INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS

Plásticos biodegradáveis de origem bacteriana: desenvolvimento da produção, biodegradação e desafios

Biodegradable bacterial plastics: development of production, biodegradation and challenges

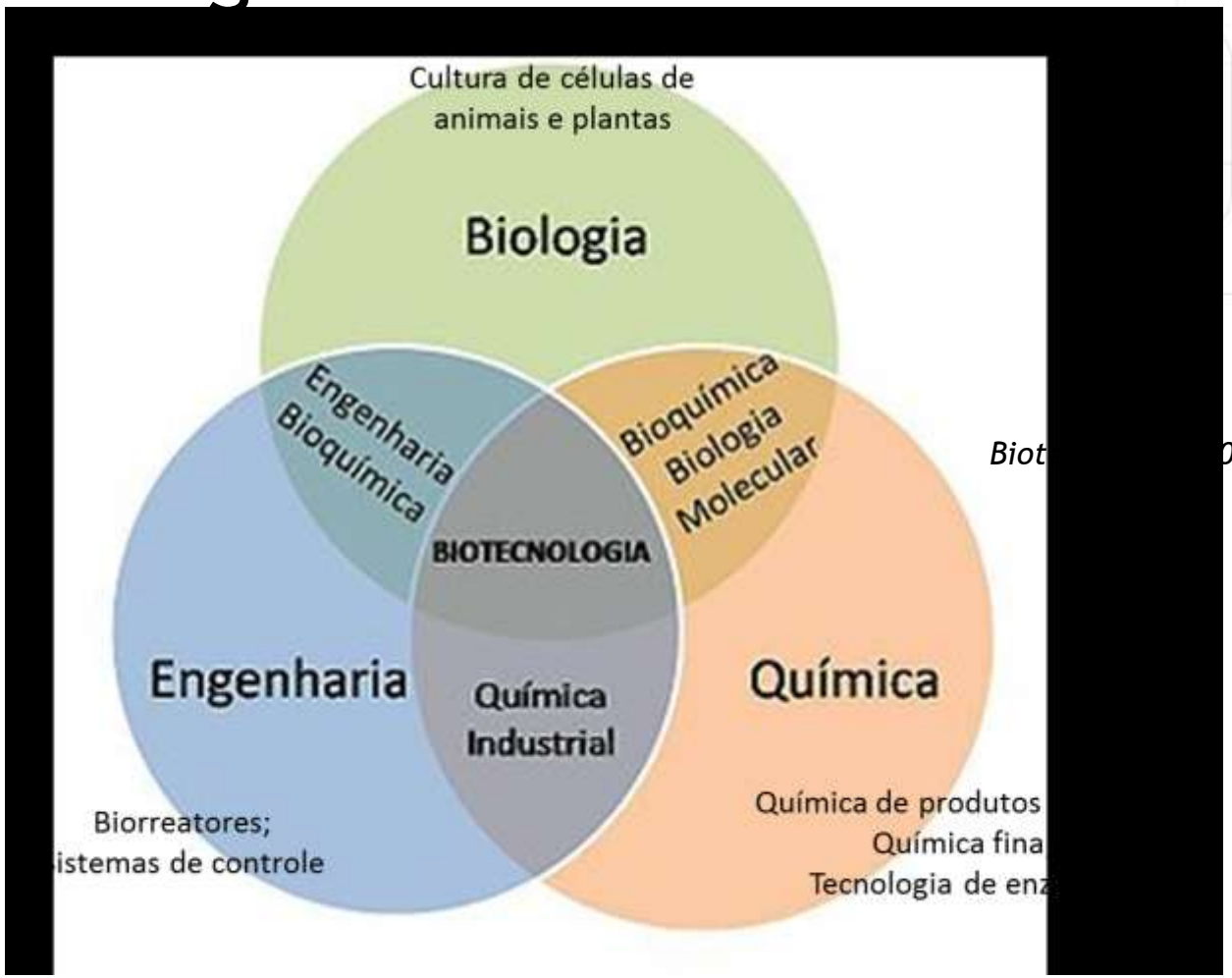
Maria Filomena de Andrade Rodrigues
Núcleo de Bionanomanufatura
(filomena@ipt.br)

Who we are

- Institute for Technological Research of the State of São Paulo S.A.
- One of the first applied R&D&I institutions in Brazil and the largest applied multipurpose R&D&I institution in Latin America
- Belongs to the Development Secretariat of the State of São Paulo
- IPT provides technological solutions to public and private companies and institutions

ipt

Biotecnologia



Biot *000*

Como?

CONHECIMENTOS MULTIDISCIPLINARES

INFRAESTRUTURA PARA PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS!

ipt

Biotecnologia

Biopesticidas, bioinoculantes, plantas transgênicas

Vacinas veterinárias, antiparasitários

Enzimas para tratamento de têxtil, detergentes

Pães, queijos, cervejas, vinhos, aditivos

Etanol, biogás

Antibióticos, hormônios, vacinas, kits para diagnóstico

Butanol, acetona, glicerol, biopolímeros, ácidos, enzimas

Recuperação de petróleo, tratamento do lixo, biorremediação

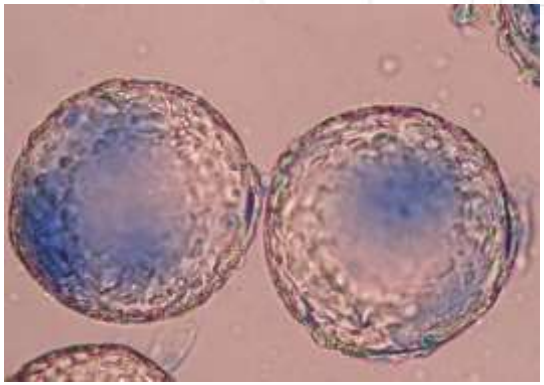
Aditivos para cosméticos: surfactantes, aromas

