, *Synechocystis* sp. BASO511 e *Synechocystis* sp. BASO507). Observaram aumento significativo e regular na produção de SPE por *Synechocystis* sp. BASO444, de 500 mg/L, sem NaCl, para 650 mg/L com 0,4 M de NaCl. Condições de alta salinidade causam efeitos de estresse no micro-organismo que, como resposta, elevam a produção de SPE, com o intuito de aliviar os efeitos do estresse sobre o crescimento e atividade microbiana (MOSHABAKI ISFAHANI et al., 2018).

Figura 1 - Biomassa ao longo do cultivo de *Ensifer meliloti* SEMIA 135 submetida a diferentes pH. A, estresse ácido e alcalino em 24 h de cultivo; B, estresse ácido e alcalino em 48 h de cultivo.

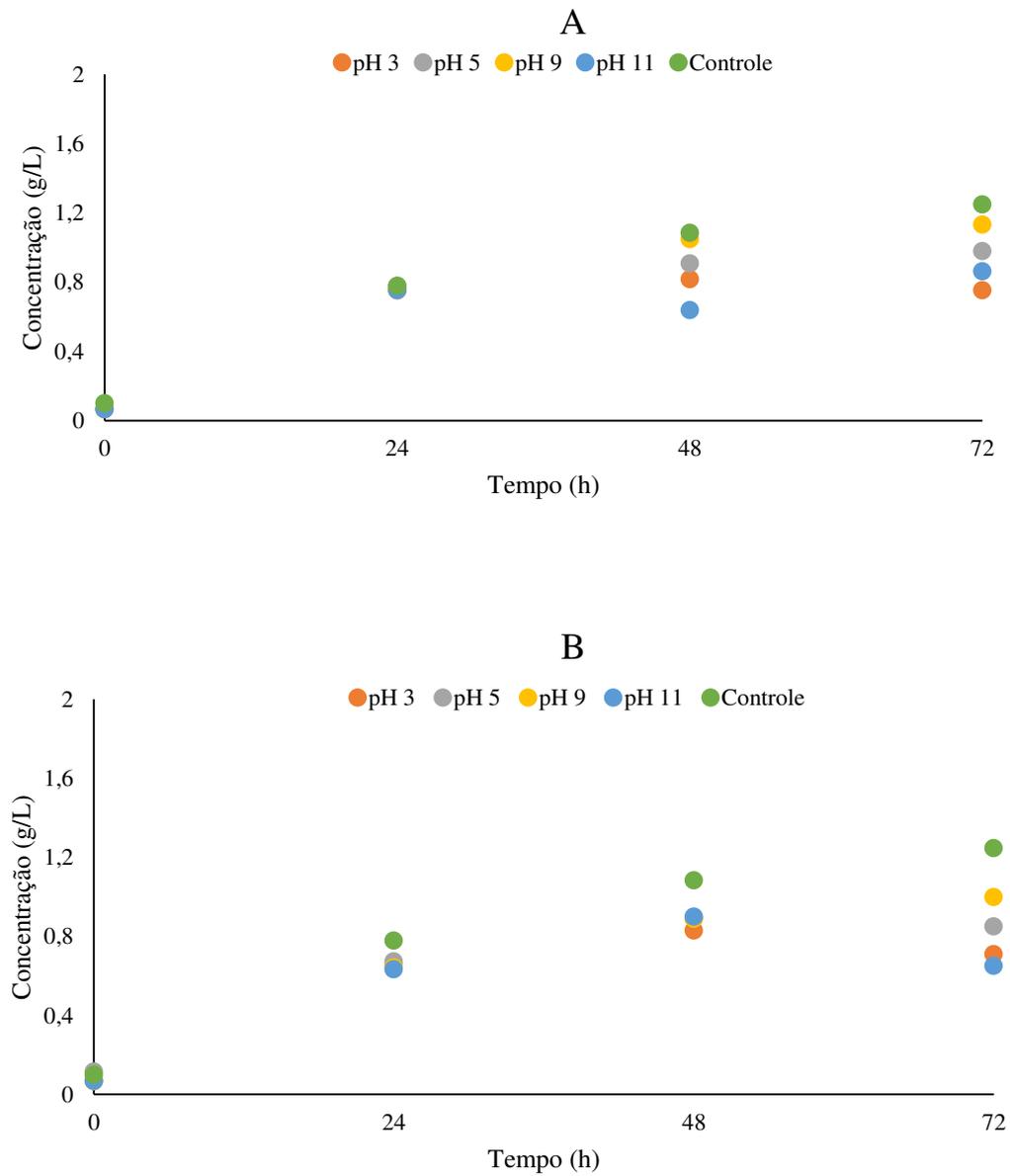
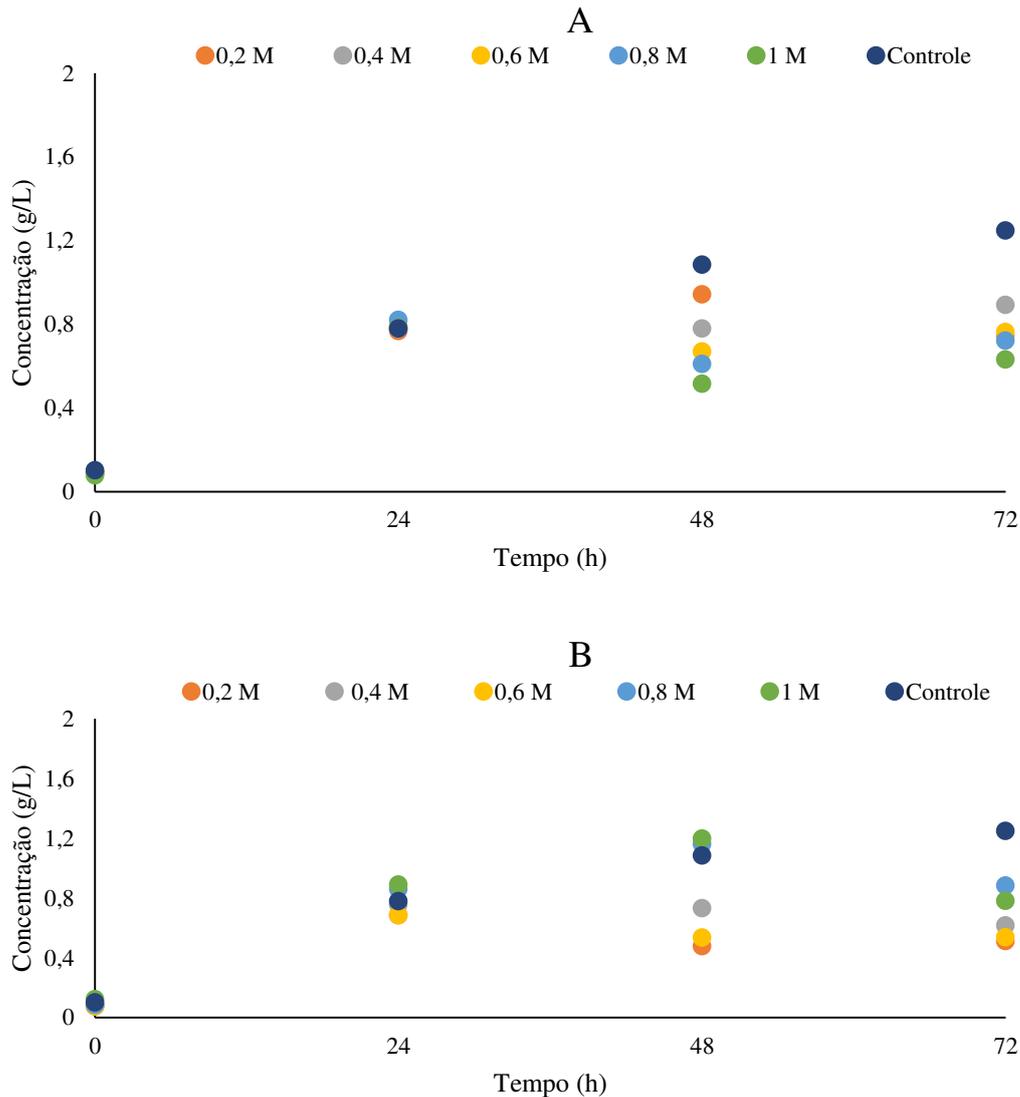


Figura 2 - Biomassa ao longo do cultivo de *Ensifer meliloti* SEMIA 135 submetida a diferentes concentrações salinas. A, estresse salino em 24 h de cultivo; B, estresse salino em 48 h de cultivo.



4. CONCLUSÃO

Neste trabalho, diferentes condições de estresse (ácido, alcalino e salino) foram avaliadas, a fim de verificar seus efeitos sobre a produção de SPE e biomassa de *Ensifer meliloti* SEMIA 135. Observou-se que as condições de estresse, independente do tempo de aplicação das mesmas (24 h ou 48 h de cultivo), teve efeito negativo predominante sobre o crescimento

celular, indicando os efeitos inibitórios das mesmas. Por outro lado, a produção de SPE após a adição de solução salina em 48 h de cultivo, correspondendo a uma concentração de 0,6 M, foi incrementada em cerca de 130% quando comparado ao controle (sem estresse), indicando nesta condição uma resposta do micro-organismo a uma condição ambiental desfavorável.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES-GAUTÉRIO, F. G.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Investigation by experimental design of agitation and aeration influence on the xanthan production process by *Xanthomonas arboricola* pv pruni. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 9, p. 1821–1835, 2015.

CRUZ, S. K. **Estudo das condições de processo na produção de polissacarídeos por *Mesorhizobium* sp. a partir de permeado de soro de queijo**. 2021. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Química de Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande – RS, 2021.

GASCH, A. P.; SPELLMAN, P. T.; KAO, C. M.; CAMEL-HAREL, O.; EISEN, M. B.; STORZ, G.; BOLSTEIN, D.; BROWN, D. O. Genomic expression programs in response of yeast to environmental changes. **Molecular and Cell Biology**, v. 11, p. 4241-4257, 2000.

GONZÁLEZ, C. H. **Produção de exopolissacarídeos por rizóbios em meios de cultivo com coprodutos lácteos**. 2019. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química de Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande – RS, 2019.

JAHN, A.; NIELSEN, P. H. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin. **Water Science Technology**, v. 32, p. 157-164, 1995.

LUVIELMO, M. M.; BORGES, C. D.; TOYAMA, D. O.; VENDRUSCOLO, C. T.; SCAMPARINI, A. R. P. Structure of xanthan gum and cell ultrastructure at different times of alkali stress. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 102-109, 2016.

MOSHABAKI ISFAHANI, F.; TAHMOURESPOUR, A.; HOODAJI, M.; ATAABADI, M.; MOHAMMADI, A. Characterizing the new bacterial isolates of high yielding exopolysaccharides under hypersaline conditions. **Journal of Cleaner Production**, v. 185, p. 922–928, 2018.

OLIVEIRA, J. M.; AMARAL, S. A.; BURKERT, C. A. V. Rheological, textural and emulsifying properties of an exopolysaccharide produced by *Mesorhizobium loti* grown on a crude glycerol-based medium. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2180-2187, 2018.

OLIVEIRA, J. M.; MICHELON, M.; BURKERT, C. A.V. Biotechnological potential of soybean molasses to produce extracellular polymers by diazotrophic bacteria. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, 101608, 2020.

