

PLÁSTICO BIODEGRADÁVEL: SELEÇÃO DE CEPAS DE *Beijerinckia* POTENCIALMENTE PRODUTORAS DE PHB ; MATÉRIA PRIMA DOS BIOPLÁSTICOS.

OLIVEIRA, Cláudio Fernando¹; VENDRUSCOLO, Claire Tondo¹; MOREIRA, Angelita da Silveira¹

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - UFPel, Campus Universitário, s/nº, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: fernandoselvar@yahoo.com

1. INTRODUÇÃO

Os plásticos tem papel fundamental na sociedade moderna, sendo utilizados de inúmeras formas. Além disso tem se desenvolvido diversas aplicações para as quais, anteriormente eram usados outros materiais, como metais, vidro, madeira e papel, etc., ou seja, os plásticos possuem não apenas um grande mercado, como também representam um mercado em crescimento. Devido ao fato de algumas aplicações dos plásticos serem de descartabilidade muito rápida, como por exemplo o seu uso em embalagens associado à grande dificuldade de degradação destes materiais no meio ambiente, o uso indiscriminado dos plásticos tem despertado grande preocupação (Gómez e Bueno Netto, 2001).

O plástico convencional apresenta velocidade de degradação extremamente baixa, fato que pode ocasionar sérios problemas relativos à manutenção do equilíbrio ambiental. A grande quantidade de lixo plástico que se acumula dia após dia, bem como o esgotamento das fontes de combustíveis fósseis, levaram à realização de estudos de gerenciamento e diminuição do volume de lixo sólido, como a reciclagem de produtos constituídos de plásticos, e ainda à produção de materiais plásticos biodegradáveis, mais compatíveis com o pensamento de preservação ambiental, a partir de fontes renováveis de carbono. Portanto, estes novos materiais devem possuir as propriedades desejáveis dos plásticos convencionais, serem produzidos a partir de substratos renováveis e ainda apresentarem degradação rápida e completa quando descartados no meio ambiente (Piemolini, 2004; Sotero, 2000).

Os plásticos biodegradáveis, ou bioplásticos, são polímeros que são degradados completamente ao ataque microbiano em um curto espaço de tempo, sob condições apropriadas do meio ambiente. Sua degradação é realizada, principalmente, pela atividade enzimática dos microrganismos num período entre doze a dezoito meses (Lafferty et al, 1988; Byrom, 1990; Krupp & Jewell, 1992).

Dentre os biopolímeros em desenvolvimento estão os polihidroxialcanoatos (PHA's). Os PHA's são os únicos polímeros totalmente biodegradáveis, de origem microbiana. São produzidos por inúmeras bactérias, sob condições apropriadas de

cultivo. Fisiologicamente são materiais de reserva energética, geralmente acumulados intracelularmente pelas bactérias nativas produtoras, sob limitação de um nutriente essencial e na presença suficiente da fonte de carbono. Estes biopolímeros apresentam características muito interessantes, como propriedades termoplásticas, biodegradabilidade e biocompatibilidade, o que os tornam de grande aplicabilidade (Rodrigues, 2005).

O principal representante dos PHAs é o poli(β -hidroxibutirato) (PHB), semelhante ao polímero sintético polipropileno (PP), em propriedades físicas e mecânicas (Holmes, 1985).

Segundo Bergeys's (1984) e Lee (1996) cepas pertencentes aos gêneros *Beijerinckia* e *Azotobacter* são consideradas potencialmente capazes de produzir PHB. Desta forma este trabalho teve como objetivo selecionar cepas potencialmente produtoras de PHB e determinar para a cepa mais promissora as condições operacionais para a produção de poli(β -hidroxibutirato).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente partiu-se de 03 cepas de bactérias *Beijerinckia sp.* Pertencente a coleção do Laboratório de Biopolímeros do Centro de Biotecnologia da UFPel, T125, 7070 e C31. Na triagem as cepas foram repicadas em meio YM sólido, com a seguinte composição g.L⁻¹: glicose 9,0; extrato de levedura 2,7; extrato de malte 2,7; peptona 9,0; ágar 15,0; o pH do meio foi ajustado para 6,5 e esterilizado durante 15 min a 121°C. As bactérias foram incubadas durante 48h na temperatura de 28°C; após, amostras foram coradas com Sudan Black e visualizadas em Microscópio Óptico. (Lelliot, R. A. & Stead, D. E. 1987).