Biodiversidade

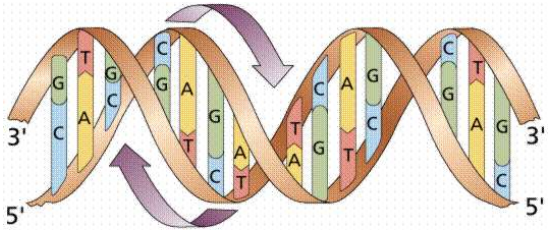
Bactérias

Fungos

Células

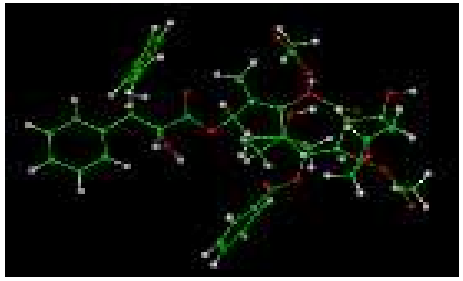


Genoma ou genes recombinantes

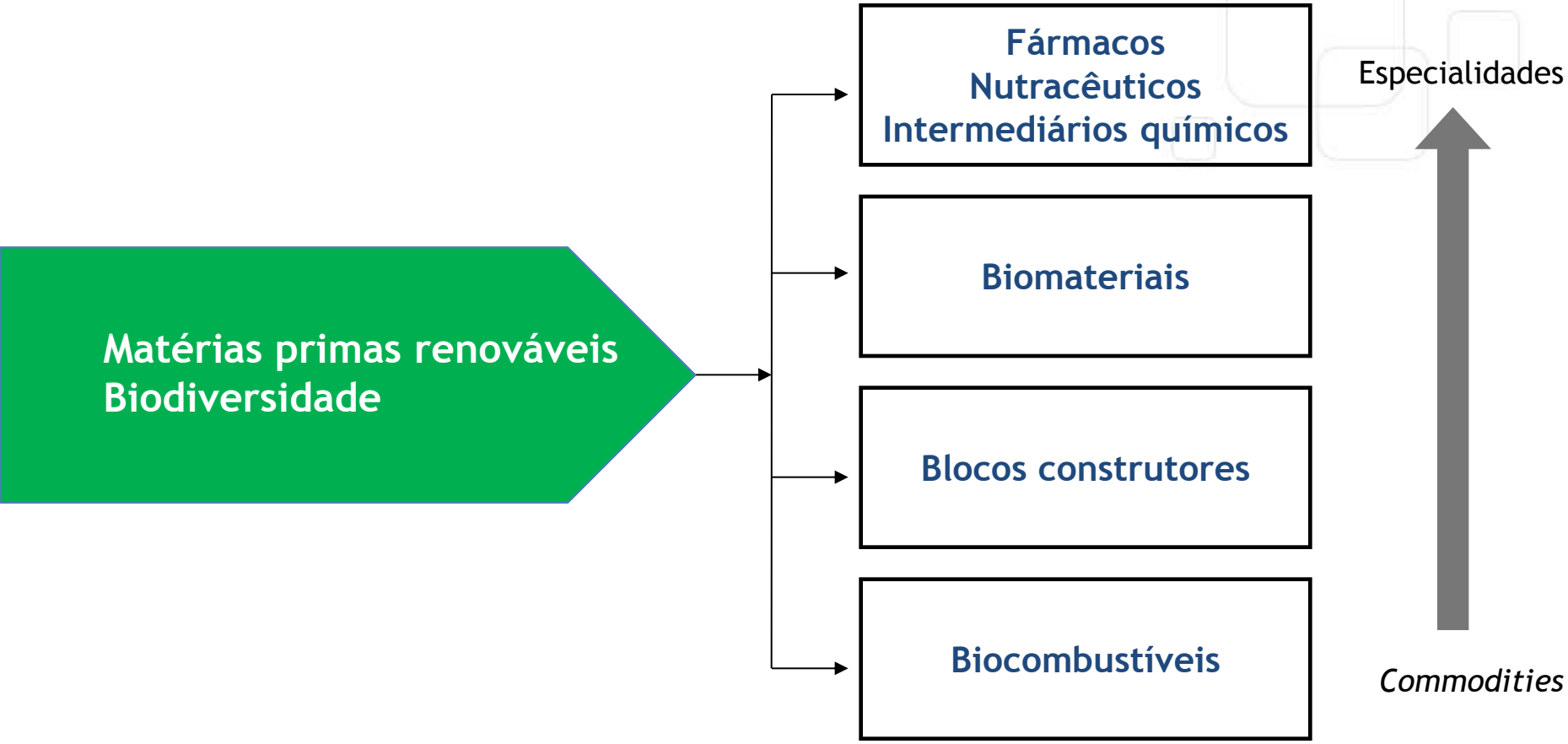


Informação

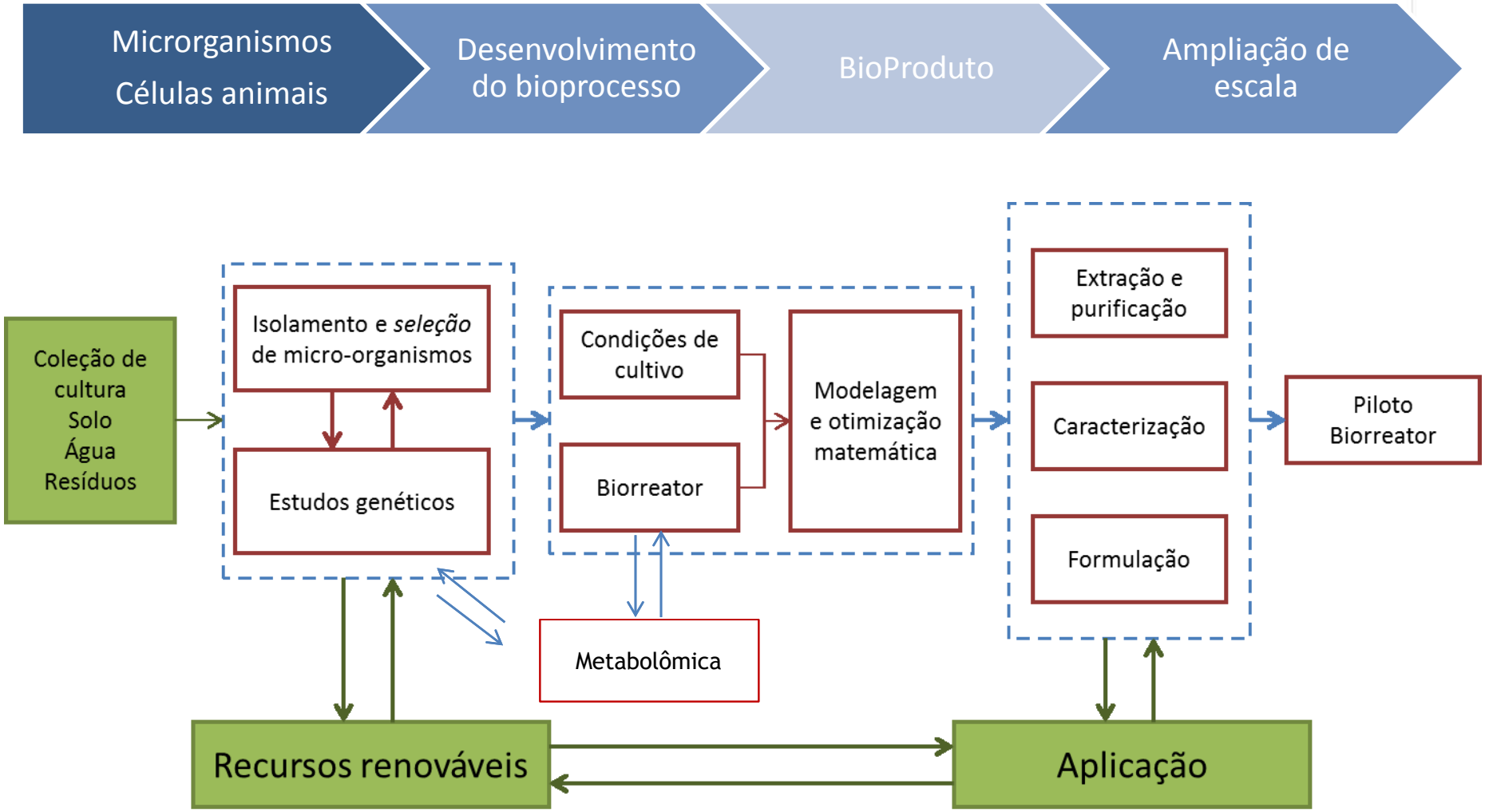
Biomoléculas



Cadeia de valor para a Biotecnologia



Biotecnologia no IPT



Desenvolvimento de Biopolímeros

ipt

Importância do desenvolvimento de biopolímeros e estudos de biodegradação

Aumento da demanda por produtos biodegradáeis

- Conscientização coletiva
-Problemas ambinetais
-Dificuldade de reciclagem