- OZTURK, S.; ASLIM, B. Modification of exopolysaccharide composition and production by three cyanobacterial isolates under salt stress. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 17, p. 595-602, 2010.
- PESSÔA, M. G.; VESPERMANN, K. A. C.; PAULINO, B. N.; BARCELOS, M. C. S.; PASTORE, G. M.; MOLINA, G. Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 319-339, 2019.
- PHILLIPS, K.; HAMID, N.; SILCOCK, P.; DELAHUNTY, C.; BARKER, M.; BREMER, P. Effect of season on the sensory quality of sea urchin (*Evechinus chloroticus*) roe. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 20–30, 2010.
- ROESLER, B. C. S. **Exopolissacarídeos de *Mesorhizoibium* sp. Semia 816 partir de monossacarídeos constituintes da biomassa lignocelulósica e hidrolisado de casca de soja**. 2021. 139 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande - RS, 2021.
- SANTOS, J. T. **Produção de exopolissacarídeos por *Ensifer meliloti* em frascos agitados e biorreator de bancada: condições de processo e caracterização parcial do biopolímero**. 2022. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Química de Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande – RS, 2022.
- SENTHIL KUMAR, M.; SWARNALAKSHMI, K.; ANNAPURNA, K. Exopolysaccharide from rhizobia: production and role in symbiosis. In: HANSEN, A. P.; CHOUDHARY, D. K.; AGRAWAL, P. K.; VARMA, A. (Eds.). **Rhizobium biology and biotechnology**. [s. l.]: Springer International Publishing, 2017. p. 257–292.
- SHEHNI, S. A.; SOUDI, M. R.; HOSSEINKHANI, S.; BEHZADIPOUR, N. Improvement of xanthan gum production in batch culture using stepwise acetic acid stress. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 83, p. 19425-19428, 2011.
- STAUDT, A. K.; WOLFE, L. G.; SHROUT, J. D. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*. **Archives of Microbiology**, v. 194, p. 197–206, 2012.
- TRINDADE, R. A.; MUNHOZ, A. P.; BURKERT, C. A. V. Impact of a carbon source and stress conditions on some properties of xanthan gum produced by *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 167-172, 2018.
- TRINDADE, R. A.; MUNHOZ, A. P.; GAUTÉRIO, F. A. G.; BURKERT, C. A. V. Padronização do inóculo de diferentes espécies de *Lactobacillus*. **Vetor**, v. 27, n. 2, p. 28-37, 2017.
- WIMPENNEY, J. W. T.; PETERS, A.; SCOURFIELD, M. A. The physiology and biochemistry of biofilm. In: CHARACKLIS, W. G.; WILDERER, P. A. (Eds.). **Structure and function of biofilms**. John Wiley and Sons, Inc., 1993. p. 111-127.
- YANG, H.; WANG, Z.; LIN, M.; YANG, S.-T. Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici*: fermentation kinetics and economic analysis. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 1-9, 2018.

CAPÍTULO IV

Avaliação da Formação de Filmes Biodegradáveis a Partir de Substâncias Poliméricas
Extracelulares Produzidas por *Ensifer meliloti* SEMIA 135

RESUMO

Nesta pesquisa, um novo tipo de filme baseado em substâncias poliméricas extracelulares (SPE) produzidas por *Ensifer meliloti* SEMIA 135 foi elaborado pela técnica de *casting* e caracterizado quanto às suas propriedades mecânicas, óticas, de barreira e estruturais. Entre as formulações testadas, a com a adição de 20% de plastificante (glicerol) em relação à massa de SPE foi escolhida, apresentando uma superfície visualmente homogênea e contínua. A espessura do filme foi de 0,046 mm. A permeabilidade ao vapor de água ($7,85 \text{ g.mm/kPa.d.m}^2$) indicou que o filme não é adequado para uso como barreira à umidade, confirmando seu caráter hidrofílico. Em relação às propriedades mecânicas, resistência à tração e capacidade de alongação (52,90 MPa e 6,73%, respectivamente), o filme apresentou valores superiores a alguns filmes obtidos com polissacarídeos microbianos. Quanto à cor, o filme apresentou uma alta luminosidade ($L^* = 93,87$). Desta forma, as SPE produzidas por *Ensifer meliloti* SEMIA 135 mostram-se promissoras para a elaboração de filmes biodegradáveis com potencial comercial.

Palavras-chaves: Filmes biopoliméricos, bactérias diazotróficas, exopolissacarídeos.

1. INTRODUÇÃO

Durante muito tempo, os polímeros tradicionais forneceram a maior parte da matéria-prima para as embalagens comuns, pois apresentam diversas características desejadas, tais como maciez, leveza e transparência (SIRACUSA et al., 2008). No entanto, a eliminação dos resíduos desses polímeros é um grave problema ambiental que enfrentamos, resultando em impacto ambiental. Conseqüentemente, essas questões levam à ameaça crescente de aquecimento global resultante das emissões de dióxido de carbono devido à queima de polímeros convencionais não biodegradáveis (SAMIR et al., 2022).

Além de outras estratégias para reduzir os impactos, como reciclagem e reutilização, a alternativa de utilizar materiais que são ecologicamente corretos, biodegradáveis e de origem natural para embalagens se tornou indispensável. Logo, polímeros biodegradáveis e/ou de base biológica como novos materiais de embalagem estão sendo amplamente explorados neste contexto (LJUNGBERG, 2007).

Alguns biopolímeros são comumente extraídos para produção de filmes biodegradáveis, conhecidos por suas propriedades de formação de filme, tais como pectina (ALVES; COSTA; COELHO, 2010), quitosana (MONTE, 2016; GRANDINI, 2022), entre outros. Pensando em produção industrial, os biopolímeros microbianos possuem uma grande vantagem quanto à disponibilidade e à qualidade e não dependem de algumas variáveis, tal como condições climáticas ou poluição marinha (GONGI et al., 2022).

Os polímeros sintetizados por micro-organismos têm várias vantagens em comparação com os polissacarídeos acima mencionados, principalmente por sua produção não ser afetada pela sazonalidade (VIJAYENDRA; SHAMALA, 2014). Logo, o uso de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) microbianas na produção de filmes biodegradáveis representa uma alternativa de material para elaboração de embalagens biodegradáveis.

Os rizóbios são bactérias estudadas para produção de biopolímeros e são classificados como bactérias diazotróficas, micro-organismos que constituem associações simbióticas com leguminosas, possibilitando a fixação biológica de nitrogênio atmosférico ao reduzi-lo à amônia (OLIVEIRA; AMARAL; BURKERT, 2018; OLIVEIRA, MICHELON; BURKERT, 2020; ROESLER et al., 2021). Os rizóbios são capazes de produzir expressivas quantidades de EPS com alta viscosidade (CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014) e seu uso não reporta nenhuma condição de insegurança sobre a saúde humana (GARCÍA-FRAILLE et al., 2012). Estes biopolímeros são formados pela condensação de monossacarídeos e unidos através de

ligações glicosídicas, resultando em polímeros de alta massa molar (DUTA; FRANÇA; LOPES, 2006).

Neste contexto, são exemplos de polissacarídeos microbianos testados na elaboração de filmes biodegradáveis: ácido hialurônico (SUN; ZHITOMIRSKY, 2009), gelana (XU et al., 2007), Kefiran (PIERMARIA et al., 2009) e SPE produzidas a partir da microalga *Graesiella* sp. (GONGI et al., 2022). No entanto, não são mencionados estudos abordando o uso de SPE produzidas por *Ensifer meliloti* na elaboração de filmes biodegradáveis.

Conforme Primo et al. (2020), *Ensifer meliloti* é uma rizobactéria Gram-negativa que fixa nitrogênio atmosférico e produz principalmente dois EPS diferentes, chamados de EPS I (succinoglicana) e EPS II (galactoglicana), que possuem diferentes funções no processo simbiótico e apresentam uma complexa composição, o que possibilita uma gama de estudos e aplicações.

Para as análises de elaboração dos filmes, foi reproduzido o método de *casting*, geralmente utilizado na produção de filmes biodegradáveis, que se baseia na solubilização do biopolímero em um solvente (água, etanol ou ácidos orgânicos), juntamente com aditivos (plastificantes) sob determinado tempo e temperatura. Após, a solução filmogênica passa por um processo de secagem para remoção do solvente (ROMANI; PRENTICE-HERNÁNDEZ; MARTINS, 2017).

Diante do exposto, o estudo teve como objetivo avaliar a potencialidade de SPE produzidas por *Ensifer meliloti* SEMIA 135 na formação de um filme biodegradável, sendo este caracterizado em termos de suas propriedades ópticas, mecânicas, de barreira e estruturais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram feitos no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Escola de Química de Alimentos (EQA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). A elaboração dos filmes contou com a colaboração do Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da EQA/FURG.

2.1 MATERIAL

2.1.1 Micro-organismo

A bactéria *Ensifer meliloti* SEMIA 135 utilizada no presente estudo foi fornecida pelo Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária - DDPa da Secretaria de Agricultura, Pecuária e Irrigação - SEAP (Porto Alegre, RS, Brasil).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Produção das Substâncias Poliméricas Extracelulares (SPE)

O meio de cultivo utilizado foi o caldo YMA (*Yeast Mannitol*) ajustado em pH 7, composto por (g/L): manitol (10); K₂HPO₄ (0,1); KH₂PO₄ (0,4); MgSO₄.7H₂O (0,2); NaCl (0,1); extrato de levedura (0,4); MnCl₂.7H₂O (0,12); CaCl₂.2H₂O (0,15). Os cultivos foram realizados em frascos agitados a 30 °C e 200 rpm por 72 h, sendo adicionados com 10% (v/v) de inóculo.

A recuperação das SPE do meio de cultivo foi realizada através da centrifugação (Eppendorf modelo 5804-R, Alemanha) a 13000 × g por 30 min a 4 °C para remoção de células, sendo o sobrenadante reservado para a precipitação do SPE pela adição de álcool etílico 96% (1:3 v/v), seguido de repouso sob refrigeração (OLIVEIRA; MICHELON; BURKERT, 2020). Por fim, a concentração de SPE foi determinada por gravimetria, os precipitados foram transferidos para uma placa de Petri, previamente pesada, secando a 50 °C por 24 h, até massa constante. Posteriormente, as SPE obtidas foram maceradas e armazenadas em dessecador.

2.2.2 Parâmetros do Cultivo

2.2.2.1 Biomassa e pH

A biomassa da solução foi determinada por absorvância em espectrofotômetro (Bioespectro SP-220, China) a 600 nm, sendo expressa em massa seca (g/L), obtida a partir da curva de calibração (TRINDADE et al., 2017). O pH do sobrenadante foi determinado através de um medidor de pH (Marte MB-10, Brasil).

2.2.2.2 Produtividades

A produtividade de SPE (Prod_{SPE}, em g/L.h) foi definida pela Equação 1.

$$\text{Prod}_{\text{SPE}} = \frac{\text{SPE} - \text{SPE}_0}{t} \quad (1)$$

Onde:

SPE = Concentração de SPE (g/L) atingida em 72 h;

SPE₀ = Concentração de SPE inicial (g/L);

t = tempo (h) de cultivo (72 h).

A produtividade de biomassa (Prod_B, em g/L.h) foi definida pela Equação 2.

$$\text{Prod}_B = \frac{X - X_0}{t} \quad (2)$$

Onde:

X = Concentração de biomassa (g/L) atingida em 72 h;

X₀ = Concentração de biomassa inicial (g/L);

t = tempo (h) de cultivo (72 h).

2.2.2.3 Fator de conversão de biomassa em produto

O fator de conversão de biomassa em produto (Y_{P/X}) foi calculado de acordo com a Equação 3 (HISS, 2001):

$$Y_{P/X} = \frac{P - P_0}{X - X_0} \quad (3)$$

Onde:

X: Concentração de biomassa (g/L) ao final do cultivo (72 h);

X₀: Concentração de biomassa (g/L) inicial;

P: Concentração de SPE (g/L) ao final do cultivo (72 h);

P₀: Concentração de SPE (g/L) inicial.

2.2.3 Análise Elementar CHN

As amostras de SPE foram analisadas em analisador elementar (Perkin Elmer 2400 series II, EUA), através da combustão das amostras em atmosfera de oxigênio puro, sendo os gases de saída quantificados em detector TCD (detector de condutividade térmica).

