

## **BIOPLÁSTICOS: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO NO RENDIMENTO DE BIOFILMES DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)**

**BRUNA COI DOS SANTOS<sup>1</sup>; AMANDA AVILA RODRIGUES<sup>2</sup>; KARINE LASTE MACAGNAN<sup>3</sup>; CACIARA SOUZA DA SILVA<sup>4</sup>; ANGELITA DA SILVEIRA MOREIRA<sup>5</sup>; CLAIRE TONDO VENDRUSCOLO<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>UFPeI, Graduanda em Biotecnologia – [bruna\\_coi@hotmail.com](mailto:bruna_coi@hotmail.com)

<sup>2</sup>UFPeI, Doutoranda PPG Biotecnologia – [amanda.bio2005@gmail.com](mailto:amanda.bio2005@gmail.com)

<sup>3</sup>UFPeI, Mestranda PPG Biotecnologia – [karinemacagnan@hotmail.com](mailto:karinemacagnan@hotmail.com)

<sup>4</sup>UFPeI, Graduanda em Biotecnologia – [caciara.souza@yahoo.com.br](mailto:caciara.souza@yahoo.com.br)

<sup>5</sup>UFPeI, Professora CCQFA, PPGCTA, PPGB – [angelitadasilveiramoreira@gmail.com](mailto:angelitadasilveiramoreira@gmail.com)

<sup>6</sup>UFPeI, Professora CCQFA, PPGCTA, PPGB – [calire.vendruscolo@pq.cnpq.br](mailto:calire.vendruscolo@pq.cnpq.br)

### 1. INTRODUÇÃO

Bioplásticos são eficientemente obtidos a partir de bioprocessos. Tais processos fermentativos empregam micro-organismos específicos para conversão de substratos, preferencialmente renováveis e os mais econômicos possíveis, a biopolímeros com elevada produtividade (PIEMOLINI, 2004).

Poli(3-hidroxitirato) [P(3HB)] é um poliéster, da família dos polihidroxicanoatos (PHAs), bastante estudado e comercializado nacional e internacionalmente (CHANPRATEEP, 2010). Por ser um bioplástico rapidamente biodegradável, biocompatível e por conter características termoplásticas e mecânicas similares à alguns plásticos petroquímicos, o P(3HB) é considerado um potencial substituto aos plásticos convencionais, que devido à amplitude de suas aplicações e degradabilidade lenta, geram graves problemas ambientais (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006). Os biopolímeros mais utilizados na produção de plásticos biodegradáveis são, portanto, o P(3HB) e seus copolímeros (IZUMI; TEMPERINI, 2010).

Mais de 300 micro-organismos são tidos como sintetizadores de PHAS, entretanto, para que sejam efetivamente empregados em bioprocessos de obtenção desses bioprodutos os micro-organismos devem acumular alta concentração de polímero em um período relativamente curto, em cultivos com alta densidade celular. Tais fatores resultarão em redução dos custos de produção do bioplástico (CHANPRATEEP, 2010; LEE, 1996).

O acúmulo do polímero ocorre na forma de inclusões de poliésteres insolúveis no citoplasma bacteriano, podendo alcançar aproximadamente 90% do peso celular e servindo como reserva de energia e carbono para o micro-organismo (KUNASUNDARI; SUDESH, 2011; STEINBUCHEL; FUCHTENBUSCH, 1998). O bioprocessos para obtenção de P(3HB) é dividido em duas fases: a primeira fase é a de multiplicação celular, e a segunda fase a de produção propriamente dita. Na primeira fase, também chamada de inóculo, objetiva-se a obtenção de cultivos com alta densidade celular para que o acúmulo seja elevado na segunda etapa. Na fase de produção, para que ocorra a síntese do P(3HB), o meio de produção deve apresentar, normalmente, condições desfavoráveis de crescimento (exaustão de nutrientes como nitrogênio, fósforo, enxofre, oxigênio) e excesso de carbono (LU; TAPPEL; NOMURA, 2009; STEINBUCHEL; FUCHTENBUSCH, 1998).

Através deste trabalho objetivou-se verificar a influência da concentração de inóculo utilizada na etapa de produção no rendimento de biofilmes de Poli-3hidroxibutirato.

## 2. METODOLOGIA

O micro-organismo utilizado foi um bacilo Gram -, isolado de solo da região Sul do Rio Grande do Sul e cedido pelo Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, em fase de caracterização molecular e previamente selecionado como produtor de P(3HB) por MACAGNAN et al. (2012).