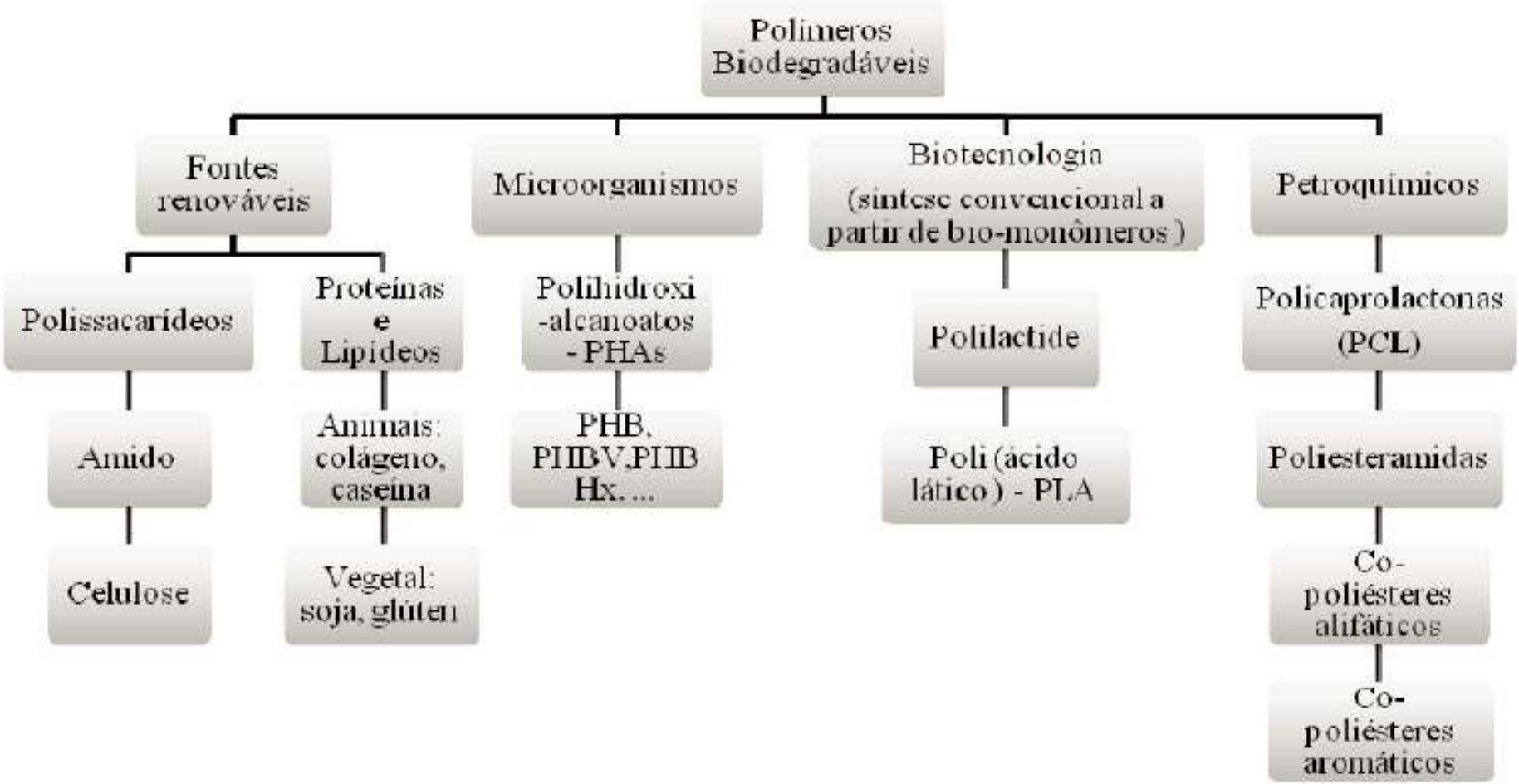
- Estratégias de marketing
- Política

Regulamentação
- Legislação ambiental
- Processos licitatórios, etc

Produtos biodegradáveis

Testes de biodegradabilidade

ipt



Classificação de alguns polímeros biodegradáveis de acordo com sua fonte de obtenção (Brito et al, 2011).

Quem investe em bioplásticos?

Company	Polymer
BASF (Germany)	**Ecoflex (AAC)**
DuPont (USA)	**Biomax (PGA)**
Cargill Dow (USA)	**Natureworks (PLA)**
Mitsubishi (Japan) / PTT (Thailand)	**Green Pla (PBS)**
Dow / Mitsui	**Green PE**
Braskem (Brazil)	**Green PE**
Bioclycle (Brazil)	**PHB**