2.2.4 Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR)

Os grupos funcionais presentes nas SPE foram identificados a partir da utilização de um espectrômetro de infravermelho (Shimadzu IR Prestige-21, Japão). As amostras foram analisadas sob a forma de pastilhas de KBr (200 mg de KBr e 2 mg de SPE). Os espectros foram obtidos com 70 *scans* e resolução de 2,0 cm^{-1} na faixa de 145-4000 cm^{-1} .

2.2.5 Formação do Filme Biopolimérico

A elaboração dos filmes foi realizada através do método de *casting*, adaptado conforme metodologia utilizada por Gongi et al. (2022). De acordo com os testes preliminares, utilizou-se 1 g de SPE e 20% de glicerol (percentual em massa de glicerol em relação à massa de SPE), adicionados em água destilada (100 mL). A mistura foi solubilizada com auxílio de agitador mecânico (Fisatom 712, Brasil) durante 40 min a 60 °C e 1000 rpm. Para retirada de possíveis bolhas na solução, foi utilizado um disruptor de ponteira ultrassônica (Eco-Sonics, Brasil), por alguns instantes.

Posteriormente, 25 g desta solução filmogênica foram vertidas em placa de Petri de 9 cm, secando-se a 40 °C em estufa ventilada (Quimis Q316M, Brasil) até massa constante. Os filmes após a secagem foram colocados em dessecadores por 24 h em ambiente com umidade relativa de 50%, utilizando brometo de sódio, para posteriores análises de caracterização.

2.2.6 Caracterização do Filme Biopolimérico

2.2.6.1 Testes preliminares

Foram realizados testes preliminares para definir a formulação para a produção dos filmes, variando a massa utilizada das SPE, a proporção de glicerol e a quantidade de solução filmogênica vertida nas placas de Petri.

2.2.6.2 Solubilidade em água

Os filmes foram submetidos à análise de solubilidade em água realizada de acordo com o método proposto por Gontard et al. (1994). Os filmes foram cortados em quadrados de 1 cm² e levados à estufa (DELEO, A15E, Brasil) a 105 °C por 24 h para determinação da matéria seca inicial. Após, a amostra seca foi imersa em 50 mL de água destilada e este sistema foi mantido sob as condições de 25 °C, 175 rpm por 24 h. Então a amostra foi removida e seca a 105 °C para determinação da massa seca. Para o cálculo dos valores de solubilidade S (%) foi utilizada a Equação 4, onde m_i corresponde à massa seca inicial e m_f corresponde à massa seca final (g).

$$S = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (4)$$

2.2.6.3 Permeabilidade ao vapor d'água (PVA)

A permeabilidade ao vapor d'água (PVA) dos filmes foi determinada gravimetricamente segundo o método E96-00 da ASTM (ASTM, 2000), sendo calculada conforme Equação 5. O método consiste na pesagem de uma cápsula fechada, contendo o filme na superfície e a substância dessecante (sílica) no interior. A cápsula foi colocada em ambiente com umidade controlada, utilizando solução de brometo de sódio para manter o ambiente a 75% de umidade relativa.

$$PVA = \frac{M.E}{A.t.\Delta P} \quad (5)$$

Onde:

M: Ganho de massa da sílica (g);

E: Espessura do filme (mm);

A: Área de permeação (m²);

t: Tempo (dias);

ΔP : diferencial de pressão de vapor (kPa).

2.2.6.4 Propriedades ópticas

Os parâmetros de cor foram determinados utilizando um colorímetro (Minolta CR-300, Minolta Corporation, Estados Unidos), através da medida do diagrama tridimensional de cor ($L^*a^*b^*$). Os parâmetros L^* (luminosidade), a^* (verde-vermelho) e b^* (amarelo-azul) foram determinados. A diferença total de cor (ΔE) dos filmes foi determinada conforme a Equação 6.

$$\Delta E = \sqrt{(L_0 - L)^2 + (a_0 - a)^2 + (b_0 - b)^2} \quad (6)$$

Sendo L_0 , a_0 e b_0 os valores de cor do padrão; L , a e b os valores de cor dos filmes. Para determinação da opacidade dos filmes foi calculada a relação entre a opacidade do filme sobreposto ao padrão preto (Y_{preto}) e ao padrão branco (Y_{branco}), segundo a Equação 7.

$$\text{Opacidade (\%)} = \frac{Y_{\text{preto}}}{Y_{\text{branco}}} \times 100 \quad (7)$$

2.2.6.5 Propriedades mecânicas

A espessura dos filmes foi mensurada com um micrômetro (Insize IP54, precisão 0,001 mm, Brasil) em dez posições. As demais propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas em texturômetro (*Stable Micro Systems*, TA.XTplus, Reino Unido), empregando-se a metodologia ASTM D882- 02 (ASTM, 2002). As propriedades determinadas foram resistência à tração (MPa) e capacidade de alongação (%), utilizando-se distância inicial e velocidade do *probe* de 50 mm e 1 mm/s, respectivamente. Os corpos de prova foram cortados em tiras de 85 mm de comprimento e 25 mm de largura e posteriormente acopladas verticalmente a um sistema de garras do equipamento. Para a determinação dos valores de resistência à tração (MPa) foi utilizada a Equação 8, em que F é a força no momento da ruptura do filme (N) e A é a área da secção transversal do filme (m^2).

$$RT = \frac{F}{A} \quad (8)$$

A capacidade de alongação ($E\%$) foi calculada utilizando a Equação 9, em que df (mm) corresponde à distância final de alongamento do filme e di (mm) é a distância inicial entre as garras (50 mm).

$$E (\%) = \frac{df}{di} \times 100 \quad (9)$$

2.2.6.6 Propriedades microestruturais

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes foi realizada na Universidade Federal do Rio Grande, no Centro de Microscopia Eletrônica da Zona Sul (CEME-SUL), utilizando um microscópio eletrônico de varredura (JSM 6060, JEOL, Japão). As amostras foram fragmentadas por imersão em nitrogênio líquido e acopladas sobre *stubs* de alumínio e revestidas de camada de ouro antes de obtenção das imagens.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS SPE

A Tabela 1 mostra os principais parâmetros obtidos para o cultivo de *Ensifer meliloti* SEMIA 135.

Tabela 1- Parâmetros do cultivo* de *Ensifer meliloti* SEMIA 135

Parâmetro	X (g/L)	EPS (g/L)	pH	Prod _B (g/L.h)	Prod _{SPE} (g/L.h)	Y _{P/X} (g/g)
Valor	1,25±0,03	1,02±0,04	6,24±0,19	0,017±<0,001	0,014±0,001	0,86±0,07

* 72 h.

X, biomassa; Prod_B, produtividade em biomassa; Prod_{SPE}, produtividade em SPE, Y_{P/X}, fator de conversão de biomassa em produto.

Valor médio ± desvio padrão (n=3).

Oliveira, Michelon e Burkert (2020) realizaram estudos em relação aos parâmetros de cultivo de *Ensifer meliloti* SEMIA 135 e outros micro-organismos, comparando diferentes fontes de carbono. Para essa bactéria e utilizando manitol como fonte de carbono, os autores encontraram os seguintes valores: produção de biomassa de 1,69±0,14 g/L, produção de EPS de 3,50±0,13 g/L e fator de conversão de biomassa em produto de 3,46± 0,14 g/g. Observa-se que os valores de biomassa apresentaram mais semelhança ao presente estudo, no entanto,

quando comparados os valores de SPE, os referidos autores apresentaram valores maiores, entretanto obtidos em 96 h de cultivo.

A Tabela 2 mostra a composição das SPE obtidas no cultivo de *Ensifer meliloti* SEMIA 135 em termos de composição elementar. A composição em nitrogênio pode estar relacionada à presença de proteínas e/ou ácidos nucleicos, sendo que podem ser precipitados por solventes como o etanol. A composição química das SPE é muito heterogênea e complexa. No entanto, de um modo geral, são os polissacarídeos que predominam (WIMPENNEY; PETERS; SCOURFIELD, 1993), também podendo ser constituídos por proteínas, substâncias húmicas, ácidos nucleicos (JAHN; NIELSEN, 1995), glicoproteínas e fosfolipídios (PHILLIPS et al., 2010). É importante ainda ressaltar que as SPE utilizadas neste estudo, após precipitação, não foram submetidas a outras técnicas de purificação, tais como a diálise. Por outro lado, os resultados divergem daqueles obtidos por Santos (2022), que obteve 37,36% m/m de carbono, 1,81% m/m de nitrogênio e 6,81% m/ de hidrogênio para EPS de *Ensifer meliloti* SEMIA 135 cultivado em meio à base de melão de soja em biorreator de bancada.

Tabela 2 - Teores de C, N e H nas amostras de SPE produzidas por *Ensifer meliloti* SEMIA 135

Componente	Composição (% m/m)
Carbono	26,05±0,03
Nitrogênio	0,39±0,03
Hidrogênio	4,82±0,02

Valor médio ± desvio padrão (n=2).

A Figura 1 mostra o espectro de FT-IR obtido para amostra de SPE de *Ensifer meliloti* SEMIA 135 obtida no cultivo.

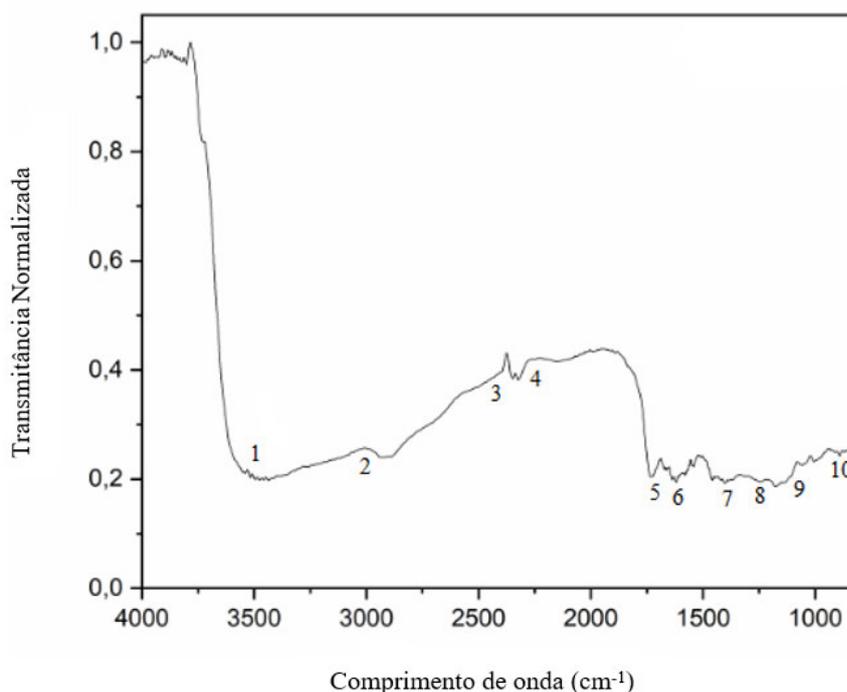
Conforme a Figura 1, as bandas detectadas entre 3417-3422 cm^{-1} (1) estão associadas a grupos hidroxila (OH) e à absorção de água, apresentando uma banda alongada, ampla e intensa (ANDHARE et al., 2017; CARRIÓN; DELGADO; MERCADE, 2015; OLIVEIRA; AMARAL; BURKERT, 2018).

O pico em 3365 cm^{-1} (1) e o formato da banda em 3390 cm^{-1} , com a presença de dois picos finos nesta região, indica a sobreposição dos alongamentos de O-H e N-H, onde a última pode ser referente à possível presença de proteínas (OSIRO; FRANCO; COLNAGO, 2011).

A banda 2 está relacionada a vibrações de estiramento C-H dos grupos CH_2 e CH_3 (ou grupos metil ou etil) e pode estar relacionada à presença de hexoses como glicose ou galactose

(CASTELLANE et al, 2015; ANDHARE et al., 2017; CARRIÓN; DELGADO; MERCADE, 2015). A faixa de absorção entre 2500 e 2000 cm^{-1} (banda 3) está relacionada as ligações C–H (ROESLER et al., 2021).

