

A Biodegradabilidade da Blenda de Poli(β -Hidroxitirato-co-Valerato)/Amido Anfótero na Presença de Microrganismos

Nadjane S. Coelho, Yêda M. B. Almeida, Glória M. Vinhas
Departamento de Engenharia Química, UFPE

Resumo: O crescimento do consumo de plásticos vem gerando grandes problemas ambientais, pois um polímero, uma vez descartado no ambiente, necessita de mais de cem anos para se degradar. O plástico ideal deve apresentar propriedades industriais desejáveis e, ao mesmo tempo ser degradável num período considerado satisfatório. Busca-se desenvolver plásticos com boas propriedades para embalagens e que possam ser biodegradados quando descartados ao ambiente. Neste trabalho avaliamos a biodegradação da blenda do copolímero poli(β -hidroxibutirato-co-valerato), PHB-HV, que é um termoplástico natural, biodegradável e biocompatível, e do amido anfótero, na proporção de 75 e 25% m/m, respectivamente. Os resultados foram obtidos através do teste de Sturm, uma metodologia para a avaliação da biodegradação na presença de uma cultura mista dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Talaromyces wortmannii*. Os resultados evidenciam a biodegradação da blenda em função do tempo, de acordo com os resultados do teste de Sturm, com o aparecimento de grupos carboxílicos terminais. Foi detectado também o aparecimento de nova simetria cristalina na estrutura polimérica.

Palavras-chave: PHB-HV, biodegradação, microrganismos.

The Biodegradation of Polyhydroxybutyrate-co-valerate/Amphiprotic Starch in the Presence of Microorganisms

Abstract: The increasing consumption of plastics has generated environmental problems because it takes more than a hundred years for a discarded polymer to degrade. The ideal plastic should present desirable industrial properties and be degradable within a satisfactory time period. Researches is conducted to plastics with good properties for packaging, but that are biodegradable when discarded to the environment. In this work we evaluated the biodegradation of the blend of the copolymer poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate, PHB-HV, which is a natural, biodegradable and biocompatible thermoplastic, and of the starch amphiprotic, in the proportion of 75 and 25% m/m, respectively. The results were obtained through the Sturm test, a methodology for the evaluation of biodegradation in the presence of a mixed culture of *Phanerochaete chrysosporium* and *Talaromyces wortmannii* fungi. The results pointed to biodegradation of the blend as a function of the time, with the appearance of terminal carboxylic groups. In addition, a new crystalline symmetry was observed in the polymeric structure.

Keywords: PHB-HV, biodegradation, microorganisms.

Introdução

O uso dos polímeros tem se tornado cada vez mais frequente na sociedade moderna. Devido às suas propriedades e facilidade no processamento, torna-se um material adequado para ser usado nas mais diversas aplicações. Os polímeros são materiais inertes e não degradáveis, higiênicos, convenientes e confortáveis, no entanto, do ponto de vista ambiental, apresentam uma propriedade indesejável: a durabilidade. Pelo fato de algumas de suas aplicações serem de descartabilidade muito rápida, associado à grande dificuldade de degradação no meio ambiente, eles têm despertado forte preocupação nos dias atuais^[2].

O desenvolvimento de novos materiais plásticos que sejam estáveis durante seu tempo de uso e biodegradável, especialmente por ação de microrganismo, quando descartado

ao meio ambiente, é uma alternativa mais promissora para minimizar a poluição derivada dos plásticos.