Plásticos biodegradáveis a partir de cana de açúcar

Instituto de Pesquisas Tecnológicas

COPERSUCAR

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

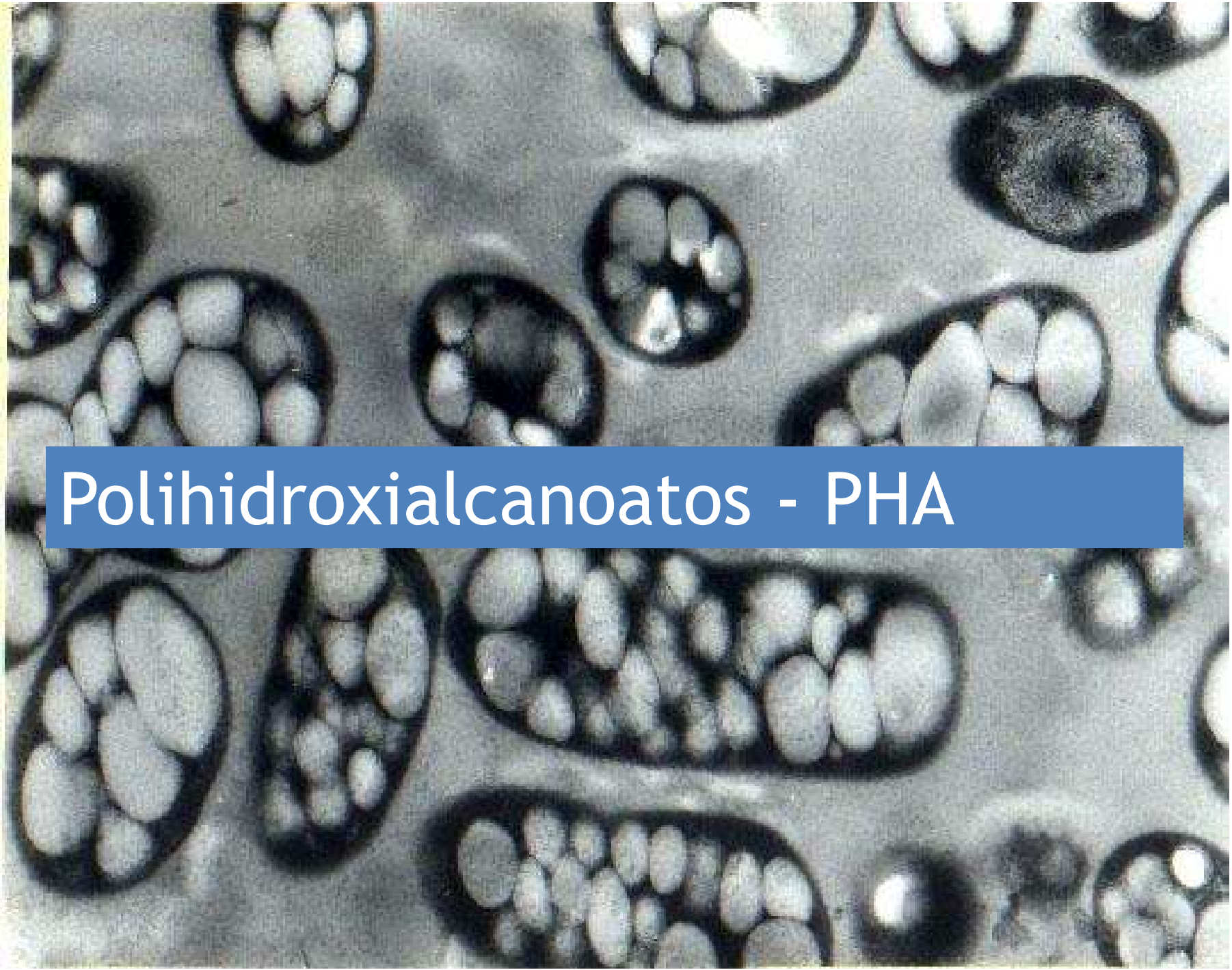
ipt

Plásticos biodegradáveis

- Degradam rapidamente em contato com meio apropriado
- Menor impacto ambiental

- ↑ custo
- Necessita de aprimoramento

ipt



Polihidroxialcanoatos - PHA

USE OF BIOPOLYMER TO REPLACE CONVENTIONAL PLASTICS

Products *Shampoo bottle, biodegradable*

This shampoo bottle is manufactured from biodegradable PHBV plastic (commercially named Biopol™).

The biodegradable shampoo bottle is the first major product to be produced using this material.

The closure is injection moulded and the bottle is blow moulded.

Category Personal items, Personal care

Materials PHBV

Processes Injection moulding (closure)
Blow moulding (bottle)

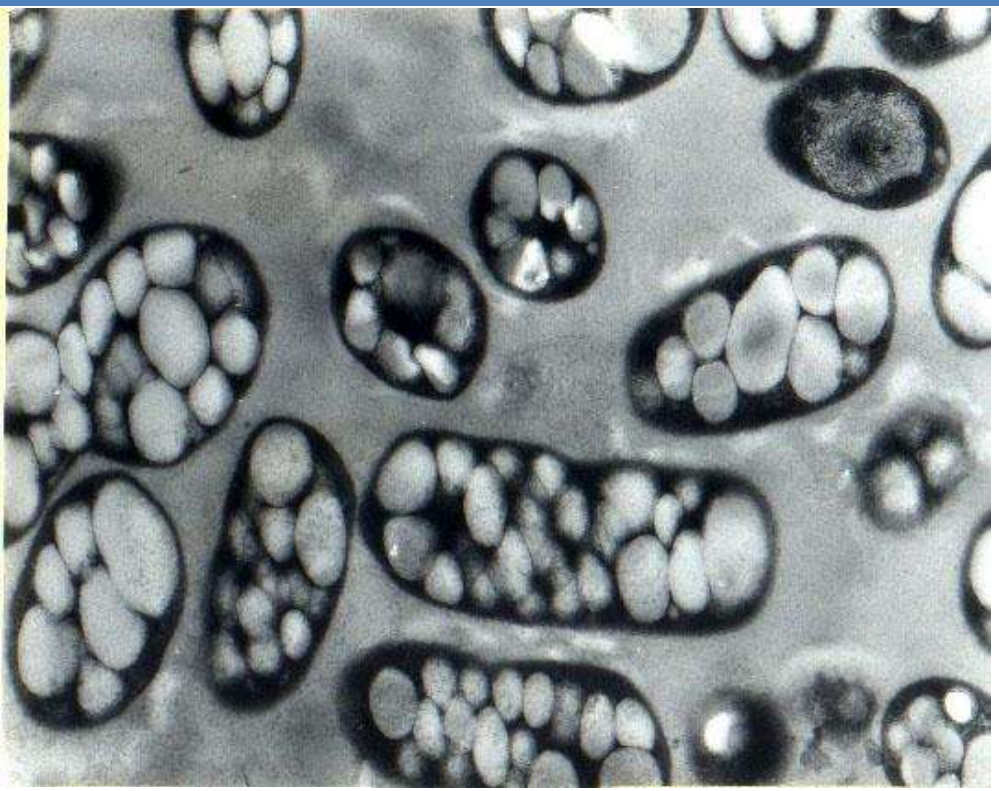
References Metabolix
Monsanto Company
Wella

Keywords Bottle
Biodegradable
Biopolymer
PHBV
Biopol™

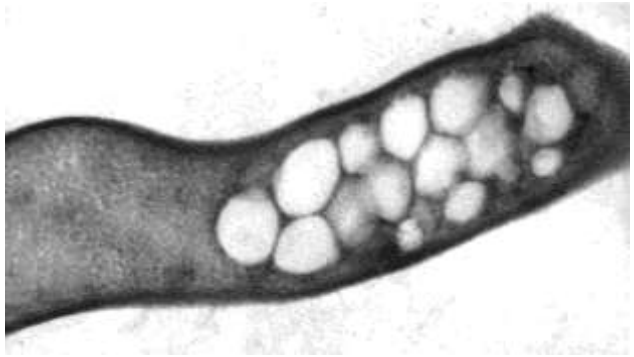
Price Approximately 4 DKK/bottle (retail, 1995)

Environ- mental notes *Creation:* The plastic is made from renewable resources using traditional production methods

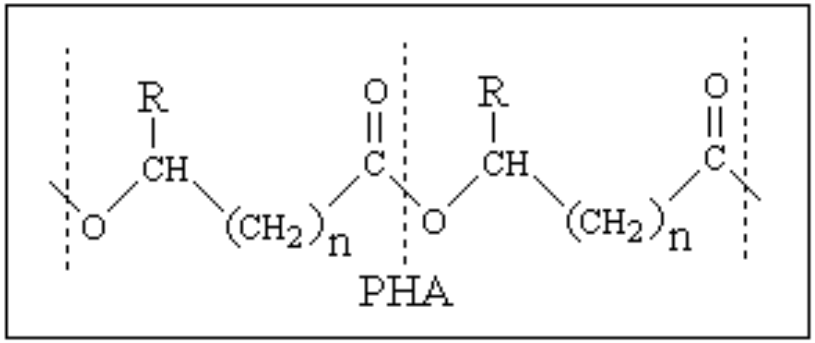
Polihidroxialcanoatos - PHA



- Biocompatibilidade (PHB);
- Biodegradabilidade
- Matérias-primas renováveis
- Variabilidade da composição monomérica