Figura 1 - Espectro de absorção no infravermelho para a amostra de EPS de *Ensifer meliloti* SEMIA 135



Já a vibração reportada perto de 1735 cm^{-1} (4) pode estar relacionada à vibração de estiramento C=O de ésteres relacionados a grupos acetil (ANDHARE et al., 2017), piruvato ou acetato (CASTELLANE et al., 2015). A banda em 1650 cm^{-1} (5) corresponde à presença de ácidos carboxílicos (CASTELLANE et al., 2015; ROESLER et al., 2021).

O pico de adsorção entre 1420-1653 cm^{-1} (6) é característico de estiramentos de carboxilatos ($-\text{COO}^-$) presentes em resíduos ácidos como succinato e acetato (ANDHARE et al., 2017; CASTELLANE et al., 2017; OLIVEIRA; AMARAL; BURKERT, 2018). O pico em 1350 cm^{-1} (7) está ligado à presença de íons carboxilato. Sinais entre 1251-1255 cm^{-1} (8) podem corresponder a grupos acetil (PRIYANKA et al., 2015).

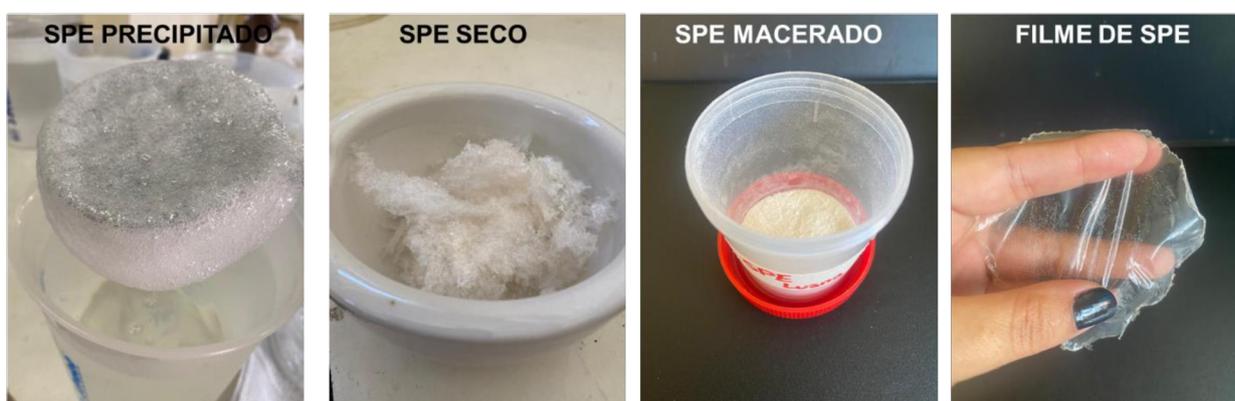
Os picos detectados entre 1035-1153 cm^{-1} (9) podem estar associados à presença de vibrações de estiramento C–O a grupos $\text{CH}_3\text{--C=O}$, bem como C–O e C–C de carboidratos (ANDHARE et al., 2017; CARRIÓN; DELGADO; MERCADE, 2015), assim como indicam a presença de ácidos urônicos (DEEPIKA et al., 2016). Os picos entre 983 e 1200 (10) podem estar relacionados à presença de monômeros como galactose e glicose. Já os picos inferiores a

800 (10) indicam a presença de ligações glicosídicas (CASTELLANE et al., 2015), com possível predominância de configurações do tipo β nas ligações glicosídicas (10) (OLIVEIRA; AMARAL; BURKERT, 2018; PRIYANKA et al., 2015).

3.2 FORMAÇÃO DO FILME BIOPOLÍMERO

A formação do filme de SPE a partir do método de *casting* foi conduzida conforme ilustrado na Figura 2, isto é, obtenção da SPE por precipitação a partir do cultivo microbiano, secagem em estufa a 40 °C, maceração da SPE e, por fim, os testes de formação de filmes.

Figura 2 - Etapas do processo da obtenção do filme de SPE.



3.2.1 Caracterização do Filme Biopolimérico

3.2.1.1 Testes preliminares

Através dos testes preliminares foi possível definir a formulação que mais se adequava à produção desse tipo de filme, bem como as quantidades de solução filmogênica vertidas nas placas que resultassem em uma superfície visualmente mais homogênea e contínua, formulações apresentadas na Tabela 3.

Sendo assim, a formulação com 20% de plastificante em relação à massa de SPE, ou seja, 1 g de biopolímero, com 0,20 g de glicerol diluídos em 100 mL de água destilada, vertendo sobre a placa 25 g de solução filmogênica, apresentou melhores características em relação às demais formulações, correspondendo à formulação E (Tabela 3), tais como melhor manuseabilidade, sem ruptura ao remover da placa e espessura suficiente. Nas demais formulações testadas foram observadas falhas, rachaduras, fragilidade e extremidades

quebradiças (Apêndice 2). Os filmes obtidos nos testes preliminares podem ser observados na Figura 3.

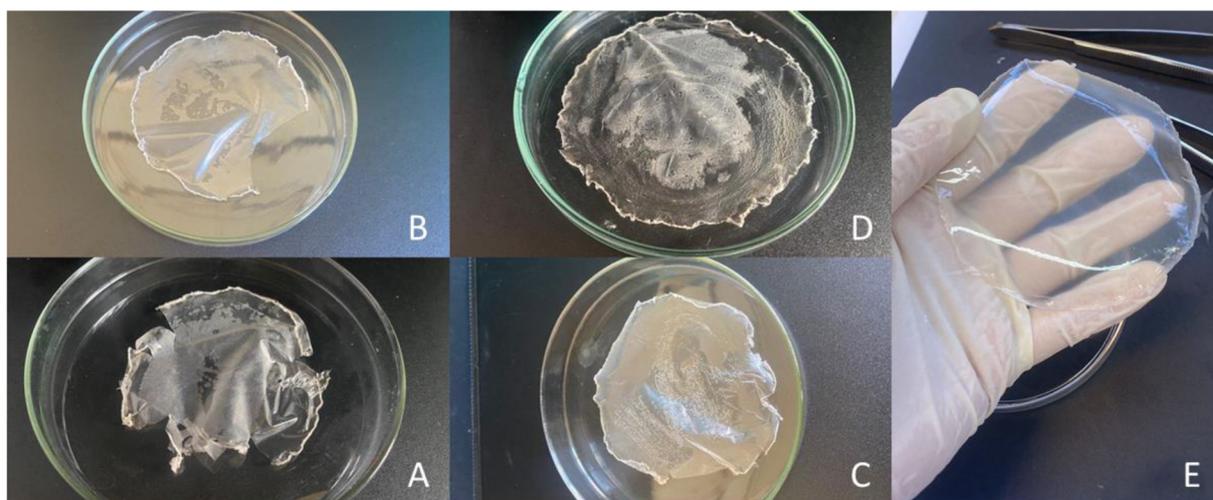
Tabela 3 – Formulações utilizadas nos testes preliminares para produção de filmes

Formulação	SPE (g)	Água (mL)	Glicerol (% m/m)*	Solução filmogênica (g)**
A	1,0	100	15	20
B	1,0	100	15	10
C	0,5	100	30	30
D	0,5	100	20	25
E	1,0	100	20	25

* Em relação à massa de SPE;

** Adicionada à cada placa.

Figura 3 - Diferentes formulações de filmes obtidos nos testes preliminares.



A, 1 g SPE, 100 mL água, 15% glicerol, 20 g solução filmogênica; B, 1 g SPE, 100 mL água, 15% glicerol, 10 g solução filmogênica; C, 0,5 g SPE, 100 mL água, 30% glicerol, 30 g solução filmogênica; D, 0,5 g SPE, 100 mL água, 20% glicerol, 25 g solução filmogênica; E, 1,0 g SPE, 100 mL água, 20% glicerol, 25 g solução filmogênica.

Na Tabela 4, estão apresentados os valores encontrados para as propriedades físicas, mecânicas e ópticas, que serão discutidas nos tópicos a seguir.

Tabela 4 - Propriedades físicas, mecânicas e ópticas obtidas do filme de SPE

Propriedades dos Filmes de SPE		Média ± Desvio Padrão
Físicas	Espessura (mm)	0,046 ± 0,01
	Permeabilidade ao vapor d'água (g.mm/ m ² .dia.kPa)	7,85 ± 0,29
	Solubilidade (%)	83,61 ± 2,67
Mecânicas	Tração (MPa)	52,90 ± 0,61
	Elongação (%)	6,73 ± 2,02
Óticas	L*	93,87 ± 0,72
	a*	-0,65 ± 0,29
	b*	8,30 ± 0,69
	ΔE	7,33 ± 0,84
	Opacidade (%)	14,36 ± 0,03

3.2.1.2 Propriedades físicas

A espessura do filme de SPE de *Ensifer meliloti* SEMIA 135 resultou em uma média de 0,046 mm (Tabela 4), com desvio baixo apresentando homogeneidade entre as espessuras do filme produzido. A espessura constitui um importante parâmetro de caracterização de filmes, uma vez que influencia outras propriedades, como ópticas, mecânicas, permeabilidade, morfologia e solubilidade. Ressaltando que a metodologia, a massa de solução, as condições de secagem (técnica de produção do filme) e características do polímero são de extrema relevância para comparações e que diferentes espessuras de filmes permitem aplicações distintas. Autores como Gongi et al. (2022) encontraram filmes de SPE produzidas através da microalga *Graesiella* sp., com 0,22 mm de espessura, valor dentro da faixa dos filmes comerciais, ou seja, menor que 0,3 mm (SKURTYYS et al., 2010). Logo, a espessura do filme em estudo mostra-se menor, no entanto, conforme Parreidt, Muller e Schmid (2018), filmes mais finos conferem flexibilidade, reduzem a fragilidade e melhoram a resistência ao impacto. Filmes de origem biológica apresentam espessuras em torno de 0,020 a 0,067 mm (HANANI et al., 2013; JRIDI et al., 2014). Piermaria et al. (2009) produziram filmes a partir de SPE, com espessura de 0,021 mm.

A permeabilidade ao vapor de água encontrada foi de 7,85 g.mm/kPa.dia.m², não havendo muitos dados disponíveis para filmes a partir de SPE com relação a esta propriedade, além de serem utilizados outros métodos, impossibilitando a comparação. No entanto, Oliveira, Michelin e Burkert (2020) obtiveram os espectros de FT-IR de SPE produzidas por *Ensifer meliloti* SEMIA 135 em que foram observadas características hidrofílicas, sendo assim o filme em questão não é adequado para uso como barreira à umidade (FORATO; ASSIS; BERNARDES FILHO, 2011). Outro aspecto relevante é a quantidade de plastificante utilizada na solução filmogênica. De acordo com Turhan et al. (2007), o glicerol, quando incorporado à matriz do filme em altas concentrações, diminui as forças atrativas entre as cadeias poliméricas, aumenta o volume livre e movimentos segmentares, as moléculas de água difundem mais facilmente, o que resulta em maior PVA. Portanto, os plastificantes só devem ser usados na quantidade mínima necessária para obter a vantagem de melhoramento das propriedades do filme (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2005).

Em relação à solubilidade, nos estudos realizados por Piermaria et al. (2009), observou-se a solubilidade total dos filmes de Kefiran em água, a 100 °C, resultado um pouco inferior ao encontrado neste trabalho (83,61%). Sabe-se que a matéria prima utilizada, SPE, possui em sua composição ácidos urônicos ou até mesmo piruvato, o que determina o caráter polianiónico, promovendo assim alterações na sua conformação molecular e aumentando a sua solubilidade (DIAZ; VENDRUSCOLO; VENDRUSCOLO, 2004; RADCHENKOVA et al., 2013).