Os poliésteres são polímeros biodegradáveis contendo grupos funcionais ésteres em sua estrutura. A principal razão é que as estruturas desses materiais são facilmente atacadas por fungos através de hidrólise^[9]. Esses polímeros podem oferecer uma grande variedade de propriedades, desde plásticos rígidos altamente cristalinos a polímeros dúcteis. As propriedades terapêuticas descobertas em certos poliésteres possibilitaram sua produção em escala industrial, principalmente na forma de fios para suturas e cápsulas de comprimidos. Entre os polímeros biodegradáveis o mais conhecido é o poli(β -hidroxibutirato) (PHB) e seu copolímero poli(β -hidroxibutirato-co-valerato), ambos são produzidos por um processo de fermentação bacteriana, sendo ainda um processo relativamente caro^[4,13]. Esses plásticos levam

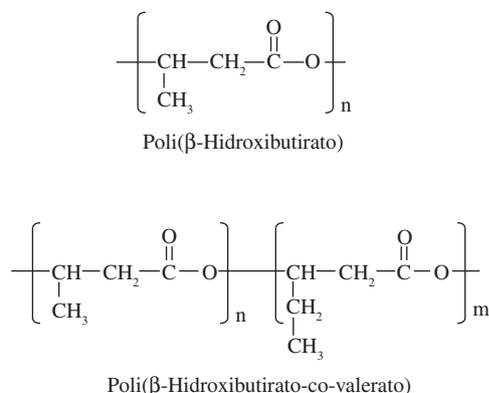


Figura 1. Estruturas químicas.

de um a dez anos para se degradar no ambiente, enquanto que o plástico de origem petroquímica pode levar centenas de anos para se degradar^[12].

Assim como no caso do PHB, o processo de produção do PHB-HV é bacteriano. Os microrganismos alimentam-se de açúcares (sacarose, glicose, etc.) e os transformam em grânulos (pequenas bolinhas) intracelulares que são, na verdade, poliésteres. Para as bactérias, esses poliésteres (o plástico biodegradável) servem como uma reserva de energia, semelhante à reserva de gordura nos mamíferos. As etapas seguintes do processo produtivo são a extração e purificação do polímero acumulado dentro das bactérias^[14]. Para o PHB-HV sua produção diferencia do PHB pela adição concomitante de ácido propiônico ao meio de cultivo bacteriano. No final da fermentação é formado o copolímero do hidroxibutirato com segmentos aleatórios de hidroxivalerato (Figura 1), a concentração de valerato no copolímero pode causar uma variação no tempo de degradação, de algumas semanas a vários anos^[12].

A principal desvantagem na produção desses poliésteres são os altos custos de produção, limitando um pouco suas aplicações. Estudos na produção de plásticos biodegradáveis constituídos por blenda de amido e poliésteres como o poli(β -hidroxibutirato-co-valerato)/amido é uma boa alternativa na produção de plásticos totalmente biodegradáveis com custos mais baixos e propriedades de interesse.

Este artigo tem como objetivo principal avaliar as propriedades das blendas de PHB-HV/amido modificado antes e após a biodegradação por culturas mistas dos fungos *Talaromyces wortmannii* e *Phanerochaete chrysosporium*.

Experimental

Materiais

Microrganismos

Foram utilizadas duas linhagens de fungos para o estudo da biodegradação. Uma linhagem da espécie *Phanerochaete chrysosporium* (Ph) proveniente da coleção de cultura da Universidade Federal do Rio de Janeiro-Brasil, conhecida

por degradar a lignina, e outra linhagem selvagem da espécie *Talaromyces wortmannii* (BM-18) isolada do solo do Aterro da Muribeca (Jaboatão dos Guararapes-PE-Brasil), caracterizada como uma das linhagens mais abundantes deste solo.

Polímeros

O poliéster poli(β -hidroxibutirato-co-valerato)-PHB-HV foi fornecido pela PHB Industrial S/A e o amido do tipo Anfótero (Foxhead® 5901) fornecido pela Corn Products do Brasil.

Métodos

Manutenção das culturas de fungos

As linhagens dos fungos foram mantidas em meio de cultivo Sabouraud-Ágar com composição: peptona (10 g.L⁻¹), glicose (40 g.L⁻¹), NaCl (7,5 g.L⁻¹), extrato de carne (3,5 g.L⁻¹), ágar (12 g.L⁻¹), água destilada (1 L). O pH foi ajustado em 4-5 e a esterilização do meio foi realizada a 120 °C por 20 minutos. As linhagens foram estocadas a temperatura de 5 °C, e repicadas, pelo menos, a cada dois meses.