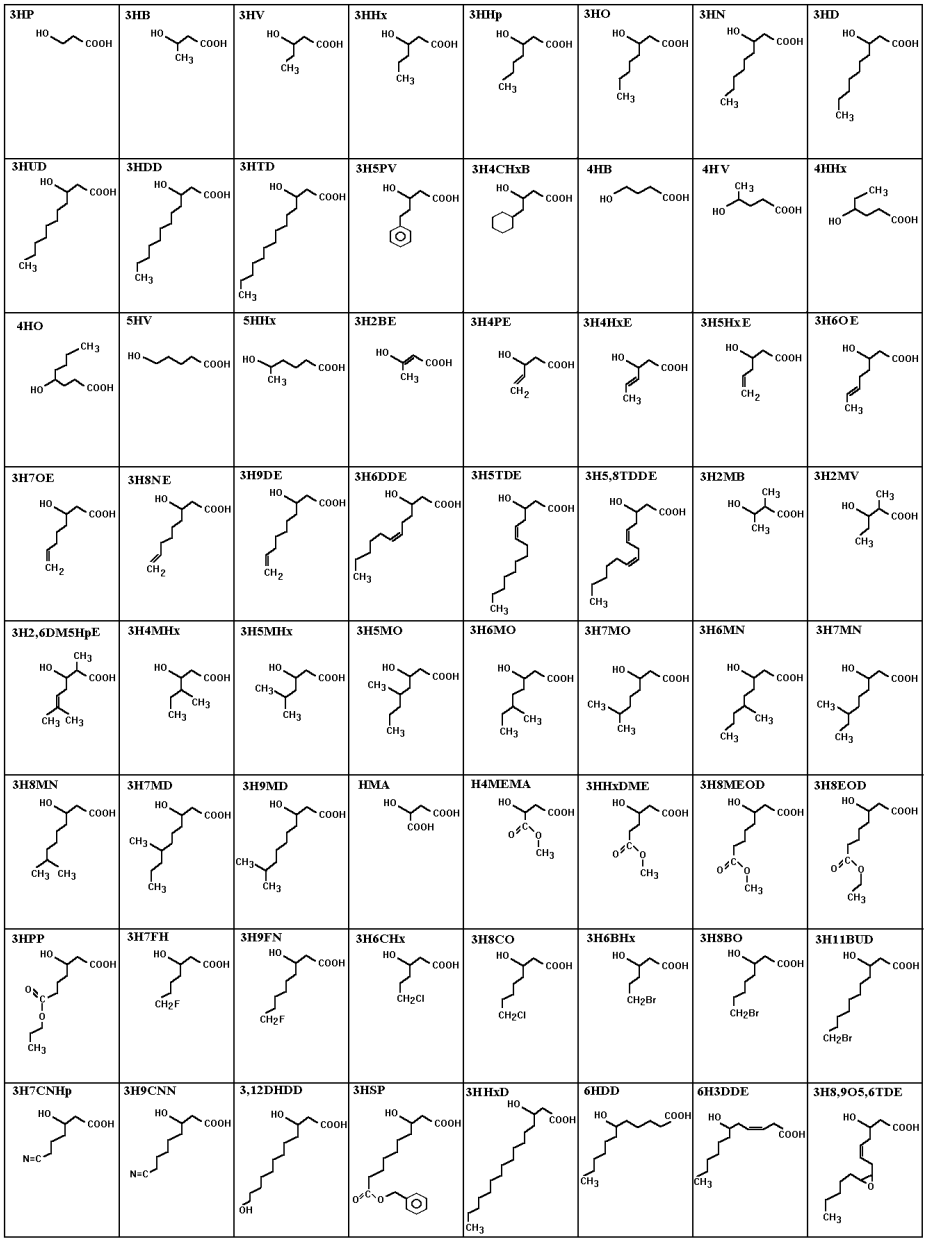
Polihidroxialkcanoato – estrutura química



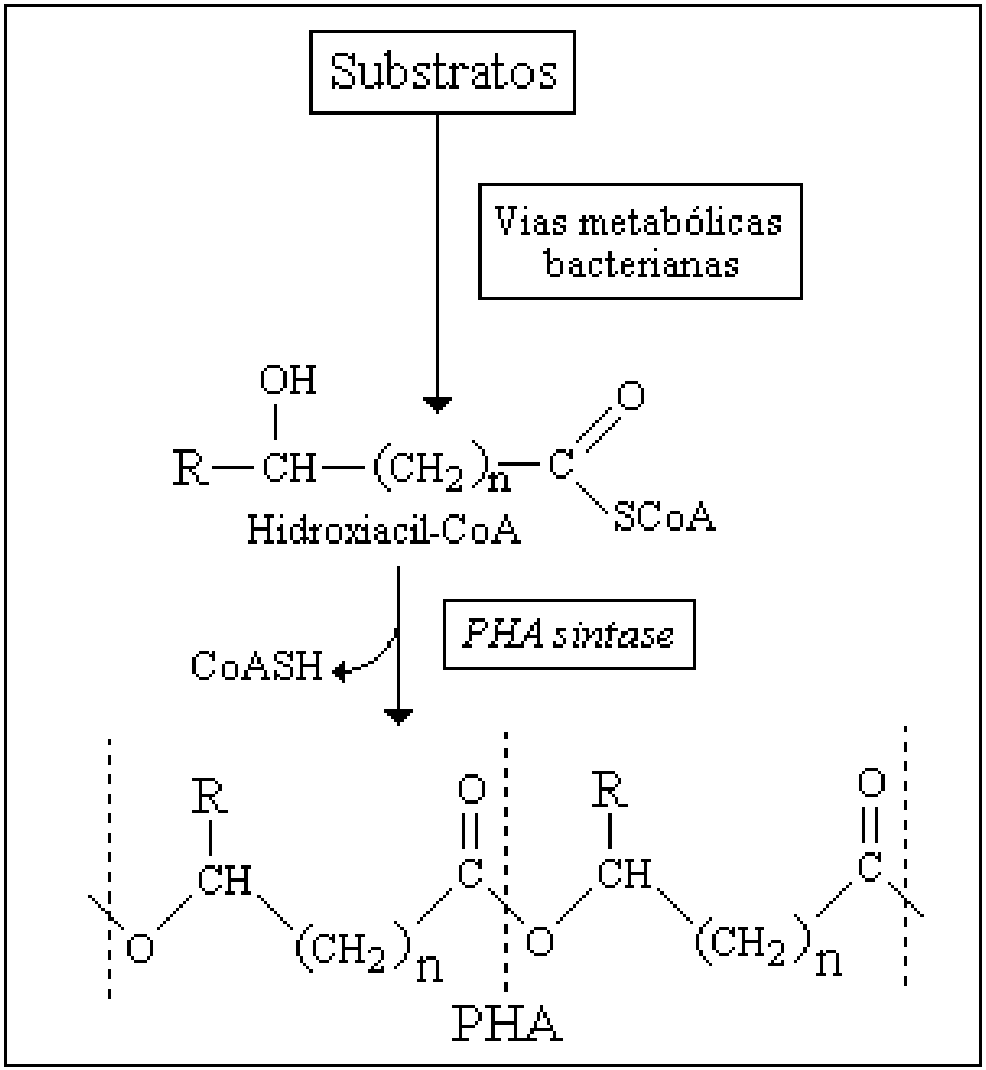
n = 1

R = $-CH_3$	poly(3-hydroxybutyrate)
R = $-CH_2-CH_3$	poly(3-hydroxyvalerate)
R = $-CH_2=CH_2$	poly(3-hydroxypentenoate)
R $\geq -CH_2-CH_2-CH3$	medium-chain-PHA

Diversidade de composições monoméricas

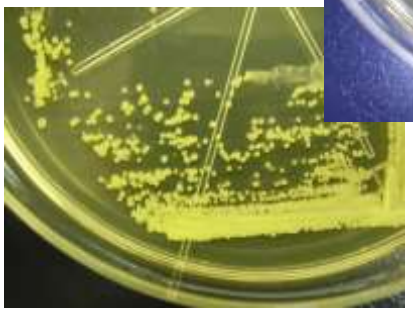


PHA - Biossíntese



Biodiversidade

- *Alcaligenes sp.*
- *Cupriavidus sp.*
- *Burkholderia sp.*
- *Pseudomonas sp.*
- *Streptomyces sp.*
- Genetic Modified Organism