3.2.1.3 Propriedades mecânicas

A Tabela 5 apresenta algumas propriedades mecânicas (tração e alongação) de filmes de SPE sintetizadas por diferentes micro-organismos, incluindo o do presente trabalho. As diferenças observadas podem ser atribuídas à composição e estrutura desses biopolímeros, bem como às técnicas utilizadas na preparação de filmes.

Tabela 5 - Propriedades mecânicas dos filmes de SPE de diferentes micro-organismos.

Origem do SPE	Tração (MPa)	Elongação (%)	Referência
<i>Ensifer meliloti</i> SEMIA 135	52,90 ± 0,60	6,73 ± 2,02	Este trabalho
<i>Pseudomonas oleovorans</i> NRRL B-14682	51,00 ± 3,00	9,50 ± 3,90	Alves et al. (2011)
Kefir <i>grains</i> CIDCA AGK1	40,92 ± 7,83	2,70 ± 0,47	Piermaria et al. (2009)
<i>Graesiella</i> sp. BEA1940B	16,25 ± 0,03	4,98 ± 0,09	Gongi et al. (2022)

Diante dos resultados encontrados, quando comparados aos da literatura, o filme do presente estudo apresentou valores superiores tanto para a tração quanto para a elongação. As propriedades mecânicas são extremamente importantes para filmes, já que é possível sugerir aplicações para cada material dependendo das suas propriedades. Confirma Filipini (2019), geralmente valores mais altos de resistência à tração e capacidade de elongação são necessários para que esses bioplásticos tenham uma maior gama de aplicações.

3.2.1.4 Propriedades ópticas

Conforme a Tabela 4, os valores de diferença total de cor (ΔE) resultaram em uma média de 7,33, quando comparado à amostra controle (placa branca). E, de acordo com os parâmetros de caracterização propostos pelo espaço de cor CIELAB - a^* (-0,65), valor este que se refere à cor mais esverdeada; e b^* (8,30), este sendo uma cor mais amarelada - observa-se que o filme apresentou uma tendência ao acinzentado, confirmado pela análise de opacidade, 14,36%. O valor de L^* , de 93,87, indica uma luminosidade mais para o claro do que para o escuro.

3.2.3.5 Propriedades microestruturais

Segundo Yun et al. (2017), as avaliações por microscopia têm como principal objetivo verificar a estrutura dos filmes, possibilitando a visualização da superfície e auxiliando na caracterização quanto à estrutura e presença de poros, rachaduras, rugas e partículas aglomeradas. De acordo com Antonino et al. (2017), é uma técnica que possibilita a obtenção

de imagens com poder de resolução elevado, permitindo a análise dos aspectos estruturais dos materiais. Logo, essas estruturas dependem das interações entre os componentes da formulação e a sua disposição na formação durante a etapa de secagem (PASTOR et al., 2010).

As imagens da seção transversal (Figura 4) e da superfície (Figura 5) dos filmes foram utilizadas para entender a relação entre as características superficiais e internas. Ao observar as imagens, verifica-se que os filmes não apresentaram superfícies totalmente compactas e lisas. Na Figura 4, na secção transversal observa-se uma espessura homogênea, no entanto apresentando rugosidades, podendo ser observado melhor na Figura 5, na microscopia eletrônica de varredura da superfície, onde se observa aglomerados em sua superfície.

Sabe-se pouco sobre a interação das SPE com glicerol na formação de filmes. O glicerol é uma molécula hidrofílica de baixa massa molar que poderia caber facilmente nas cadeias por estabelecimento de pontes de hidrogênio com grupos reativos do polímero. Ressaltando também que o plastificante ajuda nas propriedades durante o armazenamento, dependendo da quantidade adicionada de glicerol, poderá haver perdas das suas propriedades ao longo do tempo (PIERMARIA et al., 2009). Portanto, os plastificantes só devem ser usados na quantidade mínima necessária para obter o melhoramento (SOTHORNVIT; KROCHTA, 2005). Por isso, os testes preliminares das formulações de filmes de SPE variaram a quantidade de plastificante adicionado à solução filmogênica.

Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura da secção transversal dos filmes de SPE de *Ensifer meliloti* SEMIA 135.

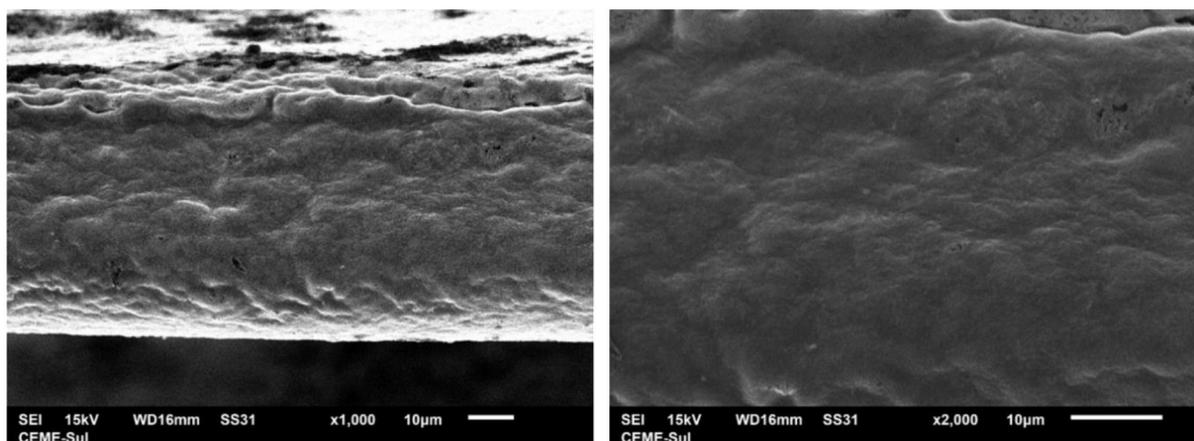
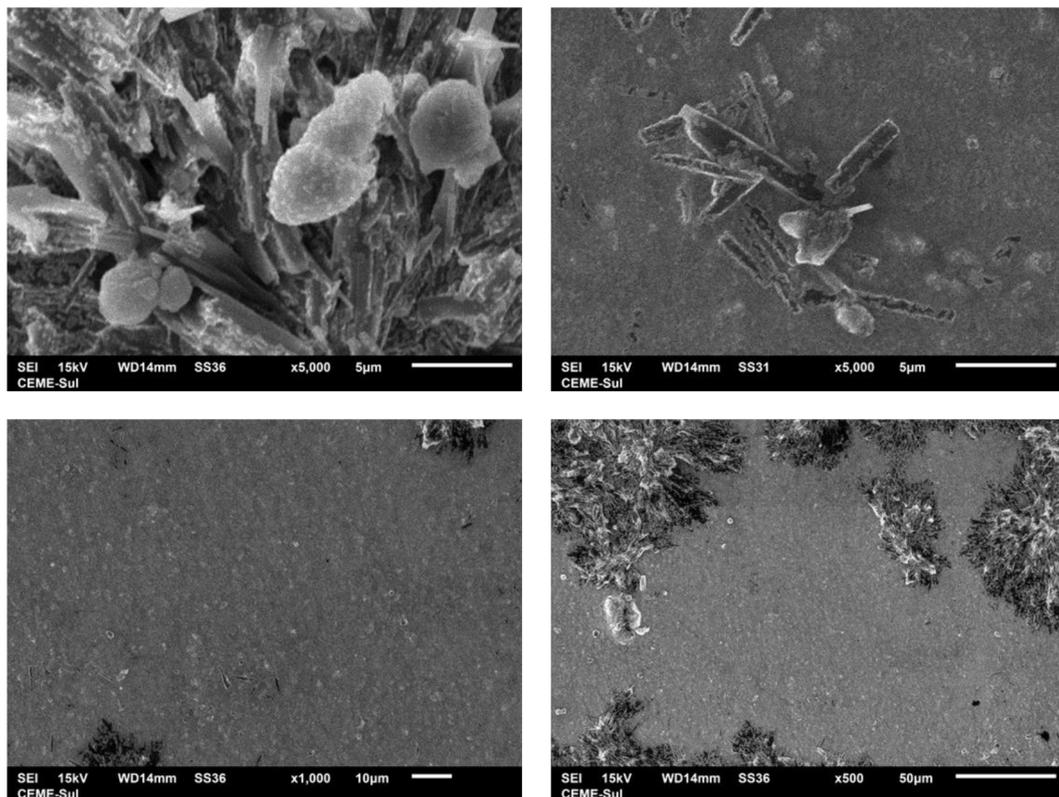


Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura da superfície dos filmes de SPE de *Ensifer meliloti* SEMIA 135



4. CONCLUSÃO

Diante do exposto, foi possível elaborar filmes biopoliméricos a partir da técnica de *casting* usando SPE produzidas pela bactéria *Ensifer meliloti* SEMIA 135, com formulação de 20% de glicerol (plastificante) em relação à massa de SPE (g). Obteve-se filmes com uma espessura homogênea e com um fácil manuseio, sem demonstrar rachaduras ou fragilidades, com propriedades mecânicas superiores a outros filmes obtidos de SPE por diferentes micro-organismos. Sendo assim, a produção de substâncias poliméricas extracelulares a partir de micro-organismos para a fabricação de filmes biodegradáveis apresenta diversos benefícios. Além de contribuir para investigações de soluções sustentáveis e ambientais, esses materiais oferecem boas características e propriedades, como resistência, flexibilidade e degradação natural. A pesquisa e o desenvolvimento contínuos nesse campo são essenciais para impulsionar ainda mais a otimização da produção de SPE e a utilização desses filmes biodegradáveis.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, V. D.; COSTA, N.; COELHO, I. M. Barrier properties of biodegradable composite films based on kappa-carrageenan/pectin blends and mica flakes. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 269–276, 2010.

ALVES, V. D.; FERREIRA, A. R.; COSTA, N.; FREITAS, F.; REIS, M. A. M.; COELHO, I. M. Characterization of biodegradable films from the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p.1582–1590, 2011.

ANDHARE, P.; DELATTRE, C.; PIERRE, G.; MICHAUD, P.; PATHAK, H. Characterization and rheological behaviour analysis of the succinoglycan produced by *Rhizobium radiobacter* strain CAS from curd sample. **Food Hydrocolloids**, v. 64, p. 1–8, 2017.

ANTONINO, R. S. C. M. Q.; FOOK, B. R. P. L.; LIMA, V. A. O.; RACHED, R. I. F.; LIMA, E. P. N.; LIMA, R. J. S.; COVAS, C. A. P.; FOOK, M. V. L. Preparation and characterization of chitosan obtained from shells of shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). **Marine Drugs**, v. 15, n. 5, 141, 2017.

ASTM. American Society for Testing and Materials. **Standard test methods for water vapor transmission of materials (E96-00)**. West Conshohocken: ASTM International, 2000.

ASTM. American Society for Testing and Materials. **Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting (D882-02)**. West Conshohocken: ASTM International, 2002.

CARRIÓN, O.; DELGADO, L.; MERCADE, E. New emulsifying and cryoprotective exopolysaccharide from Antarctic *Pseudomonas* sp. ID1. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 1028–1034, 2015.

CASTELLANE, T. C. L.; CAMPANHARO, J. C.; COLNAGO, L. A.; COUTINHO, I. D.; LOPES, E. M.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. M. Characterization of new exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici* during growth on hydrocarbon substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 361-369, 2017.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. M. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 191–197, 2014.

CASTELLANE, T. C. L.; PERSONA, M. R.; CAMPANHARO, J. C.; LEMOS, E. G. M. Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological and bioremediation applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 515-522, 2015.

DEEPIKA, K. V.; RAGHURAM, M.; KARIALI, E.; BRAMHACHARI, P. V. Biological responses of symbiotic *Rhizobium radiobacter* strain VBCK1062 to the arsenic contaminated rhizosphere soils of mung bean. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 134, p. 1-10, 2016.