Preparação da suspensão de esporos

Os esporos foram coletados com alça de platina e introduzidos em tubos de ensaio contendo 10 mL de solução estéril de Tween 80 a 0,01%, seguida de agitação. Os esporos foram contados em câmara de Neubauer e a concentração das suspensões usadas para o teste de biodegradação foram ajustadas para 10⁶ esporos/mL.

Processamento do filme

As blendas de PHB-HV, na composição 75/25 m/m, foram obtidas, com espessura média de 10,250 ± 0,005 mm, através da técnica de evaporação do solvente de soluções do polímero e clorofórmio, nas seguintes condições:

- Massa total: 1,0 g;
- Temperatura de controle: 50 °C;
- Tempo total de mistura: 3 horas; e
- Sistema sob agitação.

O sistema polimérico, após completa dissolução, foi transferido para placa de Petri (diâmetro de 11 cm) na temperatura ambiente, sem controle da umidade.

Teste de Sturm

Baseia-se na avaliação da capacidade biodegradadora dos fungos, através da quantificação de CO₂ produzido durante o ensaio de biodegradação. O monitoramento da produção de CO₂ consiste de um sistema (Figura 2) composto por um compressor de ar, um reator (b) e dois erlenmeyers contendo solução de hidróxido de bário, um com 400 mL de solução colocado antes (a) e outro com 400 mL de solução colocado após o reator (c), todos conectados por mangueiras, as quais estavam conectadas a tubos imersos no conteúdo tanto dos erlenmeyers, quanto do reator. A aeração será mantida pelo compressor de ar conectado no primeiro



Figura 2. Esquema da montagem do teste de Sturm.

erlenmeyer, onde o CO_2 contido no ar, reage com o hidróxido de bário presente na solução. O ar isento de CO_2 passa para o reator, onde os microorganismos estavam em contato com polímero. A respiração celular dos microorganismos vai produzir CO_2 , que será transferido pelo fluxo de ar até o próximo erlenmeyer. No terceiro erlenmeyer o CO_2 da respiração celular reagirá com hidróxido de bário formando carbonato de bário e precipitando. Por intermédio de uma titulação com ácido clorídrico, a quantidade de CO_2 captado neste último recipiente será determinado⁽⁹⁾. E através de cálculos estequiométricos, foi determinada a produção de CO_2 no processo de biodegradação, utilizando para isto o programa Microsoft® Excel 2002.

Varição de massa

A biodegradação dos filmes foi avaliada através da variação de massa, as blendas foram pesadas em balança semi-analítica modelo AS 5500C da empresa Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda, antes (M_o) e após (M_f) o Teste de Sturm. Obtendo através da Equação 1 a variação de massa em porcentagem ($\Delta M_{\%}$).

$$\Delta M_{\%} = \frac{M_o - M_f}{M_o} \times 100\% \quad (1)$$

Espectroscopia no infravermelho (IV)

As análises espectroscópicas foram realizadas em Espectrofotômetro AVATAR 360 de marca NICOLET, numa faixa de 400 a 4000 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} .

A presença de grupos carboxílicos terminais é uma forma comumente utilizada para quantificar a degradação química de polímeros. Nos espectros de FTIR é indicada através da absorbância a 3290 cm^{-1} . A normalização da absorção a 3290 cm^{-1} foi feita através da absorbância a 2970 cm^{-1} (referente à vibração C-H), a fim de superar as variações devido a diferenças de contato entre o filme e o cristal, e variações de espessura. Tem-se, portanto, o Índice de Grupos Carboxílicos Terminais - IGCT, obtido através da Equação 2:

$$I.G.C.T. = \frac{\text{Absorção a } 3290 \text{ cm}^{-1}}{\text{Absorção a } 2970 \text{ cm}^{-1}} \quad (2)$$

Difração de raio X (DRX)

As análises de difração de raio X foram realizadas num difratômetro da marca Siemens Modelo D-5000, tubo de Cu, voltagem de 40 kV e corrente de 40 mA, utilizando ângulo de $2\theta^\circ$ e varredura de 5 a 40° por segundo.