Propriedades Termoplásticas

	PP	PHB	P3HB-co-3HV	PHB/PHPE (blenda)	PHPE
Temperatura de fusão (°C)	176	180	140	167	62,7
Temperatura de transição vítrea (°C)	-10	15	-	-	-11
Cristalinidade (%)	70	60 - 80	-	-	-
Elongação (%)	400	6	20	-	-
Resistência a solventes	boa	pobre	pobre	pobre	pobre

ipt

POTENCIAL DE SUBSTITUIÇÃO DOS POLÍMEROS CONVENCIONAIS POR BIOPOLÍMEROS

Materiais	PVC	PE-HD	PE-LD	PP	PS	PMMA	PA	PET		PC
Polímeros de amido	-	+	+	+	+	-	-	-		-
PLA	-	+	-	+	+	-	+	+		-
PTT	-	-	-	+	-	-	++	++		+
PBT	-	-	-	++	-	-	+	++		+
PHB	-	+	-	++	+	-	-	-		-
PHB/HHx	+	++	++	++	+	-	-	+		-

++ substituição completa;
+ substituição parcial;
- não substituição.
PVC: Cloreto de polivinila
PE-HD: Polietileno de alta densidade
PE-LD: Polietileno de baixa densidade
PBT: Polibutileno tereftalato
PP: Polipropileno
PS: Poliestireno
PMMA: Polimetil metacrilato
PA: Poliamida
PET: Polietileno tereftalato
PC: Policarbonato

PRADELLA, Biopolímeros e Intermediários Químicos. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. São Paulo.Março, 2006.

ipt

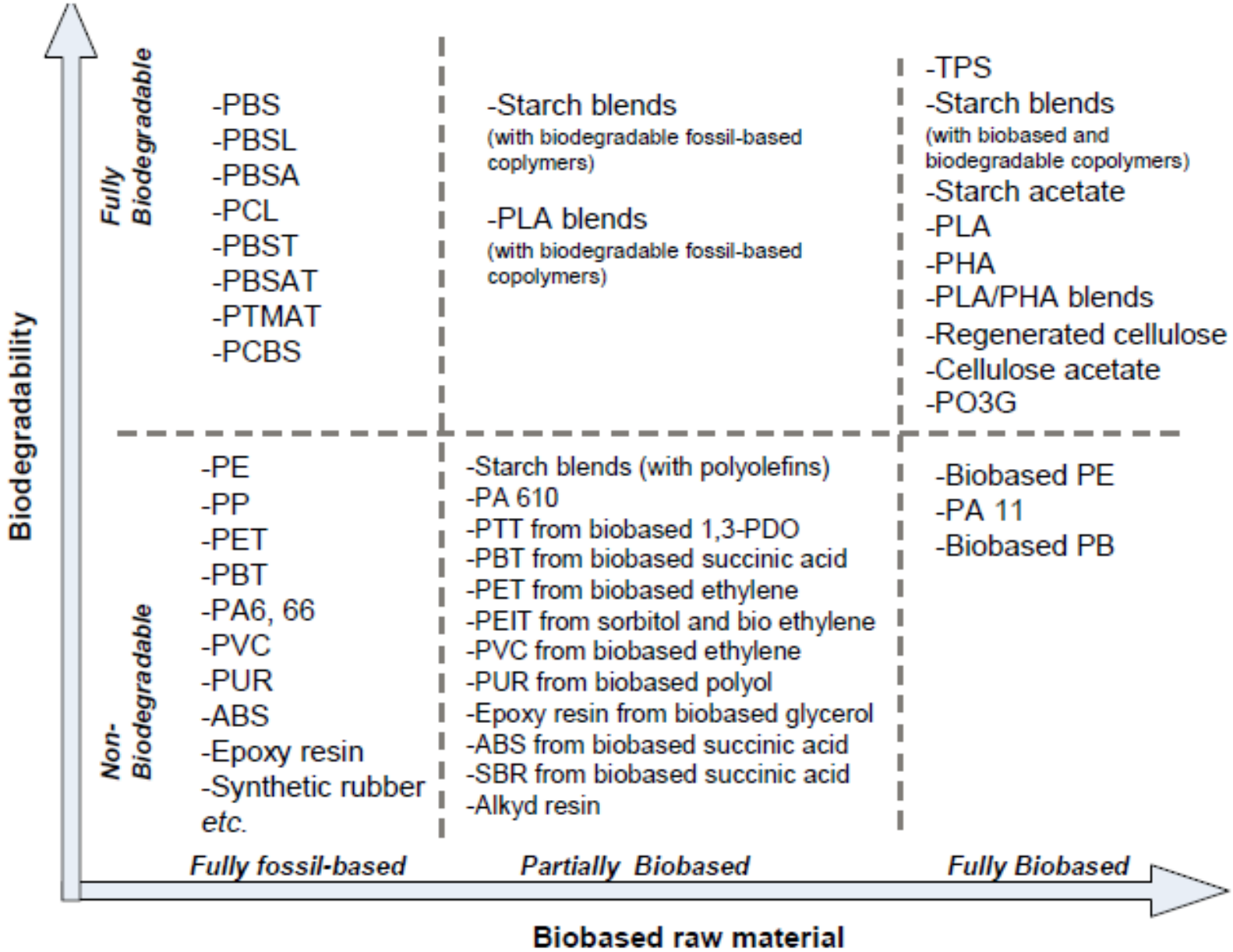
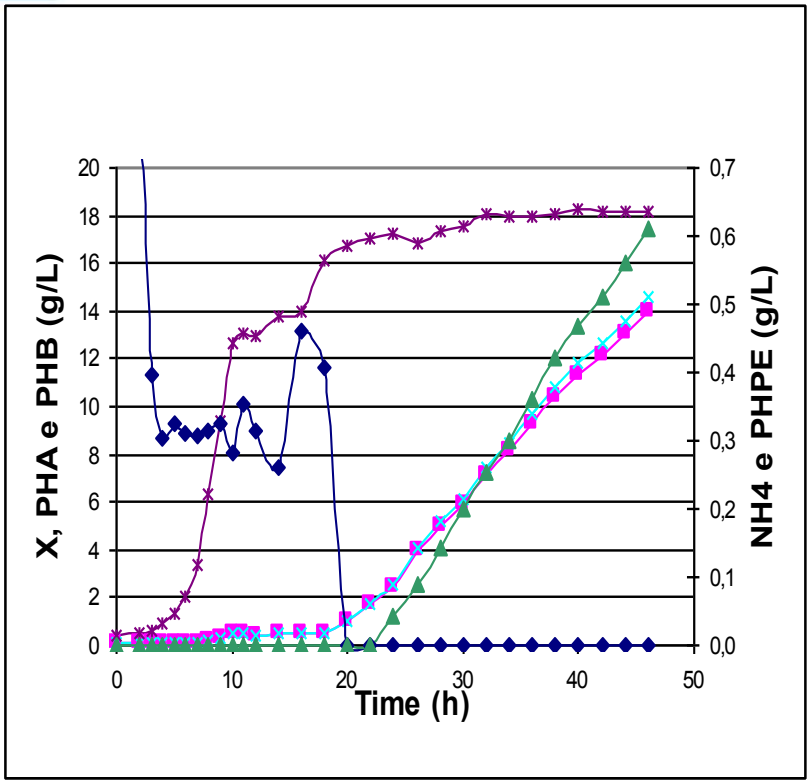


