

## POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) ACUMULADO POR *PSEUDOMONAS* sp. CMM43 EM FASE DE INÓCULO ALTERANDO CONDIÇÕES DE AGITAÇÃO E TEMPERATURA

Ane G. Crochemore<sup>1\*</sup>, Claire T. Vendruscolo<sup>4</sup>, Maria Laura T. Mattos<sup>2</sup>, Angelita da S. Moreira<sup>4</sup>, Maria do Carmo R. Peralba<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil

<sup>3</sup>Instituto de Química- UFRGS

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

**Resumo**—Polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres armazenados por diversas bactérias e são totalmente biodegradáveis, biocompatíveis e podem ser produzidos a partir de fontes renováveis. O poli(3-hidroxitirato), 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<sup>-1</sup>, 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-hidroxitirato), *Pseudomonas*, massa molar, temperatura de fusão

### Introdução

Polihidroxicanoatos (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-hidroxitirato), 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 objetivo avaliar o acúmulo de P(3HB) na fase de inóculo da *Pseudomonas* sp. CMM43 e caracterizar o biopolímero quanto à massa molar e às propriedades térmicas.

### Parte Experimental

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

**Preparo do inóculo:** O inóculo foi preparado 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. Foram 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 %. O precipitado foi colocado 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):** as amostras de MCS (0,02 g) foram submetidas à metanólise [13, 14] e após analisadas por cromatografia gasosa. Foi utilizado detector de ionização em chama (FID), o gás de arraste foi o hidrogênio (30 mL.min<sup>-1</sup>) e a rampa de temperatura utilizada foi 60 °C por 1 min, com aumento de 11 °C.min<sup>-1</sup> até atingir a temperatura de 200 °C, que foi mantida por 4 min. O volume injetado foi de 1 µL, manualmente.

*Extração do polímero:* em tubo fechado, a partir de MCS, utilizando clorofórmio (10 mL.g<sup>-1</sup>), aquecimento a 58 - 59 °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):* as amostras foram solubilizadas em 2 mL de clorofórmio e filtradas antes da injeção. O solvente utilizado foi THF em uma vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup>.

*Análise térmica – Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC):* Foi utilizada uma atmosfera de nitrogênio a uma taxa de 20 mL.min<sup>-1</sup>. As amostras foram submetidas às seguintes condições de teste: isotérmica de 20 °C durante 1 min, primeiro ciclo de aquecimento de 20 a 200 °C a uma taxa de 10 °C.min<sup>-1</sup>, isotérmica 200 °C durante 5 min; ciclo de arrefecimento de 200 a 20 °C a uma taxa de 10 °C.min<sup>-1</sup>; isotérmica de 20 °C durante 5 min, segundo ciclo de aquecimento de 20 a 200 °C a uma taxa de 10 °C.min<sup>-1</sup>. Para avaliar o efeito da história térmica na obtenção da amostra foram observados valores de temperatura de fusão (T<sub>m</sub>) do primeiro ciclo de aquecimento. No entanto, a fim de eliminar a história térmica do material, a T<sub>m</sub> foi recolhida do segundo ciclo de aquecimento. O grau de cristalinidade (X<sub>c</sub>) foi determinado a partir da entalpia de fusão da amostra (ΔH<sub>m</sub>) e a entalpia de fusão do P(3HB) puro cristalino (ΔH<sub>m</sub> = 146 J / g) [15, 16].

## Resultados e Discussão

Os resultados de P(3HB), acumulado em 24 h e da MCS estão expressos na Fig.1 e são provenientes das 4 condições de cultivo testadas para o preparo do inóculo, alterando as variáveis temperatura, agitação e aeração. A cepa CMM43 de *Pseudomonas sp.* foi capaz de acumular P(3HB) a partir de sacarose como fonte de carbono, fato incomum para o gênero. Significativamente, os níveis de P(3HB) na célula em 24 h de cultivo chegaram a 50 %, sendo que essa quantidade de polímero, geralmente, só é alcançada com um maior tempo de cultivo, de 48 a 96 h [17, 18, 19]. O maior percentual de acúmulo (50 %) foi conseguido no cultivo nas condições de 32°C e 250 rpm, entretanto os maiores valores de MCS, de 10,4 g.L<sup>-1</sup> e de P(3HB), de 4 g/L<sup>-1</sup> foram alcançados utilizando a temperatura de 28 °C e a agitação 250 rpm.