Ensaio mecânico

Os ensaios mecânicos das amostras foram analisados em máquina universal de ensaio, marca EMIC, linha DL, força máxima de 500 N segundo a ASTM D 638-82^a, a temperatura ambiente de aproximadamente $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e sem controle de umidade. A velocidade da garra foi de 10 mm/min e distância entre garras 30 mm. Os corpos de prova utilizados apresentaram formato retangular de 7,5 cm de comprimento e 2,5 cm de largura.

Nesse ensaio foram determinadas as propriedades de resistência à tração na ruptura (TS) e alongamento na ruptura (ϵ).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A superfície micrografada da blenda foi à região de ruptura das amostras ensaiadas mecanicamente, sendo coberta com uma fina camada de ouro utilizando fita de carbono como suporte, em um microscópio JEOL JSM-6360 com aumento de 250 vezes.

Resultados e Discussão

Teste de Sturm

Este tipo de ensaio é tido como sendo o mais confiável para a avaliação da biodegradabilidade de um polímero em meio microbiano ativo. A produção de CO_2 na biodegradação do polímero é considerada um parâmetro importante do processo.

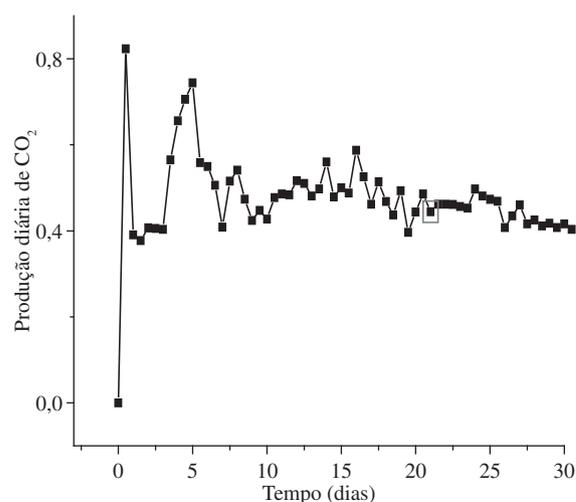


Figura 3. Produção de CO_2 .

O monitoramento do sistema foi realizado a cada 12 horas, durante um período de 31 dias. Por titulação com ácido clorídrico, as quantidades de CO₂ produzidas na biodegradação e coletadas no recipiente C (Figura 2) foram determinadas duas vezes ao dia a partir de cálculos estequiométricos. Na Figura 3 mostra os resultados obtidos após 31 dias de monitoramento da produção de CO₂.

O ensaio de biodegradação se mostrou viável, visto que é um processo adequado, ou seja, os microrganismos estão em ambiente propício para seu desenvolvimento e nutrição, e em um curto espaço de tempo. Foi possível observar, a partir do 20º dia, o comportamento dos materiais quanto à produção de CO₂ passou a variar muito pouco com o tempo de exposição da blenda aos fungos. A produção de CO₂

Tabela 1. Variação de Massa.

| Massa (g) antes do teste de Sturm | Massa (g) após o teste de Sturm |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| 0,080 ± 0,001 | 0,070 ± 0,001 |

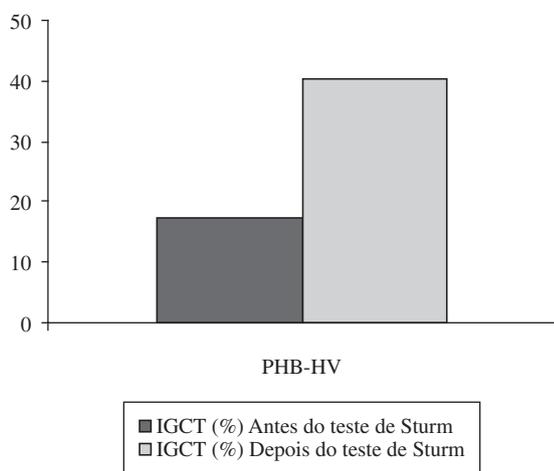


Figura 4. Índice de grupos carboxílicos terminais.