DIAZ, P. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; VENDRUSCOLO, J. L. S. Reologia de xantana: uma revisão sobre a influência de eletrólitos na viscosidade de soluções aquosas de gomas xantana. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n.1, p. 15-28, 2004.

DUTA, F. P.; FRANÇA, F. P.; LOPES, L. M. A. Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in *Rhizobium* sp. using the response surface method. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 391–399, 2006.

FILIPINI, G. S. **Desenvolvimento de embalagens biodegradáveis ativas a partir de polímeros e extrato natural de jambolão**. 2019. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências dos Alimentos) - Escola de Química de Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande – RS, 2019.

FORATO, L.; ASSIS, O.; BERNARDES FILHO, R. Revestimentos comestíveis protetores em frutas e hortaliças, 2011. In: FERREIRA, M. D. (Ed.). **Tecnologias pós-colheita em frutas e hortaliças**. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação, 2011. cap. 12. p. 207-218.

GARCÍA-FRAILLE, P.; CARRO, L.; ROBLEDO, M.; BAHENA, M. H. R.; FLORES, F. J.; FERNÁNDEZ, M. T.; MATEOS, P. F.; RIVAS, R.; IGUAL, J. M.; MARTÍNEZ, M. E.; PEIX, A.; VELÁZQUEZ, E. *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. **Plos One**, v. 7, n. 5, p. 1–7, 2012.

GONGI, W.; PINCHETTI, J. L. G.; CORDEIRO, N.; SADOK, S.; OUADA, H. B. Characterization of biodegradable films based on extracellular polymeric substances extracted from the thermophilic microalga *Graesiella* sp. **Algal Research**, v. 61, 102565, 2022.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat and lipids: water vapor permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science + Technology**, v. 29, p. 39-50, 1994.

GRANDINI, C. A. **Uso de filmes de quitosana/celulose em processos catalíticos e adsortivos com aplicações tecnológicas e didáticas**. 2022. 103 f. Tese (Doutorado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande - RS, 2022.

HANANI, Z. A. N.; BEATTY, E.; ROOS, Y. H.; MORRIS, M. A.; KERRY, J. P. Development and characterization of biodegradable composite films based on gelatin derived from beef, pork and fish sources. **Foods**, v. 2, p. 1–17, 2013.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Eds.). **Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher Ltda., 2001. Cap. 6. p. 93-121.

JAHN, A.; NIELSEN, P. H. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin. **Water Science Technology**, v. 32, p. 157-164, 1995.

JRIDI, M.; HAJJI, S.; AYED, H. B.; LASSOUED, I.; MBAREK, A.; KAMMOUN, M.; SOUISSI, N.; NASRI, M. Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of

gelatin-chitosan composite edible films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 373–379, 2014.

LJUNGBERG, L. Y. Materials selection and design for development of sustainable products. **Materials & Design**, v. 28, n. 2, p. 466-479, 2007.

MONTE, M. L. **Cinética e termodinâmica da secagem convectiva de filmes de quitosana**. 2016. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande – RS, 2016.

OLIVEIRA, J. M.; AMARAL, S. A.; BURKERT, C. A. V. Rheological, textural and emulsifying properties of an exopolysaccharide produced by *Mesorhizobium loti* grown on a crude glycerol-based medium. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2180-2187, 2018.

OLIVEIRA, J. M.; MICHELON, M.; BURKERT, C. A.V. Biotechnological potential of soybean molasses to produce extracellular polymers by diazotrophic bacteria. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, 101608, 2020.

OSIRO, D.; FRANCO, R. W. A.; COLNAGO, L. A. Spectroscopic characterization of the exopolysaccharide of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Cu²⁺ resistance mechanism. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 7, p. 1339-1345, 2011.

PARREIDT, T. S.; MÜLLER, K.; SCHMID, M. Alginate-based edible films and coatings for food packaging applications. **Foods**, v. 7, 170, 2018.

PASTOR, C.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHÁFER, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 1174–1183, 2010.

PHILLIPS, K.; HAMID, N.; SILCOCK, P.; DELAHUNTY, C.; BARKER, M.; BREMER, P. Effect of season on the sensory quality of sea urchin (*Evechinus chloroticus*) roe. **Journal of Food Science**, v. 75, p. S20 – S30, 2010.

PIERMARIA, J. A.; PINOTTI, A.; GARCIA, M. A.; ABRAHAM, A. G. Films based on kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: development and characterization. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 684–690, 2009.

PRIMO, E. D.; COSSOVICH, S.; NIEVAS, F.; BOGINO, P.; HUMM, E. A.; HIRSCH, A. M.; GIORDANO, W. Exopolysaccharide production in *Ensifer meliloti* laboratory and native strains and their effects on alfalfa inoculation. **Archives of Microbiology**, v. 202, p. 391–398, 2020.

PRIYANKA, P.; ARUN, A. B.; ASHWINI, P.; REKHA, P. D. Versatile properties of an exopolysaccharide R-PS18 produced by *Rhizobium* sp. PRIM-18. **Carbohydrate Polymers**, v. 126, p. 215–221, 2015.

RADCHENKOVA, N.; VASSILEV, S.; PANCHEV, I.; ANZELMO, G.; TOMOVA, I.; NICOLAUS, B.; KUNCHEVA, M.; PETROV, K.; KAMBOUROVA, M. Production and

Properties of two novel exopolysaccharides synthesized by a thermophilic bacterium *Aeribacillus pallidus* 418. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, p. 31-43, 2013.

ROESLER, B. C. S.; VAZ, R. G.; CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. M. L.; BURKERT, C. A. V. The potential of extracellular biopolymer production by *Mesorhizobium* sp. from monosaccharide constituents of lignocellulosic biomass. **Biotechnology Letters**, v. 43, p. 1385–1394, 2021.

ROMANI, V. P.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; MARTINS, V. G. Active and sustainable materials from rice starch, fish protein and oregano essential oil for food packaging. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 268–274, 2017.

SAMIR, A., ASHOUR, F. H., HAKIM, A. A. A.; BASSYOUNI, M. Recent advances in biodegradable polymers for sustainable applications. **NPJ Materials Degradation**, v. 6, 68, 2022.

SANTOS, J. T. **Produção de exopolissacarídeos por *Ensifer meliloti* em frascos agitados e biorreator de bancada: condições de processo e caracterização parcial do biopolímero.** 2022. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Química de Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande – RS, 2022.

SIRACUSA, V.; ROCCULI, P.; ROMANI, S.; DALLA ROSA, M. Biodegradable polymers for food packaging: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 634–643, 2008.

SKURTYYS, O.; ACEVEDO, C. A.; PEDRESCHI, F.; ENRONOE, J.; OSORIO, F.; AGUILERA, J. M. C. **Food hydrocolloid edible films and coatings.** Nova Science Publishers Inc., 2010. 66 p.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizers in edible films and coatings. In: HAN, J. H. (Ed.). **Innovations in food packaging.** Amsterdam: Elsevier, 2005. p. 403-428.

SUN, F.; ZHITOMIRSKY, I. Electrodeposition of hyaluronic acid and composite films. **Surface Engineering**, v. 25, p. 621–627, 2009.

TRINDADE, R. A.; MUNHOZ, A. P.; GAUTÉRIO, F. A. G.; BURKERT, C. A. V. Padronização do inóculo de diferentes espécies de *Lactobacillus*. **Vetor**, v. 27, n. 2, p. 28-37, 2017.

TURHAN, K. N.; SANCAK, Z. O. E.; AYANA, B.; ERDOGDU, F. Optimization of glycerol effect on the mechanical properties and water vapor permeability of whey protein–methylcellulose films. **Journal of Process Engineering**, v. 30, p. 485–500, 2007.

VIJAYENDRA, S.V.N.; SHAMALA, T. R. Film forming microbial biopolymers for commercial applications— a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, p. 338–357, 2014.

WIMPENNEY, J. W. T.; PETERS, A.; SCOURFIELD, M. A. The physiology and biochemistry of biofilm. In: CHARACKLIS, W. G.; WILDERER, P. A. (Eds.). **Structure and function of biofilms.** John Wiley and Sons, Inc., 1993. p. 111-127.

XU, X.; LI, B.; KENNEDY, J. F.; XIE, B. J.; HUANG, M. Characterization of konjac glucomannan–gellan gum blend films and their suitability for release of nisin incorporated therein. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, p. 192–197, 2007.

YUN, Y.-H.; LEE, C.-M.; KIM, Y.-S.; YOON, S.-D. Preparation of chitosan/polyvinyl alcohol blended films containing sulfosuccinic acid as the crosslinking agent using UV curing process. **Food Research International**, v. 100, p. 377–386, 2017.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho, diferentes condições de estresse (ácido, alcalino e salino) foram avaliadas, a fim de verificar seus efeitos no cultivo de *Ensifer meliloti* SEMIA 135 visando a produção de substâncias poliméricas extracelulares (SPE). Observou-se que as condições de estresse, independente do tempo de aplicação das mesmas (24 h ou 48 h de cultivo), teve efeito negativo predominante sobre o crescimento celular, indicando os efeitos inibitórios das mesmas. Por outro lado, a produção de SPE foi aumentada em cerca de 130% em relação ao cultivo controle (sem estresse) após a adição de solução salina 0,6 M em 48 h de cultivo, indicando nesta condição um provável mecanismo de proteção do micro-organismo diante de uma condição ambiental desfavorável.

As SPE produzidas pela bactéria *Ensifer meliloti* SEMIA 135 usando manitol como fonte de carbono sem aplicação de estresse (cultivo controle) foram utilizadas para obtenção de um filme biopolimérico a partir da técnica de *casting*, usando glicerol como plastificante (20% em relação à massa de SPE). Obteve-se filmes com uma boa espessura para um fácil manuseio, sem demonstrar rachaduras ou fragilidades, com propriedades mecânicas superiores a outros filmes obtidos de SPE por diferentes micro-organismos, destacando-se os maiores valores de resistência à tração e capacidade de alongação (52,90 MPa e 6,73%, respectivamente), mostrando sua potencialidade para futuras aplicações.

CAPÍTULO VI

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 RESÍDUOS GERADOS E DESTINO

Todos os resíduos gerados durante a execução deste estudo foram destinados de acordo com a sua classificação, com base no Plano de Gerenciamento de Resíduos Químicos e Perigosos (PGRQP) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Os resíduos químicos obtidos durante as análises foram classificados de acordo com sua composição, logo os mesmos foram depositados em frascos âmbar, devidamente identificados, etiquetados e adequadamente acondicionados, a fim de evitar quaisquer riscos. E posteriormente, quando preenchidos por completo, esses resíduos foram encaminhados à Unidade de Armazenamento Temporário de Resíduos do EQA e recolhidos assim que atingida a quantidade mínima para solicitação de recolhimento pela Coordenação de Gestão Ambiental (PROINFRA-FURG).

6.2 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a possibilidade de produção de filmes através da biossíntese de SPE em cultivo com estresse salino;
- Estudar a síntese de SPE utilizando diferentes fontes de carbono, como, por exemplo, coprodutos agroindustriais, submetendo a diferentes condições de estresse;
- Utilizar formulação de solução filmogênica com adição de outro biopolímero, verificando o efeito sobre as propriedades, em particular permeabilidade ao vapor d'água e solubilidade;
- Avaliar a ação antioxidante e a capacidade antimicrobiana dos filmes biopoliméricos;
- Estudar a biodegradação dos filmes;
- Aplicar o filme como embalagem e determinar a vida útil de um alimento;
- Avaliar a composição centesimal das SPE (proveniente dos estresses ácido, alcalino, salino e sem estresse), a fim de verificar possíveis alterações devido aos estresses e se esse aspecto pode interferir no processo de formação dos filmes.