Os inóculos foram obtidos por cultivos em *Erlenmeyers* de 500 mL contendo meio 160 mL de *Yeast Malt* (YM) e 40 mL de pré-inóculo constituído por suspensão bacteriana e YM. Os frascos foram mantidos em incubador agitador orbital por 24 h, 150 rpm a 28 °C.

A fase de produção foi conduzida em *Erlenmeyers* de 500 mL contendo meio mineral F4 (OLIVEIRA, 2010) e 10 ou 20% de inóculo. Os cultivos foram mantidos em incubador agitador orbital a 28 °C, 200 rpm com coletas de caldo fermentado em 24, 48 e 72 h.

As alíquotas foram centrifugadas a 10.000 × g, por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e biomassa lavada com 20 mL de solução salina 0,89 %. As amostras foram centrifugadas novamente a 10.000 × g, por 10 min a 4 °C. A biomassa foi transferida para placas em estufa, e seca a 56 °C. A massa celular seca (MCS) foi macerada e utilizada na extração do P(3HB).

Os biofilmes de P(3HB) foram obtidos por extração com clorofórmio a partir da MCS [40:1 (v/m)], sob agitação de 1 h (58 °C), seguida de filtração rápida em papel e lenta evaporação em placas de Petri cobertas (DALCANTON, 2006 modificado por MACAGNAN, 2013). Após secos, os biofilmes foram pesados para cálculo do rendimento em relação à MCS utilizada na extração. Os resultados de rendimento são expressos em %.

Os biopolímeros produzidos tiveram sua identidade química confirmada por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) em espectrômetro Shimadzu® modelo IR Prestige 21. Amostras de 1 mg dos biofilmes obtidos e do padrão de P(3HB) Sigma® foram dissolvidas em 1 mL de clorofórmio e dispostas em pastilhas de KBr e os picos adquiridos dentro de uma faixa de 4500-500cm<sup>-1</sup> (CROCHEMORE, 2010, modificado).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de todas as amostras de MCS foram obtidos biofilmes de aspecto liso com bordas rugosas, coloração branca e textura flexível, como os relatados na literatura (CROCHEMORE, 2010; DALCANTON, 2006; MACAGNAN, 2013).

Na Figura 1 estão dispostos os resultados de rendimento dos cultivos com 10 % e com 20 % de inóculo em 24, 48 e 72 h. O cultivo com 20% de inóculo teve rendimentos de 17,32; 11,76 e 6,48 % em 72, 48 e 24 h, respectivamente, valores superiores aos resultados do cultivo com 10 % (10,97; 10,38 e 4,39 % em 72, 48 e 24 h, respectivamente). Para ambos os cultivos o maior rendimento foi em 72 h. Observou-se, portanto, uma influência diretamente proporcional da concentração de inóculo e do tempo de cultivo no rendimento dos bioplásticos.

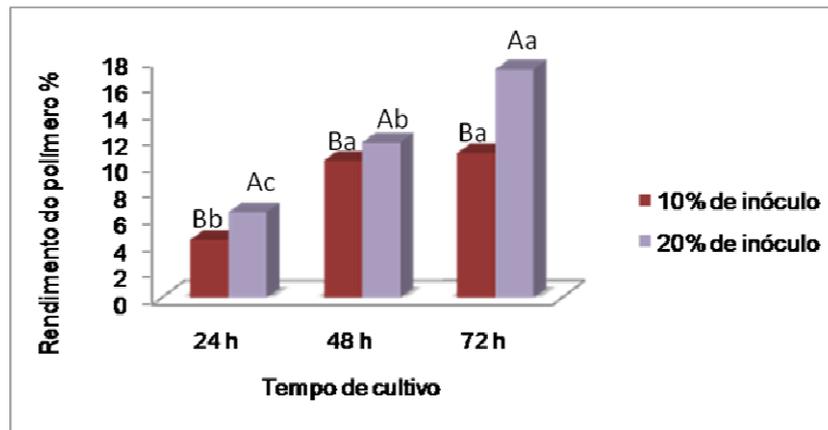


Figura 1: Rendimento (%) dos cultivos com 10 e com 20 % de inóculo em 24, 48 e 72 h. Letras maiúsculas distintas em colunas de mesmo tempo de cultivo significa que há diferença estatística significativa entre os cultivos com 10 e 20% de inóculo. Letras minúsculas distintas em colunas de mesma cor significa que há diferença estatística significativa entre os tempos de cultivo para mesma concentração de inóculo. Diferença significativa por teste de Tukey  $p < 0,05$ .