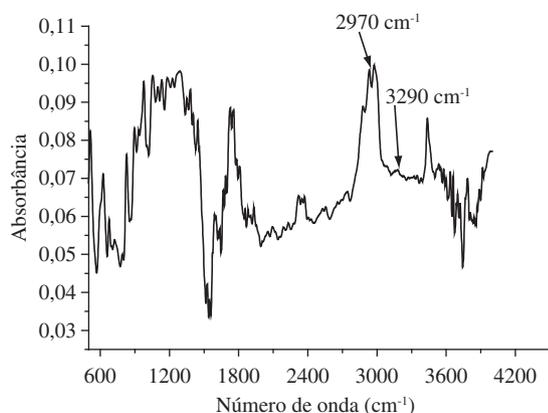


Figura 5. Espectros FTIR da blenda PHB-HV/Amido anfótero antes da biodegradação.

varia com o tempo de exposição da blenda aos fungos até tornar-se constante.

Variação de massa

As blendas foram pesadas em balança semi-analítica, antes (M₀) e após (M_f) o Teste de Sturm. Na Tabela 1, os dados mostram que houve uma perda de massa das blendas para ambos os reatores, numa média de 12,70% de perda de massa.

Constatou-se a impregnação dos microrganismos na blenda, justificando dessa maneira essa pequena variação de massa.

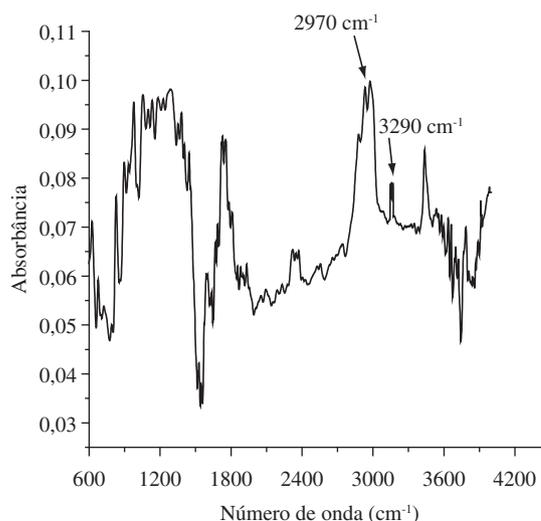


Figura 6. Espectros FTIR da blenda PHB-HV/Amido anfótero após a biodegradação.

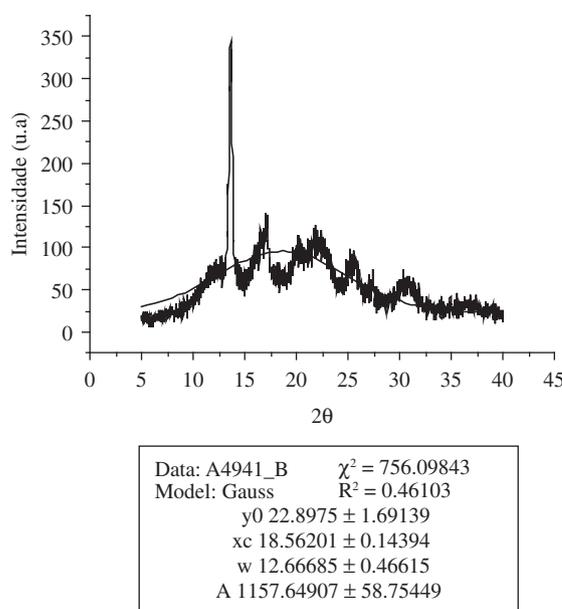
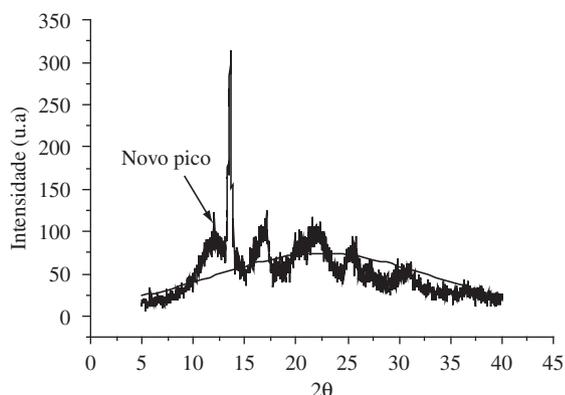