A cepa C31 foi cultivada em meio líquido para posterior análise por Microscopia Eletrônica de transmissão (MET). A fermentação foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 250mL, em duas etapas, sendo a inicial de obtenção do inóculo e a segunda de produção de PHB. Inicialmente, 10mL do meio YM líquido modificado, inoculados com 22.10⁶ UFC.mL⁻¹ foram incubados em shaker a 30°C e 150 rpm por 24h. Após, adicionou-se 40mL de meio contendo (g.L⁻¹): glicose 40,0; uréia 3,0; KH₂ PO₄ 0,9 e 1mL da solução concentrada de oligoelementos. Os frascos foram incubados a 30°C e 180rpm durante 48h. Os caldos fermentados foram centrifugados a 4.000 rpm durante 15 min; os sobrenadantes foram desprezados e as células ressuspensas em solução salina e novamente centrifugadas.

Amostras das células do cultivo em meio líquido foram convenientemente preparadas e analisadas por MET pelo pesquisador Luis Antonio Suita de Castro na EMBRAPA – CPACT.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A triagem realizada com o teste Sudan Black mostrou que apenas a cepa C31 mostrou-se promissora nas condições testadas. O teste Sudan Black é específico para detecção de corpos lipofílicos intracelulares. Resultado positivo significa que possivelmente a bactéria, quando submetida a um meio e condições de aeração e temperatura adequadas, possa acumular reservas intracelulares de lipídeos, sendo normalmente PHB.

Fez-se um registro fotográfico da microscopia óptica da cepa C31 *Beijerinckia sp* no meio e condições descritas acima:

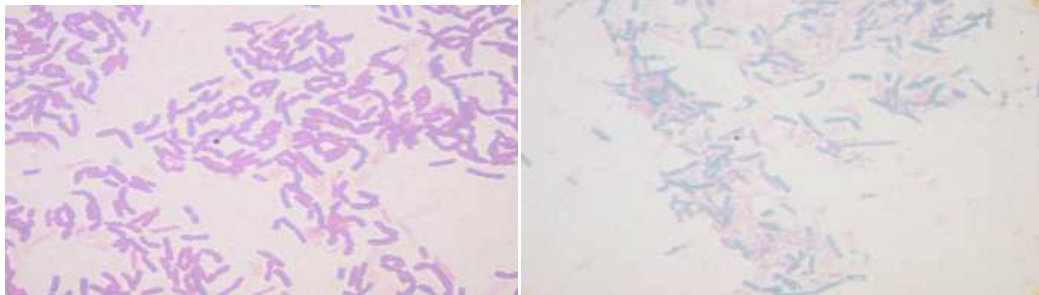


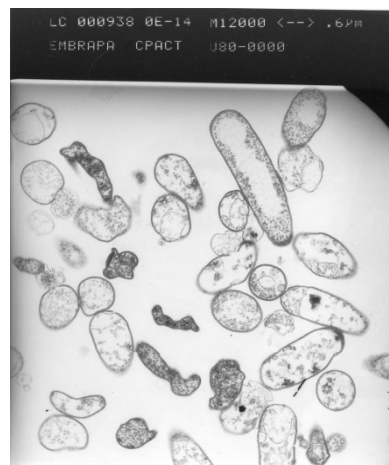
Figura 1A (esq.) e 1B (dir): *Beijerinckia sp.*, coradas com Sudan Black.