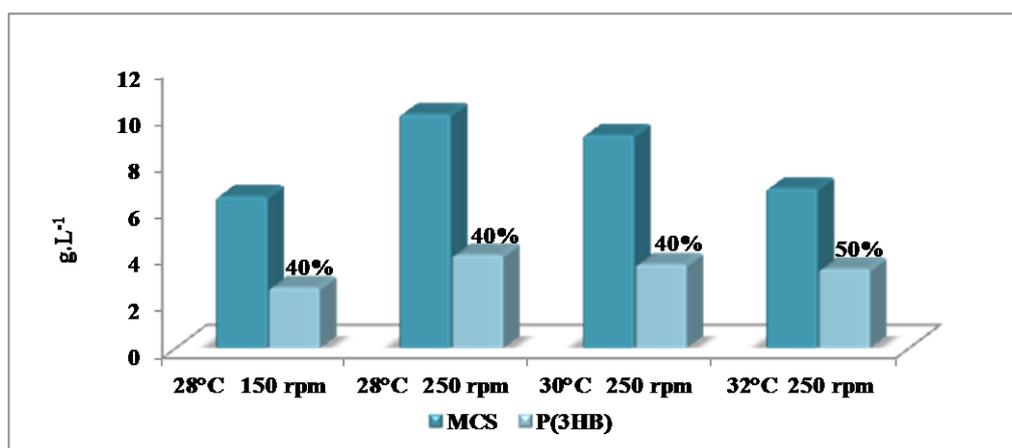


Figura 1. Produção de massa celular seca (MCS) e poli(3-hidroxibutirato) na fase de inóculo utilizando diferentes combinações de temperatura e agitação em 24 h.

A Tabela 1 mostra os valores obtidos na análise de GPC, caracterizando a massa molar e na análise de DSC, indicando as propriedades térmicas do P(3HB) produzido.

Tabela 1. Massa molar e propriedades térmicas do P(3HB).

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

(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.

Os valores encontrados de Mw e Mn para as amostras são baixos, comparados aos relatados na literatura pertinente, podendo estar relacionados aos substratos e condições de cultivo empregadas, que podem afetar a massa molar do P(3HB) [20], e aos métodos de extração, que causam graves danos aos grânulos, levando a perda de massa molar do polímero [21, 22]. Os valores de polidispersão (Mw/Mn) demonstram que os polímeros obtidos apresentam moléculas de tamanhos variados. A massa molar elevada resulta em um P(3HB) com uma aplicação industrial menos limitada, porém, algumas aplicações específicas nas áreas médicas e farmacêuticas, como para preparação de materiais de sutura, prótese ósseas e sistemas de liberação controlada de fármacos e copolímeros em bloco, necessitam de um PHB com baixa massa molar [23].

A temperatura de fusão das diferentes amostras de P(3HB) obtidas e do P(3HB) padrão (Sigma Aldrich®) são inferiores aos valores encontrados na literatura, tais como 177,3 °C [24], 177,2 °C [25] e 172 °C para o P(3HB) padrão, não sendo informado se esta Tm se deve ao 1° ou 2° ciclo de análise [26]. Esses valores podem estar relacionados com contaminantes externos, como biomassa residual e elementos inorgânicos do processo de fermentação, que podem afetar as propriedades térmicas do P(3HB) [27] ou com técnica de extração utilizada. O P(3HB) extraído de *Bacillus cereus* apresentou uma Tm de 160,83 °C usando clorofórmio para extração [28]. Porém, esses valores de Tm estão de acordo com os obtidos pela mesma cepa *Pseudomonas sp.* CMM43, Tm (1) 164 °C e Tm (2) 155 °C utilizando outro meio de cultivo, mas com a mesma fonte de carbono [11].

O Xc obtido pelo P(3HB) produzido e o do P(3HB) padrão (Sigma Aldrich®) foram inferiores ao da faixa usual de valores de cristalinidade. Para o P(3HB) da Copersucar/Brasil, produzido por fermentação do caldo de cana usando *Alcaligenes eutrophus* foi verificado um Xc de 60% [29]. Os graus de cristalinidade obtidos nas amostras foram mais próximos aos encontrados no P(3HB) sintetizado por *Bacillus megaterium* cepa OU303A, que variaram entre 42 e 50 %, de acordo com o 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].

## Conclusão

A *Pseudomonas sp.* CMM43 acumula P(3HB) em curto período de cultivo, iniciando este acúmulo na fase de inóculo, onde a melhor combinação testada foi a de 28°C e 250 rpm. O biopolímero produzido, independente da agitação e temperatura utilizadas, apresenta baixa massa molar e baixa temperatura de fusão, parâmetros apropriados para várias aplicações nas áreas médicas e farmacêuticas preparação de determinados enxertos e copolímeros em bloco.

## Agradecimentos

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

## Referências

1. G. Braunegg; 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.

## 12° Congresso Brasileiro de Polímeros (12°CBPol)

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. Braunegg; 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. Biotechnol.* 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.
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. Udpuy. *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&region=BR](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/363502?lang=pt&region=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. Roy. *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.