

EFEITO DO INÓCULO DE *PSEUDOMONAS* SP. CMM43 NO ACÚMULO E CARACTERIZAÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)

Ane G. Crochemore^{1*}, Claire T. Vendruscolo⁴, Maria Laura T. Mattos², Angelita da S. Moreira⁴, Maria do Carmo R. Peralba³

¹Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec)-UFPel, PPG em Biotecnologia (anecrochemore@gmail.com)

²Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil

³Instituto de Química- UFRGS

⁴Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA) e Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec)UFPel

Resumo—Polihidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres armazenados por diversas bactérias e são totalmente biodegradáveis, biocompatíveis e podem ser produzidos a partir de fontes renováveis. O poli(3-hidroxi-butilato), P(3HB), é o polímero mais estudado pertencente à família dos PHAs por possuir propriedades que o tornam competitivo com o polipropileno. Este trabalho investigou o acúmulo de P(3HB) pela cepa *Pseudomonas* sp. CMM43 na fase de inóculo utilizando diferentes combinações de temperatura e agitação. A cepa acumulou P(3HB) em 24 h de inóculo em todas as combinações avaliadas, sendo a maior quantidade de P(3HB), 4 g.L⁻¹, alcançada na combinação 28°C e 250 rpm. As análises de GPC e DSC mostraram que o polímero apresentou baixa massa molar e baixa temperatura de fusão, não sofrendo influência das combinações testadas.

Palavras-chave: Poli(3-hidroxi-butilato), *Pseudomonas*, massa molar, temperatura de fusão

Introdução

Polihidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres armazenados por diversas bactérias, com a finalidade de reserva de carbono e energia para a célula, podendo atingir níveis de até 90 % da massa celular seca [1]. O grande atrativo desses biomateriais é que eles são totalmente biodegradáveis, biocompatíveis e podem ser produzidos a partir de fontes renováveis [2]. O Poli(3-hidroxi-butilato), P(3HB), é um dos PHAs mais importante e amplamente estudado [3] pois apresenta propriedades que o tornam altamente competitivo com o polipropileno (PP) [4], que é o termoplástico com a maior taxa de crescimento anual no mundo, devido às suas excepcionais propriedades e versatilidade de aplicação e uso [5]. Os bioprocessos para obtenção de PHAs ainda têm um alto custo comparado com a produção de plásticos convencionais, sendo o tipo de substrato utilizado, a etapa de extração [6], o rendimento do polímero e o elevado tempo de cultivo os fatores determinantes [7]. Na tentativa de diminuir o custo total do processo novos microrganismos e novas fontes de carbono têm sido testados para síntese de polímeros [8], assim como novas metodologias de extração são desenvolvidas [9,10]. O trabalho teve como objetivos avaliar o efeito do inóculo de *Pseudomonas* sp. CMM43 no acúmulo e caracterização de P(3HB).

Parte Experimental

Microrganismo: *Pseudomonas* sp. acesso CMM43, P(3HB) positiva [11], preservada na Coleção de Microrganismos Multifuncionais de Clima Temperado (CMMCT).

Preparo do inóculo: preparado o inóculo a partir de uma suspensão bacteriana (pré-inóculo), proveniente de placas com o meio YM [12] sólido utilizando sacarose como fonte de carbono. Essa suspensão foi transferida para *erlenmeyers* de 500 mL contendo 250 mL de caldo YM, que foi incubado em incubador agitador orbital por 24 h. Avaliadas as seguintes combinações de temperatura e agitação: (A) 28 °C e 250 rpm, (B) 28 °C e 150 rpm, (C) 30 °C e 250 rpm e (D) 32 °C e 250 rpm.

Determinação de massa celular seca (MCS): gravimetria - centrifugação de 30 mL de caldo cultivado, em triplicata, a 18550 g por 20 min, a 4 °C e uma lavagem com solução salina 0,85 %. Colocado o precipitado em estufa a 54 °C por 24 h. Após esse tempo as amostras permaneceram 30 min em dessecador, para posterior pesagem.

Quantificação do P(3HB): amostras de MCS (0,02 g) submetidas à metanólise [13, 14] e após analisadas por cromatografia gasosa. Utilizado detector de ionização em chama (FID), o gás de arraste foi o hidrogênio (30 mL.min⁻¹) e a rampa de temperatura utilizada foi 60 °C por 1 min, com aumento de 11 °C.min⁻¹ até atingir a temperatura de 200 °C, que foi mantida por 4 min. O volume injetado foi de 1 µL, manualmente.