Figura 7. Aproximação gaussiana para a subtração do halo amorfo no difratograma de raio X do PHB-HV/amido antes da biodegradação.



Data: A4943_B $\chi^2 = 773,1644$
 Model: Gauss $R^2 = 0,28221$
 $y_0 = 7,42918 \pm 0$
 $x_c = 22,5 \pm 0$
 $w = 21,03873 \pm 0,52641$
 $A = 1767,41612 \pm 34,65028$

Figura 8. Aproximação gaussiana para a subtração do halo amorfo no difratograma de raio X do PHB-HV/amido após a biodegradação.

Tabela 2. Parâmetros do cálculo de cristalinidade e fração cristalina (%C) das blendas poliméricas antes e após a biodegradação.

| Blenda PHB/ amido anfótero | Integral do difratograma | Área (aproximação gaussiana) | %C |
|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-------|
| Antes | 1940,17 | 1157,64 \pm 58,75 | 63,10 |
| Após | 1845,36 | 1767,42 \pm 34,65 | 51,58 |

Espectroscopia no infravermelho (IV)

Durante a biodegradação há a formação de grupos carboxílicos terminais e estes podem ser monitorados para quantificar a extensão da degradação química.

A biodegradação promove alterações estruturais na blenda através das diferentes absorções no Infravermelho.

Através da Figura 4, pode-se notar que após o ensaio de biodegradação do PHB-HV/amido há um aumento do IGCT. A formação dos grupos carboxílicos terminais é possivelmente devido à hidrólise enzimática da blenda, favorecendo a biodegradação.

Os espectros de FTIR das blendas PEBD/Amido anfótero, antes e após a biodegradação, apresentaram diferenças devido à formação ou mudança de novos grupos, como mostrado nas Figuras 5 e 6, sendo esta diferença mais acentuada para os grupos carboxílicos terminais indicada através da absorbância a 3290 cm^{-1} que caracteriza um processo de degradação da blenda.

Difração de raio X (DRX)

Na Figura 7 e 8 estão os difratogramas das blendas PHB-HV/Amido anfótero antes e após a biodegradação. Comparando estes difratogramas pode-se verificar que existe a formação de um novo pico de difração, o que in-

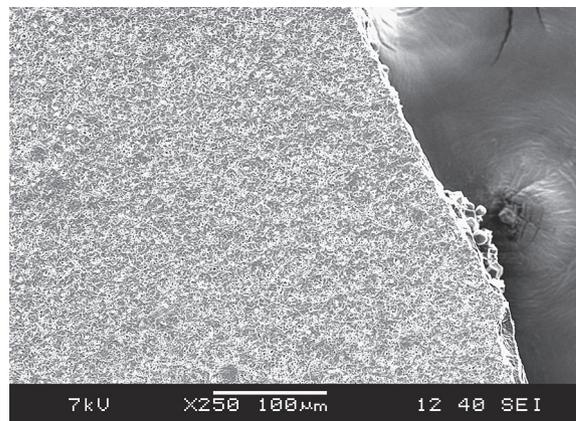


Figura 9. Fotomicrografia da blenda PHB-HV/Amido anfótero com aumento de 250x da região de fratura.

dica que a biodegradação causa o surgimento de novas simetrias cristalinas.