Células obtidas no cultivo em meio líquido foram analisados por MET .

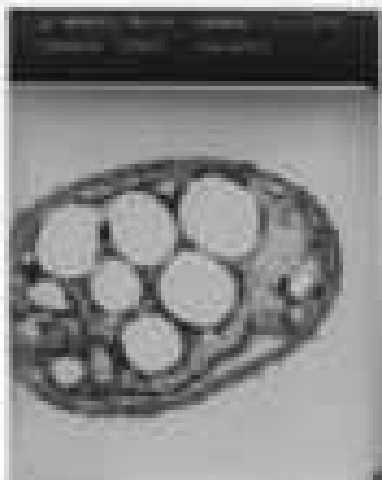
Muitos autores, entre eles Dalcanton (2006), Anderson, & Dawes (1990), utilizaram MET para obter eletrofotomicrografias para visualização e/ou acompanhamento da evolução das reservas lipofílicas intracelulares. Embora possam se obter muito mais informações através desta técnica, no presente trabalho também a MET foi utilizada com o propósito de observar a formação de grânulos lipofílicos. Os resultados podem ser visualizados nas fotomicrografias 2, 3, 4 e 5.



Fotomicrografia 2 -cepa T125



Fotomicrografia 3 -cepa 7070



Fotomicrografia 4 -cepa C31



Fotomicrografia 5 -cepa C31

4. CONCLUSÕES

Observou-se que os resultados MET não são conclusivos para cepa T125 e

negativos para cepa 7070. No entanto, na cepa C31 pode ser observada a presença de grânulos ou reservas com preenchimento de mais de 50% da célula e isto é um bom indicativo de que estes grânulos intracelulares possam ser PHB. Alguns tipos de PHB, como o P(3HB,) apresenta grânulos típicos. Pôde-se observar grande semelhança entre os grânulos presentes na cepa C31 e os grânulos de P(3HB) observados por Sudesh et al., 2000. Portanto, o meio e condições operacionais utilizadas foram considerados eficiente para produção de reservas tipo lipofílicas, que provavelmente são PHB.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICAS

- ANDERSON, A.J., DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial use of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiological reviews**, v.54, n.4, p 450-472, 1990
- BYROM, D. Industrial production of copolymers from *Alcaligenes eutrophus*. In: Dawes, E. A (ed.). **Novel Biodegradable Microbial Polymers**, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, Netherlands. p. 113-117, 1990.
- DALCANTON, F. **Produção, extração e caracterização de poli(3- hidroxibutirato) por *Rasltonia eutropha* em diferentes substratos**. Florianópolis. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
- Gomez, J. G. C.; Bueno Netto, C. L.; Rev. Bras. Eng. Quím. 1997, 17, 24.
- KRUPP, L. R., W. J JEWELL. Biodegradability of modified plastic filmes in controlled biological environments. **Environ. Sci. Technol**, v.26, p. 193-198, 1992.
- LEE, S.Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnol. Bioeng**,v. 49, p.1-14, 1996b.
- Lelliot, R. A. & Stead, D. E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Palo Alto, Blackwell, 1_ ed., 216 p. (páginas 171-172)
- LAFFERTY , R. M., KORSATKO,B. ,W. KORSATKO. Microbial production of poly-&-hydroxybutyric acid. In **Biotechnology**, v. 6b (66), p. 135-176, 1988.
- HOLMES,P.A .Applications of PHB – A microbially produced biodegradable Thermoplastic. **Physical Tchenology**, v.16,p 32-36, 1985.
- PIEMOLINI, L. T. **Modelagem estrutural da PHA sintase de *Chromobacterium violaceum* para estudos de mutação sítio-dirigida**. Florianópolis, 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Universidade Federal de Santa Catarina.
- SOTERO, A.P. Plásticos biodegradáveis trazem melhoria ambiental. **Jornal de Plásticos**, v.43. ago. 2000.