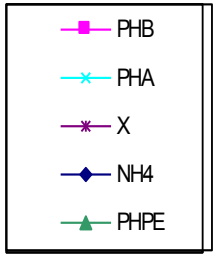
Figure 1-8 **Current and emerging (partially) bio-based plastics and their biodegradabilit**

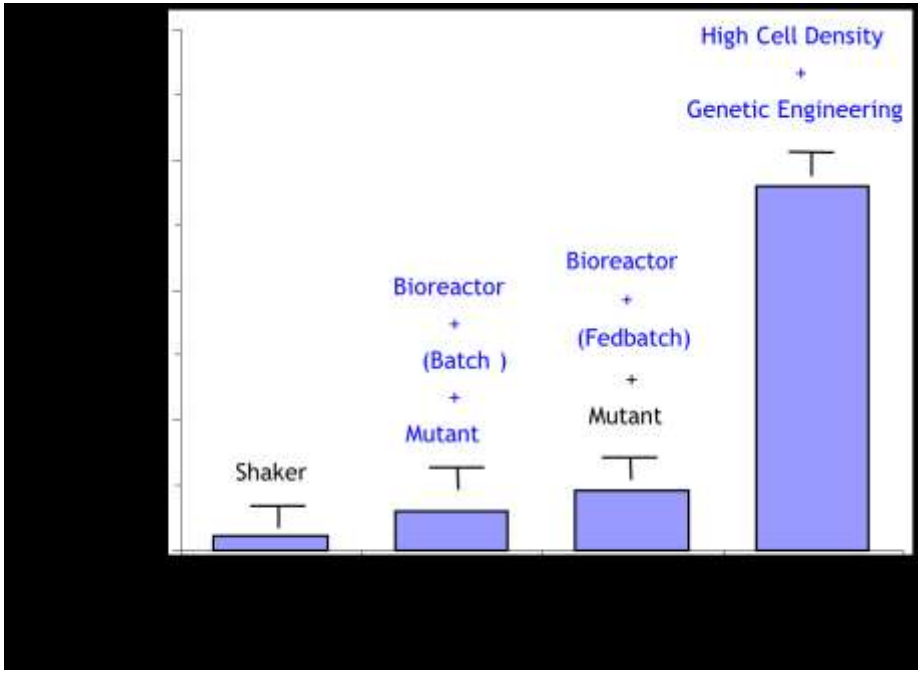
ipt

Tecnologia de produção de PHA



B. cepacia IPT 64 at pH 7.0 and 30ºC.





PHA Production

Raw materials

Media preparation

Fermentation

Cell disruption

Washing

Centrifugation

Drying

PHA

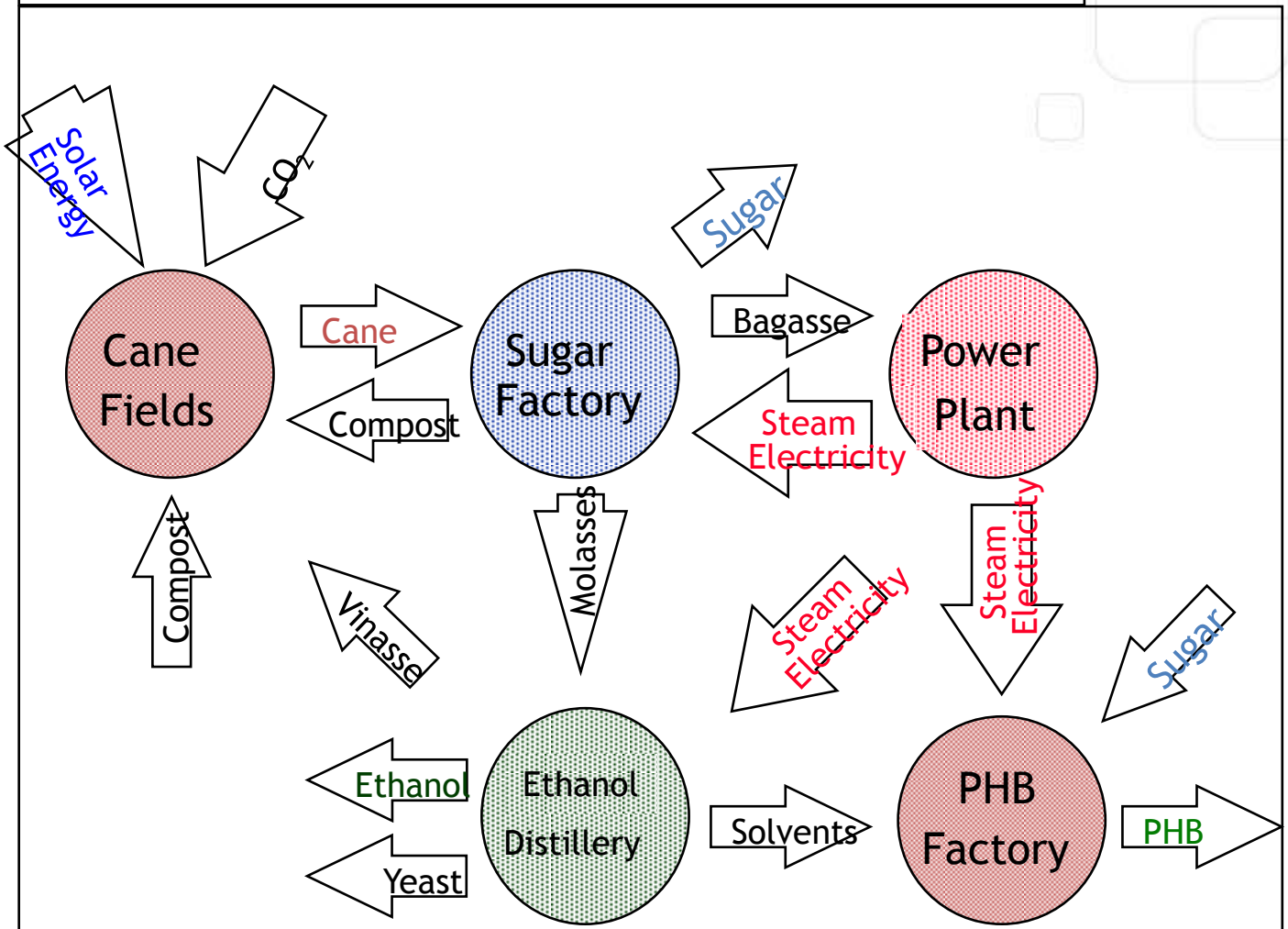
Carbon source

Bacteria growth and polymer accumulation

Polymer purification

Produção de PHA

Integrated PHB, Sugar and Ethanol Mill



ipt

Matérias-primas renováveis para produção de PHA

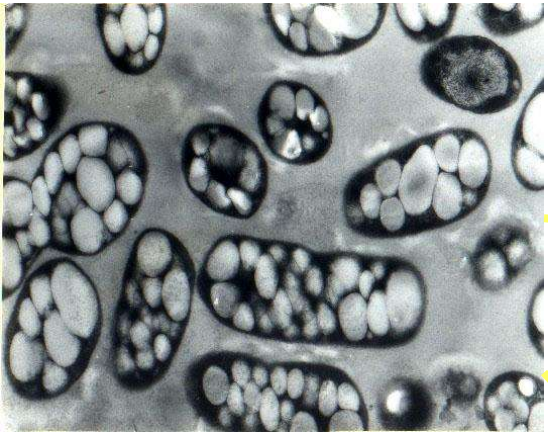
- Sacarose (cana de açúcar)
- Xilose+glicose (bagaço de cana)
- Glicerol/óleos vegetais
- Resíduo agro-industriais