Os biofilmes formados a partir do polímero extraído tiveram a identidade química confirmada por Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR). As principais bandas obtidas foram analisadas e confrontadas com as bandas obtidas para o padrão P(3HB) Sigma. Próximo a  $3000\text{cm}^{-1}$  foram observadas bandas de intensidade média correspondentes a deformação axial (estiramento) da ligação C-H nos grupos metil e metileno. A deformação axial da ligação C=O no grupo éster gerou a presença de bandas em  $1721\text{-}1727\text{cm}^{-1}$ . A deformação assimétrica da ligação C-H nos grupos metileno é representada pela banda média em  $1454\text{-}1459\text{cm}^{-1}$ , enquanto a banda média encontrada em  $1378\text{cm}^{-1}$  é equivalente a esta deformação nos grupos  $\text{CH}_3$ . Próximo a  $1281\text{cm}^{-1}$  observou-se um banda de intensidade forte devido a deformação axial da ligação C-O no grupo éster. E a série de bandas intensas situadas entre  $1250\text{-}950\text{cm}^{-1}$  também correspondem ao estiramento da ligação C-O do grupo éster. As bandas características identificadas no biopolímero obtido neste estudo estão de acordo com os reportados na literatura por CROCHEMORE (2010), MACAGNAN (2013) e LUGG (2008) para P(3HB).

#### 4. CONCLUSÕES

Obteve-se bioplásticos em todos os cultivos realizados. Os biofilmes formados tiveram a identidade química confirmada como P(3HB). O rendimento foi diretamente proporcional ao tempo de incubação e a concentração de inóculo utilizada na fase de produção do bioprocessamento. Entretanto, ainda se fazem necessários mais estudos para ajustar os parâmetros operacionais de modo que a produtividade seja elevada.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 621-632, 2010.
- CROCHEMORE, A.G. **Bioprospeção de espécies de Pseudomonas isoladas de solo de várzea subtropical do Rio Grande do Sul para produção de**

- Polihidroxitirato**. Dissertação (Mestrado em ciências) PPGB, UFPel, Pelotas, 2010.
- DALCANTON, F. **Produção, Extração e Caracterização de Poli(3-Hidroxitirato) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos**. Florianópolis, 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia de alimentos) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina.
- FRANCHETTI, S. M.; MARCONATO, J. C. Biodegradable polymers - A partial way for decreasing the amount of plastic waste. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.
- IZUMI, C. M. S.; TEMPERINI, M. L. A. FT-Raman investigation of biodegradable polymers: Poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). **Vibrational Spectroscopy**, v. 54, n. 2, p. 127-132, 2010.
- KUNASUNDARI, B.; SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. **Express Polymer Letters**, v. 5, n. 7, p. 620-634, 2011.
- LEE, S. Y. Plastic bacteria - Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Trends Biotechnology**, v. 14, p. 431-438, 1996.
- LU, J. N.; TAPPEL, R. C.; NOMURA, C. T. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). **Polymer Reviews**, v. 49, n. 3, p. 226-248, 2009.
- LUGG, H., SAMMONS, R. L., MARQUIS, P. M., HEWITT, C. J., YONG, P., PATERSON-BEEDLE, M., REDWOOD, M. D., STAMBOULIS, A., KASHANI, M., JENKINS, M., MACASKIE, L. E., Polyhydroxybutyrate accumulation by a *Serratia* sp. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 481-491, 2008.
- MACAGNAN, K.L. RODRIGUES, A.Á.; MOREIRA, A.S.; MOURA, A.B.; VENDRUSCOLO, C.T. Bioprospecção de bactérias potencialmente produtoras de polihidroxiálcanoatos. In: **XXI CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**, Pelotas, 2012, Anais do XXI Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- MACAGNAN, Karine Laste. **Extração e caracterização de poli(3-hidroxitirato) produzido por *Ralstonia solanacearum***. 2013. 48f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- OLIVEIRA, C. **Produção de polihidroxitirato: bioprospecção de *Beijerinckia* sp. da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros do CDTec - UFPel**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – PPGB, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.
- PIEMOLINI, L. T. **Modelagem estrutural da PHA sintase de *C. violaceum* para estudos de mutação sítio-dirigida**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, UFSC, Florianópolis.
- STEINBUCHER, A.; FUCHTENBUSCH, B. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends Biotechnol.**, v. 16, n. 10, p. 419-427, 1998.