Extração do polímero: utilizado tubo fechado, a partir de MCS, utilizando clorofórmio (10 mL.g^{-1}), aquecimento a $58 - 59 \text{ }^\circ\text{C}$ com agitação magnética por 2 h; ao final do processo foi realizada filtração e evaporação lenta do solvente em placas de petri tampadas.

Determinação da distribuição de massa molar do polímero por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC): amostras solubilizadas em 2 mL de clorofórmio e filtradas antes da injeção. O solvente utilizado foi THF em uma vazão de 1 mL.min^{-1} .

Análise térmica – Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC): utilizada uma atmosfera de nitrogênio a uma taxa de 20 mL.min^{-1} . As amostras foram submetidas às seguintes condições de teste: isotérmica de $20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 min, primeiro ciclo de aquecimento de 20 a $200 \text{ }^\circ\text{C}$ a uma taxa de $10 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$, isotérmica $200 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min; ciclo de arrefecimento de 200 a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ a uma taxa de $10 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$; isotérmica de $20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min, segundo ciclo de aquecimento de 20 a $200 \text{ }^\circ\text{C}$ a uma taxa de $10 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$. Para avaliar o efeito da história térmica na obtenção da amostra foram observados valores de temperatura de fusão (T_m) do primeiro ciclo de aquecimento. No entanto, a fim de eliminar a história térmica do material, a T_m foi recolhida do segundo ciclo de aquecimento. O grau de cristalinidade (X_c) foi determinado a partir da entalpia de fusão da amostra (ΔH_m) e a entalpia de fusão do P(3HB) puro cristalino ($\Delta H_m = 146 \text{ J/g}$) [15, 16].

Resultados e Discussão

O P(3HB) acumulado na fase de inóculo (24 h) e a produção da MCS sob diferentes condições de temperatura e agitação estão apresentados na Fig.1. O percentual de P(3HB) acumulado em relação a MCS, em 24 h a 32°C e 250 rpm, atingiu 50%. Esse resultado é alcançado geralmente com um tempo de cultivo de 48 a 96 h [17, 18, 19]. Os maiores valores de MCS ($10,4 \text{ g.L}^{-1}$) e de P(3HB) (4 g/L^{-1}) foram obtidos utilizando-se a temperatura de $28 \text{ }^\circ\text{C}$ e a agitação 250 rpm.

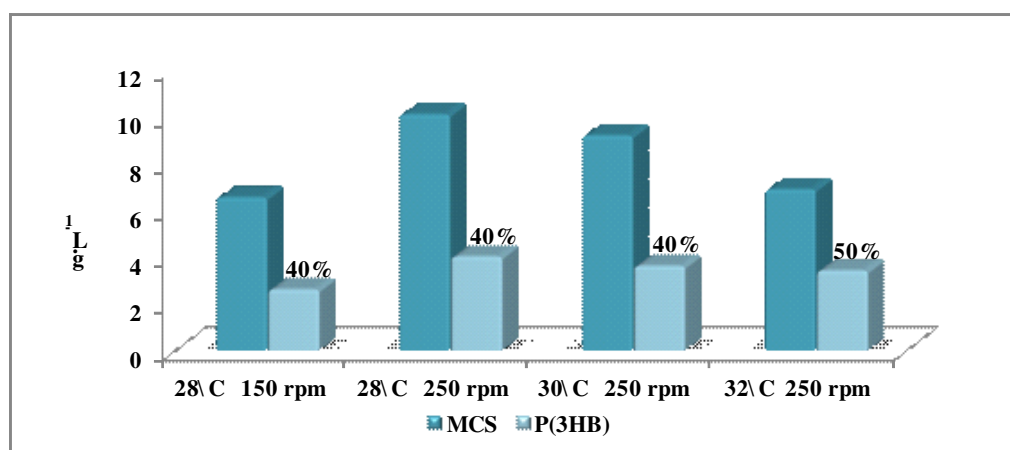


Figura 1. Produção de massa celular seca (MSC) e poli(3-hidroxi-butilato) na fase de inóculo utilizando diferentes combinações de temperatura e agitação em cultivo de 24 h. Média de três repetições. C.V (< 10%).