A determinação da fração cristalina ou grau de cristalinidade é um importante parâmetro para definir propriedades físicas e químicas do material polimérico. O grau de cristalinidade, apresentado na Tabela 2, foi calculado considerando a área sob os picos difratados, descontando-se o halo amorfo de acordo com a Equação 3:

$$\%C = \frac{I_c}{(I_c + KI_a)} \cdot 100 \quad (3)$$

onde %C é a fração cristalina, I_c é o resultado da integração dos picos de difração das Figuras 7 e 8, I_a é o resultado da integração do halo amorfo, obtida através da aproximação Gaussiana dos difratogramas, e K é uma constante de proporcionalidade característica de cada polímero, sendo utilizada a do poli(β -hidroxibutirato) 0,98^[6]. Os dados referentes à subtração do halo amorfo foram obtidos a partir da aproximação Gaussiana (Tabela 2).

O percentual de cristalinidade foi alterado quando os filmes são expostos à presença dos fungos. Este fato reforça a hipótese de que fragmentos de moléculas da região amorfa e de moléculas atadores se rearranjam sobre os cristalitos, causando uma variação no grau de cristalinidade do polímero.

Assim como há de uma forma geral uma diminuição na intensidade dos picos do difratogramas após a biodegradação, justificando dessa forma a diminuição da fração cristalina depois do teste de Sturm, verificada pelos dados da Tabela 2.

Ensaio mecânico

A Tabela 3 mostra os resultados do ensaio mecânico, especificamente à resistência a tração e o percentual de alongamento do PHB-HV puro e da blenda de PHB-HV/amido. A incorporação do amido ao polímero diminuiu em torno de 18% a resistência à tração como também o percentual de alongamento do polímero. O alongamento na ruptura de blendas de polímeros é considerado bastan-

Tabela 3. Resultados dos ensaios mecânicos do PHB-HV puro e PHB-HV/amido.

| | Resistência à tração na ruptura - TS (MPa) | Alongamento na ruptura ϵ (%) |
|--------------|--|---------------------------------------|
| PHB-HV | 25,53 \pm 5,40 | 14,23 \pm 1,48 |
| PHB-HV/Amido | 21,01 \pm 7,04 | 10,85 \pm 2,03 |

te sensível à interação entre as fases da blenda. A adição de uma segunda fase imiscível na matriz do material em geral significa um decréscimo nessa propriedade. Uma possível explicação para a perda em propriedades mecânicas com a adição de amido ao PHB-HV, pode ser uma baixa interação interfacial entre os componentes da blenda, a qual leva para a ruptura mecânica de sua interface^[8].

Rosa et al.^[11] verificaram a influência da incorporação do amido em blendas poliéster/amido nas suas propriedades mecânicas, obtendo resultados de modificação nessas propriedades concordantes aos obtidos neste trabalho.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura da região de fratura dos corpos de prova ensaiados mecanicamente permite verificar morfologicamente as blendas poliméricas.

Observando-se a fotomicrografia apresentada na Figura 9 verifica-se uma superfície uniforme e que a ruptura da amostra ocorreu sem alongamento, caracterizando um material não elástico e frágil.

Conclusão

O ensaio de biodegradação se mostrou viável, visto que é um processo acelerado, pois os microrganismos estão em ambiente propício para seu desenvolvimento e nutrição, e num curto espaço de tempo, 31 dias, é possível detectar a biodegradação total da blenda. O uso de um método que leva em conta a determinação da quantidade de CO₂ produzido na biodegradação se apresentou exequível. A produção do CO₂ torna-se constante com o tempo de exposição da blenda aos fungos. As amostras inoculadas por um período de 31 dias apresentaram pequena variação de suas massas, mas isto ocorreu devido à impregnação do microrganismo na blenda que estava totalmente fragmentada no fim do ensaio.