CAPÍTULO VII

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, V. D.; COSTA, N.; COELHO, I. M. Barrier properties of biodegradable composite films based on kappa-carrageenan/pectin blends and mica flakes. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 269–276, 2010.
- ALVES, V. D.; FERREIRA, A. R.; COSTA, N.; FREITAS, F.; REIS, M. A. M.; COELHO, I. M. Characterization of biodegradable films from the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p.1582–1590, 2011.
- ALVES-GAUTÉRIO, F. G.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Investigation by experimental design of agitation and aeration influence on the xanthan production process by *Xanthomonas arboricola* pv pruni. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 9, p. 1821–1835, 2015.
- ANDHARE, P.; DELATTRE, C.; PIERRE, G.; MICHAUD, P.; PATHAK, H. Characterization and rheological behaviour analysis of the succinoglycan produced by *Rhizobium radiobacter* strain CAS from curd sample. **Food Hydrocolloids**, v. 64, p. 1–8, 2017.
- ANTONINO, R. S. C. M. Q.; FOOK, B. R. P. L.; LIMA, V. A. O.; RACHED, R. I. F.; LIMA, E. P. N.; LIMA, R. J. S.; COVAS, C. A. P.; FOOK, M. V. L. Preparation and characterization of chitosan obtained from shells of shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). **Marine Drugs**, v. 15, n. 5, 141, 2017.
- ASTM. American Society for Testing and Materials. **Standard test methods for water vapor transmission of materials (E96-00)**. West Conshohocken: ASTM International, 2000.
- ASTM. American Society for Testing and Materials. **Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting (D882-02)**. West Conshohocken: ASTM International, 2002.
- BECKER, A.; PÜHLER, A. Production of exopolysaccharides. In: SPAINK, H. P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P. J. J. (Eds.). *Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, p. 97-118, 1998.
- BRANDA, S. S.; VIK, Å.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends in Microbiology**, v. 13, p. 20-26, 2005.
- BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J. A. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 62, p. 127-139, 2011.
- CARRIÓN, O.; DELGADO, L.; MERCADE, E. New emulsifying and cryoprotective exopolysaccharide from Antarctic *Pseudomonas* sp. ID1. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 1028–1034, 2015.
- CASTELLANE, T. C. L.; CAMPANHARO, J. C.; COLNAGO, L. A.; COUTINHO, I. D.;

- LOPES, E. M.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. M. Characterization of new exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici* during growth on hydrocarbon substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 361-369, 2017.
- CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1503-1506, 2007.
- CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. M. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 191-197, 2014.
- CASTELLANE, T. C. L.; PERSONA, M. R.; CAMPANHARO, J. C.; LEMOS, E. G. M. Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological and bioremediation applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 515-522, 2015.
- COSTA, O. Y. A.; RAAIJMAKERS, J. M.; KURAMAE, E. E. Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, article 1636, 2018.
- CRUZ, S. K. **Estudo das condições de processo na produção de polissacarídeos por *Mesorhizobium* sp. a partir de permeado de soro de queijo**. 2021. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Química de Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande – RS, 2021.
- DECHO, A. W. The EPS matrix as an adaptive bastion for biofilms: introduction to special issue. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 12, p. 23297-23300, 2013.
- DEEPIKA, K. V.; RAGHURAM, M.; KARIALI, E.; BRAMHACHARI, P. V. Biological responses of symbiotic *Rhizobium radiobacter* strain VBCK1062 to the arsenic contaminated rhizosphere soils of mung bean. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 134, p. 1-10, 2016.
- DIAZ, P. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; VENDRUSCOLO, J. L. S. Reologia de xantana: uma revisão sobre a influência de eletrólitos na viscosidade de soluções aquosas de gomas xantana. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n.1, p. 15-28, 2004.
- DUTA, F. P.; FRANÇA, F. P.; LOPES, L. M. A. Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in *Rhizobium* sp. using the response surface method. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 391-399, 2006.
- FERNANDES JÚNIOR, P. I.; ALMEIDA, J. P. S.; PASSOS, S. R.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Produção e comportamento reológico de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios isolados de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**; v. 45, n. 12, p. 1465-1471, 2010.
- FILIPINI, G. S. **Desenvolvimento de embalagens biodegradáveis ativas a partir de polímeros e extrato natural de jambolão**. 2019. 123 f. Dissertação (Mestrado em

Engenharia e Ciências dos Alimentos) - Escola de Química de Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande – RS, 2019.

FORATO, L.; ASSIS, O.; BERNARDES FILHO, R. Revestimentos comestíveis protetores em frutas e hortaliças, 2011. In: FERREIRA, M. D. (Ed.). **Tecnologias pós-colheita em frutas e hortaliças**. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação, 2011. cap. 12. p. 207-218.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; REIS, M. A. M. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. **Trends in Biotechnology**, v. 29, p. 388-398, 2011.

GALDEANO, C. M.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F.; GARCÍA, M. A. Effects of plasticizers on the properties of oat starch films. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 532–538, 2009.

GALLO, J. Q.; DEBEAUFORT, F.; CALLEGARIN, F.; VOILLEY, A. Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based edible films. **Journal of Membrane Science**, v. 180, p. 37-46, 2000.

GARCÍA-FRAILLE, P.; CARRO, L.; ROBLEDO, M.; RAMÍREZ-BAHENA, M.-H.; FLORES-FÉLIX, J.-D.; FERNÁNDEZ, M. T.; MATEOS, P. F.; RIVAS, R.; IGUAL, J. M.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; PEIX, A.; VELÁZQUEZ, E. *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. **Plos One**, v. 7, n. 5, e38122, 2012.

GASCH, A. P.; SPELLMAN, P. T.; KAO, C. M.; CAMEL-HAREL, O.; EISEN, M. B.; STORZ, G.; BOLSTEIN, D.; BROWN, D. O. Genomic expression programs in response of yeast to environmental changes. **Molecular and Cell Biology**, v. 11, p. 4241-4257, 2000.

GEESEY, G. G. Microbial exopolymers: ecological and economic considerations. **ASM News**, v. 48, p. 9–14, 1982.

GONGI, W.; PINCHETTI, J. L. G.; CORDEIRO, N.; SADOK, S.; OUADA, H. B. Characterization of biodegradable films based on extracellular polymeric substances extracted from the thermophilic microalga *Graesiella* sp. **Algal Research**, v. 61, 102565, 2022.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat and lipids: water vapor permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science + Technology**, v. 29, p. 39-50, 1994.

GONZÁLEZ, C. H. **Produção de exopolissacarídeos por rizóbios em meios de cultivo com coprodutos lácteos**. 2019. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química de Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande – RS, 2019.

- GRANDINI, C. A. **Uso de filmes de quitosana/celulose em processos catalíticos e adsortivos com aplicações tecnológicas e didáticas**. 2022. 103 f. Tese (Doutorado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande - RS, 2022.
- HAN, J. H.; SEO, G. H.; PARK, I. M.; KIM, G. M.; LEE, D. S. Physical and mechanical properties of pea starch edible films containing beeswax emulsions. **Journal of Food Science**, v. 71, p. E290-E296, 2006.
- HANANI, Z. A. N.; BEATTY, E.; ROOS, Y. H.; MORRIS, M. A.; KERRY, J. P. Development and characterization of biodegradable composite films based on gelatin derived from beef, pork and fish sources. **Foods**, v. 2, p. 1–17, 2013.
- HERNANDEZ-IZQUIERDO, V. M.; KROCHTA, J. M. Thermoplastic processing of proteins for film formation - a review. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 2, p. 30–39, 2008.
- HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Eds.). **Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher Ltda., 2001. Cap. 6. p. 93-121.
- JAHN, A.; NIELSEN, P. H. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin. **Water Science Technology**, v. 32, p. 157-164, 1995.
- JRIDI, M.; HAJJI, S.; AYED, H. B.; LASSOUED, I.; MBAREK, A.; KAMMOUN, M.; SOUISSI, N.; NASRI, M. Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin-chitosan composite edible films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 373–379, 2014.
- KHAN, M.A.; ASLAM, F.; JAVED, M.F; ALABDULJABBAR, H; DEIFALLA, A.F. New prediction models for the compressive strength and dry-thermal conductivity of bio-composites using novel machine learning algorithms. **Journal of Cleaner Production**, v. 350, p. 131364–131364, 2022.
- KROCHTA, J. M. Protein as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities. In: GENNADIOS, A. (Ed.). **Protein-based films and coating**, 2002. Chapter 1. p. 1-39.
- LANDIM, A. P. M.; BERNARDO, C. O.; MARTINS, I. B. A.; FRANCISCO, M. R.; SANTOS, M. B.; MELO, N. R. Sustentabilidade quanto às embalagens de alimentos no Brasil. **Polímeros**, v. 26, p. 82–92, 2016.
- LEE, S. Y.; CHOI, J. Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. **Polymer Degradation Stability**, v. 59, p. 387-393, 1998.
- LJUNGBERG, L. Y. Materials selection and design for development of sustainable products. **Materials & Design**, v. 28, n. 2, p. 466-479, 2007.
- LOPES, L.; ANDRADE, C. T. Polímeros de origem microbiana: polissacarídeos bacterianos. **Revista de Química Industrial**, v. 703, p.19-23, 1995.

LOPES, L.; ANDRADE, C. T.; MANO, E. B. O valor das gomas para as indústrias. **Ciência Hoje**, v. 12, n. 71, p. 65-67, 1991.

LUVIELMO, M. M.; BORGES, C. D.; TOYAMA, D. O.; VENDRUSCOLO, C. T.; SCAMPARINI, A. R. P. Structure of xanthan gum and cell ultrastructure at different times of alkali stress. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 102-109, 2016.

MELO, H. F. **Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial**. 2006. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 2006.

MONTE, M. L. **Cinética e termodinâmica da secagem convectiva de filmes de quitosana**. 2016. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, 2016.

MONTEIRO, N. K.; ARANDA-SELVERIO, G.; EXPOSTI, D. T. D.; SILVA, M. L. C.; LEMOS, E. G. M.; CAMPANHARO, J. C.; SILVEIRA, J. L. M. Caracterização química dos géis produzidos pelas bactérias diazotróficas *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium* sp. **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 705-708, 2012.

MORETTO, C.; CASTELLANE, T. C. L.; LOPES, E.; OMORI, W. P.; SACCO, L. P.; LEMOS, E. G. M. Chemical and rheological properties of exopolysaccharides produced by 178 four isolates of rhizobia. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 291– 298, 2015.

MOSCOVICI, M. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p. 1- 11, 2015.

MOSHABAKI ISFAHANI, F.; TAHMOURESPOUR, A.; HOODAJI, M.; ATAABADI, M.; MOHAMMADI, A. Characterizing the new bacterial isolates of high yielding exopolysaccharides under hypersaline conditions. **Journal of Cleaner Production**, v. 185, p. 922–928, 2018.

MUZZARELLI, R. A. A. **Chitin enzymology**. Grottammare: Atec Edizione, 2001. 614 p.

OLIVEIRA, A. S. **Dextrana: revisão sobre uso e possíveis aplicações industriais**. 2013. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro – SP, 2013.

OLIVEIRA, J. M.; AMARAL, S. A.; BURKERT, C. A. V. Rheological, textural and emulsifying properties of an exopolysaccharide produced by *Mesorhizobium loti* grown on a crude glycerol-based medium. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2180-2187, 2018.

OLIVEIRA, J. M.; MICHELON, M.; BURKERT, C. A. V. Biotechnological potential of soybean molasses for the production of extracellular polymers by diazotrophic bacteria. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, 101609, 2020.