A Tabela 1 mostra os valores obtidos de massa molar, temperatura de fusão e grau de cristalinidade do P(3HB) produzido na fase do inóculo em diferentes condições de temperatura e agitação. Os valores encontrados de massa molar (M_w e M_n) para as amostras analisadas foram baixos. A massa molar do P(3HB) é afetada em função dos substratos e condições de cultivos [20] e dos métodos de extração [21, 22] que podem causar danos aos grânulos, levando a perda de massa molar do polímero. Existem várias aplicações nas áreas médicas e farmacêuticas (preparação de materiais de sutura, prótese ósseas e sistemas de liberação controlada de fármacos e copolímeros em bloco) para PHB com baixa massa molar [23].

A temperatura de fusão (T_m) das diferentes amostras analisadas de P(3HB) e do P(3HB) padrão (Sigma Aldrich®) foram inferiores aos valores encontrados na literatura, como $177,3 \text{ }^\circ\text{C}$ [24], $177,2 \text{ }^\circ\text{C}$ [25] e $172 \text{ }^\circ\text{C}$ para o P(3HB) padrão [26]. Esses valores de T_m foram semelhantes aos obtidos pela *Pseudomonas sp.* CMM43, T_m (1) $164 \text{ }^\circ\text{C}$ e T_m (2) $155 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando outro meio de cultivo, mas com a mesma fonte de carbono [11]. Os valores baixos de T_m podem estar relacionados com os contaminantes externos, como biomassa residual e elementos inorgânicos do cultivo ou com a técnica de extração utilizada, que podem afetar as propriedades térmicas do P(3HB) [27]. O P(3HB) extraído de *Bacillus cereus* apresentou uma T_m de $160,83 \text{ }^\circ\text{C}$ usando clorofórmio para extração [28].

O X_c obtido pelo P(3HB) produzido e o do P(3HB) padrão (Sigma Aldrich®) foram inferiores ao da faixa usual de valores de cristalinidade. No P(3HB) produzido por fermentação do caldo de cana usando *Alcaligenes eutrophus* foi verificado um X_c de 60% [29]. Os graus de cristalinidade obtidos nas amostras analisadas foram mais próximos aos

12° Congresso Brasileiro de Polímeros (12°CBPol)

encontrados no P(3HB) sintetizado por *Bacillus megaterium* cepa OU303A, que variaram entre 42 e 50 %, em função do substrato utilizado [30]. Esses resultados são desejáveis porque altos níveis de cristalinidade tornam o polímero rígido e quebradiço, resultando em propriedades mecânicas muito pobres [31].

Tabela 1. Valores obtidos de massa molar, temperatura de fusão e grau de cristalinidade do P(3HB) produzido na fase do inóculo em diferentes condições de temperatura e agitação.

Amostra	Mw (Da)	Mn (Da)	Tm 1 (°C)	Tm 2 (°C)	Xc (%)
A	4,6.10 ⁴	1,3.10 ⁴	156,5	143,8	38
B	4,7.10 ⁴	1,3.10 ⁴	158,1	140,6	30
C	4,7.10 ⁴	1,3.10 ⁴	158,0	148,3	45
D	3,8.10 ⁴	1,2.10 ⁴	156,4	150,6	42
P(3HB) padrão (Sigma Aldrich®)	2,5.10 ⁵	1,1.10 ⁵	167,2	146,9	40

(A) 28°C e 250 rpm, (B) 28°C e 150 rpm, (C) 30°C e 250 rpm e (D) 32°C e 250 rpm.

Mw – massa molar ponderal média

Mn – massa molar numérica média

Tm 1 – temperatura de fusão do primeiro ciclo de aquecimento

Tm 2 – temperatura de fusão do segundo ciclo de aquecimento

Conclusão

O maior acúmulo de P(3HB) por *Pseudomonas* sp. é em 24 horas de cultivo a 28°C e 250 rpm. O biopolímero produzido, independente da agitação e temperatura, apresenta baixa massa molar e baixa temperatura de fusão.

Agradecimentos

Agradecemos à Embrapa Clima Temperado, CNPq e UFPel pelo financiamento da pesquisa.