O DRX das blendas PHB-HV/Amido na proporção 75/25 mostrou um novo rearranjo dos cristais e aparecimento de um novo pico após a biodegradação. De uma forma geral foi verificada uma diminuição de 18,2% do grau de cristalinidade da blenda após a biodegradação.

A incorporação do amido ao polímero diminuiu em torno de 18% a resistência à tração como também o percentual de alongamento do polímero.

Através do MEV foi visto que a blenda de PHB-HV/amido apresentou uma superfície uniforme com a região de fratura característica de um material frágil sem alongamento.

Agradecimentos

À FACEPE pelo apoio financeiro; Ao CNPq pela concessão de uma bolsa de Iniciação científica; e Às Indústrias PHB do Brasil e Corn Products do Brasil, pelo fornecimento dos poliésteres e do amido.

Referências Bibliográficas

1. Aburto, J.; Thiebault, S.; Alric, I.; Borredon, E.; Bikiaris, D.; Prinos, J. & Panayiotou, C. - "Properties of Octanoated Starch and its Blends with Polyethylene". *Carbohydrate Polymers*. **34**, p.101-112 (1997).
2. Almeida, U. L.; Aquarone, E.; Borzan, W. & Schimidell, W. - "Biotecnologia industrial. Processos fermentativos e enzimáticos". Editora Edgard, 1ª ed, São Paulo. BRASIL. **3**, p.219-245 (2001).
3. ASTM, Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics, D638-82a. (1982).
4. Langer, R.; Cima, L. G.; Tamada, J. A. & Wintwrmantel, E. - *Biomaterials*, **11**, p.738, (1990).
5. Netto, C. L. B. - <http://inventabrasilnet.t5.com.br/plastico.htm> Galeria de inventores do Brasil. "*PHB - Plástico biodegradável*" - PI 9806557 / PI 9103116.
6. Oliveira, L. M. - "Efeitos da Ragsição Gama no polímero biodegradável Poli(Hidroxibutirato) e Poli(Hidroxibutirato-co-valerato)". UFPE, Dissertação de Mestrado. p.80 (2005).
7. Parandoosh, S. & Hudson, S. M. - "The acetylation and enzymatic degradation of starch films". *J. Appl. Polym. Sci*; **48**, p. 787-791 (1993).
8. Pedrosa, A. G. & Rosa, D. S. - "Mechanical, thermal and morphological characterization of recycled LDPE/corn starch blends", *Carbohydrate Polymers*, p.1-9. (2004).
9. Rosa, D. S. & Pantano Filho, R. - "Biodegradação um ensaio com polímeros". Moara Editora. Itaitiba, São Paulo. Universidade São Francisco Editora. Bragança Paulista, São Paulo. (2003).

10. Rosa, D. S.; Chui, Q. S. H.; Pantano Filho, R. & Agnelli, J. A. M. - Polímeros: Ciência e Tecnologia, "Avaliação da Biodegradação de Poli- β -(Hidroxibutirato), Poli- β -(Hidroxibutirato-co-valerato) e Poli- ϵ -(caprolactona) em Solo Compostado", **12**, (4), p.311-317 (2002).
11. Rosa, D. S.; Franco, B. L. M. & Calil, M. R. - "Biodegradabilidade e propriedades mecânicas de novas misturas poliméricas", Polímeros: Ciência e Tecnologia, **11**, (2), p.82-88. (2001).
12. Scott, G. & Gilead, D. - "Degradable Polymers", Chapman 7 Hall, London (1995).
13. Vert, M. - "Polyvalent polymeric drug carriers", *in*: S. Buck (Ed.), CRC Critical Review - Therapeutic Drug Carriers Systems, CRC Press, Boca Raton, **2**, p.291327, (1986).
14. Wendlandt, K.-D.; Jechorek, M.; Helm, J. & Stottmeister, U. - "Production of PHB with a high molecular mass from methane", Polymer Degradation and Stability, **59**, p.191-194. (1998).

Enviado: 18/06/07

Reenviado: 19/04/08

Aceito: 19/05/08