- OMOIKE, A.; CHOROVER, J. Adsorption to goethite of extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis*. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 70, p. 827–838, 2006.
- OSIRO, D.; FRANCO, R. W. A.; COLNAGO, L. A. Spectroscopic characterization of the exopolysaccharide of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Cu²⁺ resistance mechanism. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 7, p. 1339-1345, 2011.
- OZTURK, S.; ASLIM, B. Modification of exopolysaccharide composition and production by three cyanobacterial isolates under salt stress. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 17, p. 595-602, 2010.
- PARREIDT, T. S.; MÜLLER, K.; SCHMID, M. Alginate-based edible films and coatings for food packaging applications. **Foods**, v. 7, 170, 2018.
- PASTOR, C.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; CHÁFER, M.; CHIRALT, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S. Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 1174–1183, 2010.
- PESSÔA, M. G.; VESPERMANN, K. A. C.; PAULINO, B. N.; BARCELOS, M. C. S.; PASTORE, G. M.; MOLINA, G. Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 319-339, 2019.
- PHILLIPS, K.; HAMID, N.; SILCOCK, P.; DELAHUNTY, C.; BARKER, M.; BREMER, P. Effect of season on the sensory quality of sea urchin (*Evechinus chloroticus*) roe. **Journal of Food Science**, v. 75, p. S20–S30, 2010.
- PIERMARIA, J. A.; PINOTTI, A.; GARCIA, M. A.; ABRAHAM, A. G. Films based on kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: development and characterization. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 684–690, 2009.
- PRIMO, E. D.; COSSOVICH, S.; NIEVAS, F.; BOGINO, P.; HUMM, E. A.; HIRSCH, A. M.; GIORDANO, W. Exopolysaccharide production in *Ensifer meliloti* laboratory and native strains and their effects on alfalfa inoculation. **Archives of Microbiology**, v. 202, p. 391–398, 2020.
- PRIYANKA, P.; ARUN, A. B.; ASHUWINI, P.; REKHA, P.D. Versatile properties of an exopolysaccharide R-PS18 produced by *Rhizobium* sp. PRIM-18. **Carbohydrate Polymers**, v. 126, p. 215-221, 2015.
- RADCHENKOVA, N.; VASSILEV, S.; PANCHEV, I.; ANZELMO, G.; TOMOVA, I.; NICOLAUS, B.; KUNCHEVA, M.; PETROV, K.; KAMBOUROVA, M. Production and properties of two novel exopolysaccharides synthesized by a thermophilic bacterium *Aeribacillus pallidus* 418. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, p. 31-43, 2013.
- RAZIKA, G.; AMIRA, B.; BENHIZIA, Y.; BENGUEDOUAR, A. Influence of carbon source on the production of exopolysaccharides by *Rhizobium sllae* and on the nodulation of *Hedysarum coronarium* L. legume. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 30, p. 5940-5946, 2012.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 139 – 144, 1998.

RIBEIRO, V. A. **Produção e caracterização de exopolissacarídeos a partir de bactérias diazotróficas cultivadas em meios à base de glicerol residual**. 2015. 192 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química de Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande – RS, 2015.

RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V. Exopolysaccharides produced by *Rhizobium*: production, composition and rheological properties. **Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry**, v. 4, p. 1-6, 2016.

RHIM, J.-W.; PARK, H.-M.; HA, C.-S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1629-1652, 2013.

ROESLER, B. C. S. **Exopolissacarídeos de *Mesorhizoibium* sp. Semia 816 partir de monossacarídeos constituintes da biomassa lignocelulósica e hidrolisado de casca de soja**. 2021. 139 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande - RS, 2021.

ROESLER, B. C. S.; VAZ, R. G.; CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. M. L.; BURKERT, C. A. V. The potential of extracellular biopolymer production by *Mesorhizobium* sp. from monosaccharide constituents of lignocellulosic biomass. **Biotechnology Letters**, v. 43, p. 1385–1394, 2021.

ROMANI, V. P.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; MARTINS, V. G. Active and sustainable materials from rice starch, fish protein and oregano essential oil for food packaging. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 268–274, 2017.

SAMIR, A., ASHOUR, F. H., HAKIM, A. A. A.; BASSYOUNI, M. Recent advances in biodegradable polymers for sustainable applications. **NPJ Materials Degradation**, v. 6, 68, 2022.

SANTOS, J. T. **Produção de exopolissacarídeos por *Ensifer meliloti* em frascos agitados e biorreator de bancada: condições de processo e caracterização parcial do biopolímero**. 2022. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Química de Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande – RS, 2022.

SENTHIL KUMAR, M.; SWARNALAKSHMI, K.; ANNAPURNA, K. Exopolysaccharide from rhizobia: production and role in symbiosis. In: HANSEN, A. P.; CHOUDHARY, D. K.; AGRAWAL, P. K.; VARMA, A. (Eds.). **Rhizobium biology and biotechnology**. [s. l.]: Springer International Publishing, 2017. p. 257–292.

SCHULTZE, M.; KONDOROSI, A. Regulation of symbiotic root nodule development. **Annual Review of Genetics**, v. 32, n. 1, p. 33–57, 1998.

SHEHNI, S. A.; SOUDI, M. R.; HOSSEINKHANI, S.; BEHZADIPOUR, N. Improvement of xanthan gum production in batch culture using stepwise acetic acid stress. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 83, p. 19425-19428, 2011.

SHI, Y.; HUANG, J.; ZENG, G.; GU, Y.; CHEN, Y.; HU, Y.; TANG, B.; ZHOU, J.; YANG, Y.; SHI, L. Exploiting extracellular polymeric substances (EPS) controlling strategies for performance enhancement of biological wastewater treatments: an overview. **Chemosphere**, v. 180, p. 396-411, 2017.

SHIGEMASA, Y.; USUI, H.; MORIMOTO, M.; SAIMOTO, H.; OKAMOTO, Y.; MINAMI, S.; SASHIWA, H. Chemical modification of chitin and chitosan 1: preparation of partially deacetylated chitin derivatives via a ring-opening reaction with cyclic acid anhydrides in lithium chloride/N,N-dimethylacetamide. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 237-243, 1999.

SIRACUSA, V.; ROCCULI, P.; ROMANI, S.; DALLA ROSA, M. Biodegradable polymers for food packaging: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 634–643, 2008.

SKURTYYS, O.; ACEVEDO, C. A.; PEDRESCHI, F.; ENRONOE, J.; OSORIO, F.; AGUILERA, J. M. C. **Food hydrocolloid edible films and coatings**. Nova Science Publishers Inc., 2010. 66 p.

SOARES, B. **Influência do pH e da irradiação em filmes biodegradáveis de proteínas do soro de leite**. 2012. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia - GO, 2012.

SOARES, R. M. D.; LIMA, A. M. F.; OLIVEIRA, R. V. B.; PIRES, A. T. N.; SOLDI, V. Thermal degradation of biodegradable edible films based on xanthan and starches from different sources. **Polymer Degradation and Stability**, v. 90, p. 449–454, 2005.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizers in edible films and coatings. In: HAN, J. H. (Ed.). **Innovations in food packaging**. Amsterdam: Elsevier, 2005. p. 403-428.

STAUDT, A. K.; WOLFE, L. G.; SHROUT, J. D. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*. **Archives of Microbiology**, v. 194, p. 197–206, 2012.

SUN, F.; ZHITOMIRSKY, I. Electrodeposition of hyaluronic acid and composite films. **Surface Engineering**, v. 25, p. 621–627, 2009.

TRINDADE, R. A. **Bioconversão do permeado de soro em ácido láctico e exopolissacarídeos por bactérias**. 2018. 84 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Escola de Química de Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande – RS, 2018.

TRINDADE, R. A.; MUNHOZ, A. P.; BURKERT, C. A. V. Impact of a carbon source and stress conditions on some properties of xanthan gum produced by *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 167-172, 2018.

TRINDADE, R. A.; MUNHOZ, A. P.; GAUTÉRIO, F. A. G.; BURKERT, C. A. V. Padronização do inóculo de diferentes espécies de *Lactobacillus*. **Vetor**, v. 27, n. 2, p. 28-37, 2017.

TURHAN, K. N.; SANCAK, Z. O. E.; AYANA, B.; ERDOGDU, F. Optimization of glycerol effect on the mechanical properties and water vapor permeability of whey protein–methylcellulose films. **Journal of Process Engineering**, v. 30, p. 485–500, 2007.

VIJAYENDRA, S. V. N.; SHAMALA, T. R. Film forming microbial biopolymers for commercial applications— a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, p. 338–357, 2014.

VU, B.; CHEN, M.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules**, v. 14, p. 2535–2554, 2009.

WIMPENNEY, J. W. T.; PETERS, A.; SCOURFIELD, M. A. The physiology and biochemistry of biofilm. In: CHARACKLIS, W. G.; WILDERER, P. A. (Eds.). **Structure and function of biofilms**. John Wiley and Sons, Inc., 1993. p. 111-127.

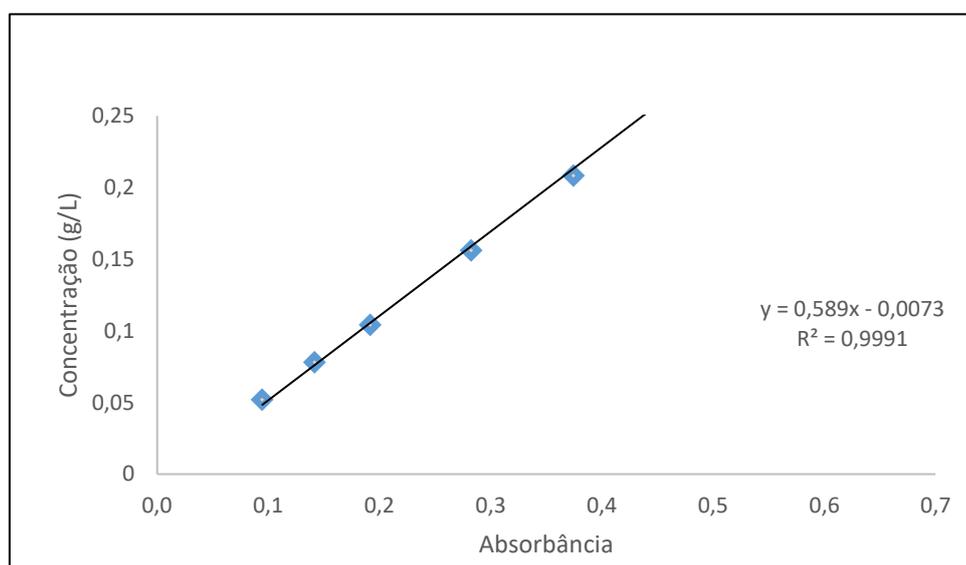
XU, X.; LI, B.; KENNEDY, J. F.; XIE, B. J.; HUANG, M. Characterization of konjac glucomannan–gellan gum blend films and their suitability for release of nisin incorporated therein. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, p. 192–197, 2007.

YANG, H.; WANG, Z.; LIN, M.; YANG, S.-T. Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici*: fermentation kinetics and economic analysis. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 1-9, 2018.

YUN, Y.-H.; LEE, C.-M.; KIM, Y.-S.; YOON, S.-D. Preparation of chitosan/polyvinyl alcohol blended films containing sulfosuccinic acid as the crosslinking agent using UV curing process. **Food Research International**, v. 100, p. 377–386, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Curva padrão de biomassa de *Ensifer meliloti* SEMIA 135



APÊNDICE 2 - Formulações utilizadas nos testes preliminares para produção de filmes e suas características.

Formulação	Características
A	Retirada quase impossível da placa
B	Fragilidade
C	Difícil manuseio, não saía da placa sem rasgar, muito pegajoso devido à quantidade de glicerol
D	Difícil manuseio, não saía da placa sem rasgar, coloração não uniforme (esbranquiçada)
E	Fácil manuseio, retirada da placa muito mais fácil antes das demais

A, 1 g SPE, 100 mL água, 15% glicerol, 20 mL solução filmogênica; B, 1 g SPE, 100 mL água, 15% glicerol, 10 mL solução filmogênica; C, 0,5 g SPE, 100 mL água, 30% glicerol, 30 mL solução filmogênica; D, 0,5 g SPE, 100 mL água, 20% glicerol, 25 mL solução filmogênica; E, 1,0 g SPE, 100 mL água, 20% glicerol, 25 mL solução filmogênica.