Referências

1. G. Brauneegg; I. G. Lefebvre; K.F. Genser. *J. Biotechnol.* 1998, 65, 127-161.
2. S. Chanprateep. *J. Biosci. Bioeng.* 2010, 110, 621-632.
3. S.Y. Lee. *Biotechnol. Bioeng.* 1996, 49, 1-14.
4. C.S.K. Reddy; R. Ghai; T. Rashmi; V.C. Kalia. *Bioresource Technol.* 2003, 87, 137-146.
5. F.O.M. Abreu; M.M.C. Forte; S.A. Liberman. *Polímeros.* 2006, 16, 71-78.
6. N. Jacquet; C.W. Lo; Y.H. Wei; H.S. Wu; S.S. Wang. *Biochem. Eng. J.* 2008, 39, 15-27.
7. S. Khanna; A.K. Srivastava. *Process Biochem.* 2005, 40, 607-619.
8. A. Arun; R. Arthi; V. Shanmugabalaji; M. Eyini. *Bioresource Technol.* 2005, 100, 2320-2323.
9. F. Dalcanton, Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
10. F.M. Kapritchkoff; A.P. Viotti; R.C.P. Alli; M. Zuccolo; J.G.C. Pradella; A.E. Maiorano; E.A. Miranda; A. Bonomi. *J. Biotechnol.* 2006, 122, 453-462.
11. A.G. Crochemore; M.L.T. Mattos; C.T. Vendruscolo; L.A.S. de Castro; A.S. Moreira. *Afr. J. Biotechnol.* 2012, 11, 15144-15149.
12. A. Jeanes. *Food Technol.* 1974, 28, 34-40.
13. G. Brauneegg; B. Sonnleitner; R.M. Lafferty. *Eur J. Appl. Microbiol.* 1978, 6, 29-37.
14. H. Brandl; R.A. Gross; R.W. Lenz; R.C. Fuller. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988, 54, 1977-1982.
15. L. Jianchun; B. Zhu; Y. He; Y. Inoue. *Polymer J.* 2003, 35, 384.
16. S. Gogolewski; M. Jovanovic; S.M. Perren; J.G. Dillon; M.K. Hughes. *J. Biomed. Mater. Res.* 1993, 27, 1135-1148.
17. D. Bourque; Y. Pomerleau; D. Groleau. *Appl. Microbiol. Biote.* 1995, 44, 367-376.
18. S.V. Reddy; M. Thirumala; T.V.K. Reddy; S.K. Mahmood. *World J. Microb. Biot.* 2008, 24, 2949-2955.
19. Y. Jiang; X. Song; L. Gong; P. Li; C. Dai; W. Shao. *Enzyme Microb. Tech.* 2008, 42, 167-172.
20. G.-Q. Chen; W.J. Page. *Biotechnol. Lett.* 1994, 16, 155-160.
21. Dawes EA, Senior PJ. *Adv. Microb. Physiol.* 1973, 10, 135-266.

12° Congresso Brasileiro de Polímeros (12°CBPol)

22. P.A. Holmes in *Development in Crystalline Polymers-2*. D.C. Bassett, Ed. Elsevier, London, 1988; 1-65.
23. Ga-er. Yu; R.H. Marchessault. *Polymer*, 2000, *41*, 1087–1098.
24. S-G. Hong; Y-C. Lin; C-H. Lin. *React. Funct. Polym.* 2008, *68*, 1516–1523.
25. S. Chaijamrus; N. Udpuay. *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal. Manuscript FP 07 030. Vol. X*.
26. Sigma-Aldrich. Disponível em: www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/363502?lang=pt®ion=BR. Acesso em: 24/04/2013.
27. K.J. Kim; Y. Doi; H. Abe. *Polym. Degrad. Stabil.* 2006, *91*, 769-777.
28. S.P. Valappil; S.K. Misra; A.R. Boccaccini; T. Keshavarz; C. Bucke; I. Roya. *J. Biotechnol.* 2007, *132*, 251-258.
29. A. El-Hadi; R. Schnabel; E. Straube; G. Muller; S. Henning. *Polym. Test.* 2002, *21*, 665-674.
30. S.V. Reddy; M. Thirumala; S.K. Mahmood. *World J. Microb. Biot.* 2009, *25*, 391-397.
31. L. Savenkova; Z. Gereberga; O. Muter; V. Nikolaeva; A. Dzene; V. Tupureina. *Process Biochem.* 2001, *37*, 719-722.