- PI 0207356-9 – Processo de produção de polihidroxibutirato e seu copolímeropolihidroxibutirato-co-hidroxivalerato a partir de hidrolisados de bagaço de cana-deaçúcar
- PI 0501139-6 – Processo de produção de polihidroxialcanoatos a partir de glicerol ouresíduos contendo glicerol
- PI 0504054-0 – Processo de produção de polihidroxialcanoatos a partir de óleos vegetais
- PI0605580-0 19/12/2006 Produção de polihidroxialcanoatos a partir de pectina, ácido cítrico ou citrato e resíduos industriais contendo estes compostos

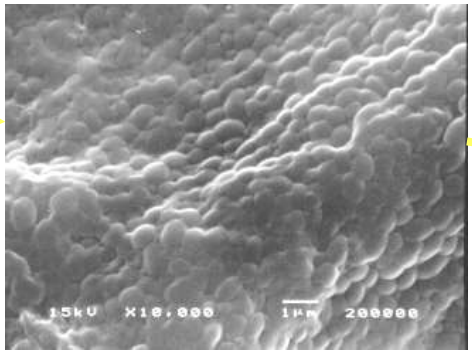
PHA applications

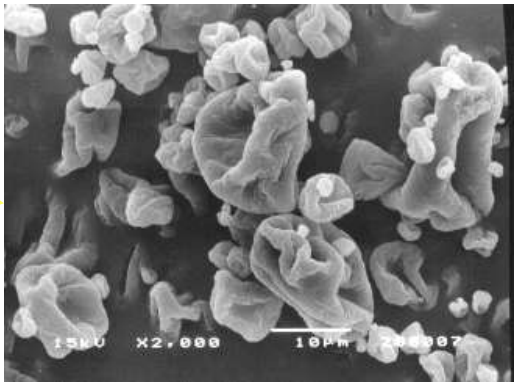
- Thermoplastic properties
- Packaging industry
- Medicine - Functionalised nanoparticles
- Pharmacy - Drug delivery
- Agriculture
- Food industry
- Raw material for enantiomerically pure chemicals

•Commodities



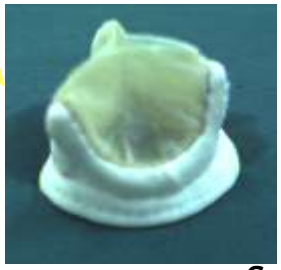
PHA granules in bacteria

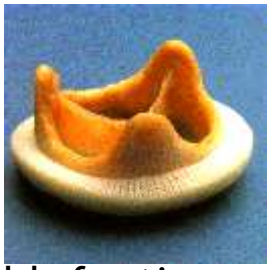




•Microcapsules for controlled drug release

↘Different biopolymers (PHB, PHB/HV, PHPE, PHA_{MCL}) and applications





Scaffolds for tissue engineering

Purification of PHA by enzymatic lysis of cells

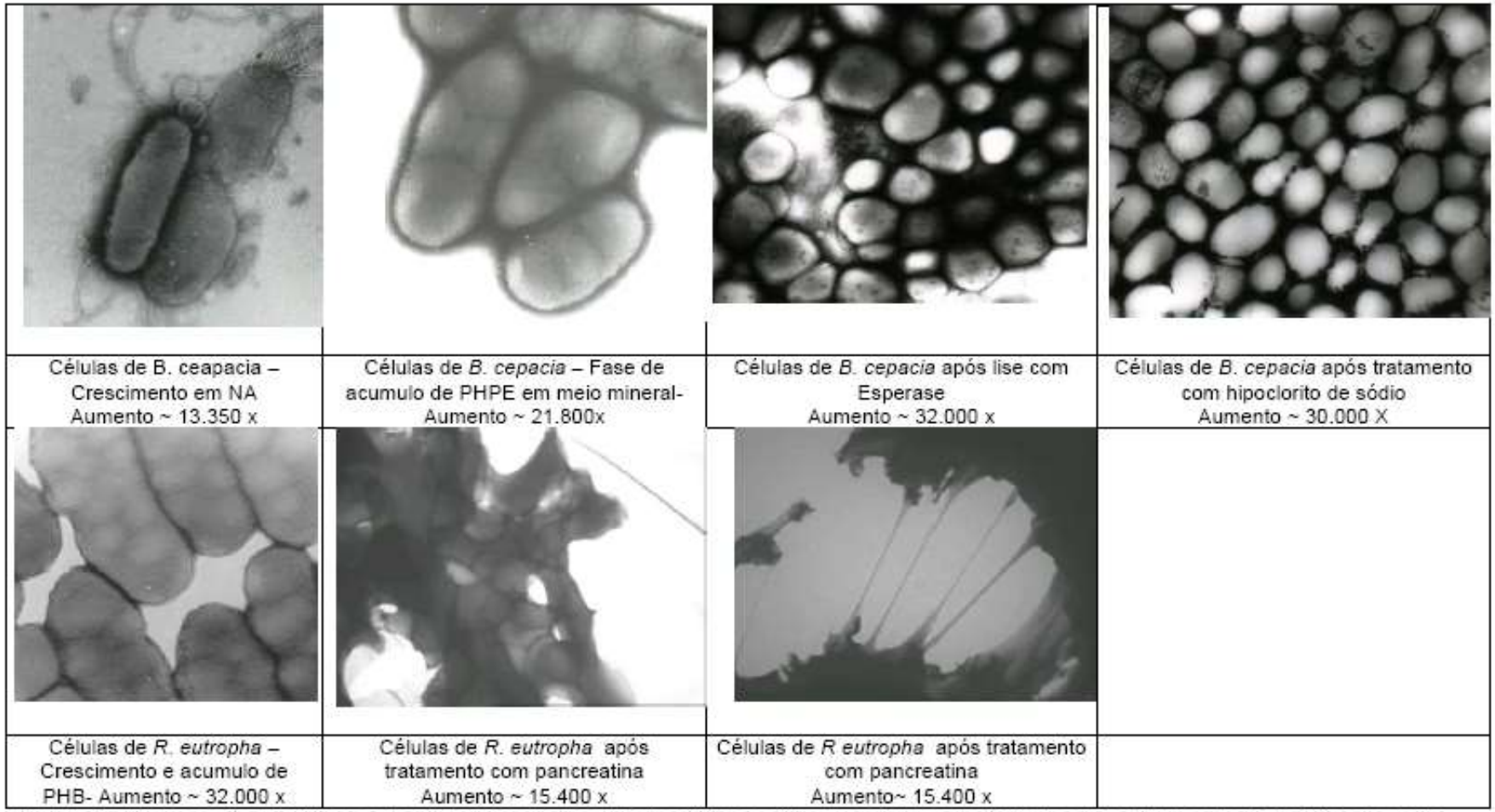


Figura 1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (contrastação negativa) de células bacterianas produtoras de biopolímeros em diferentes estágios.

World J Microbiol Biotechnol (2008) 24:771–775
DOI 10.1007/s11274-007-9537-x

ORIGINAL PAPER

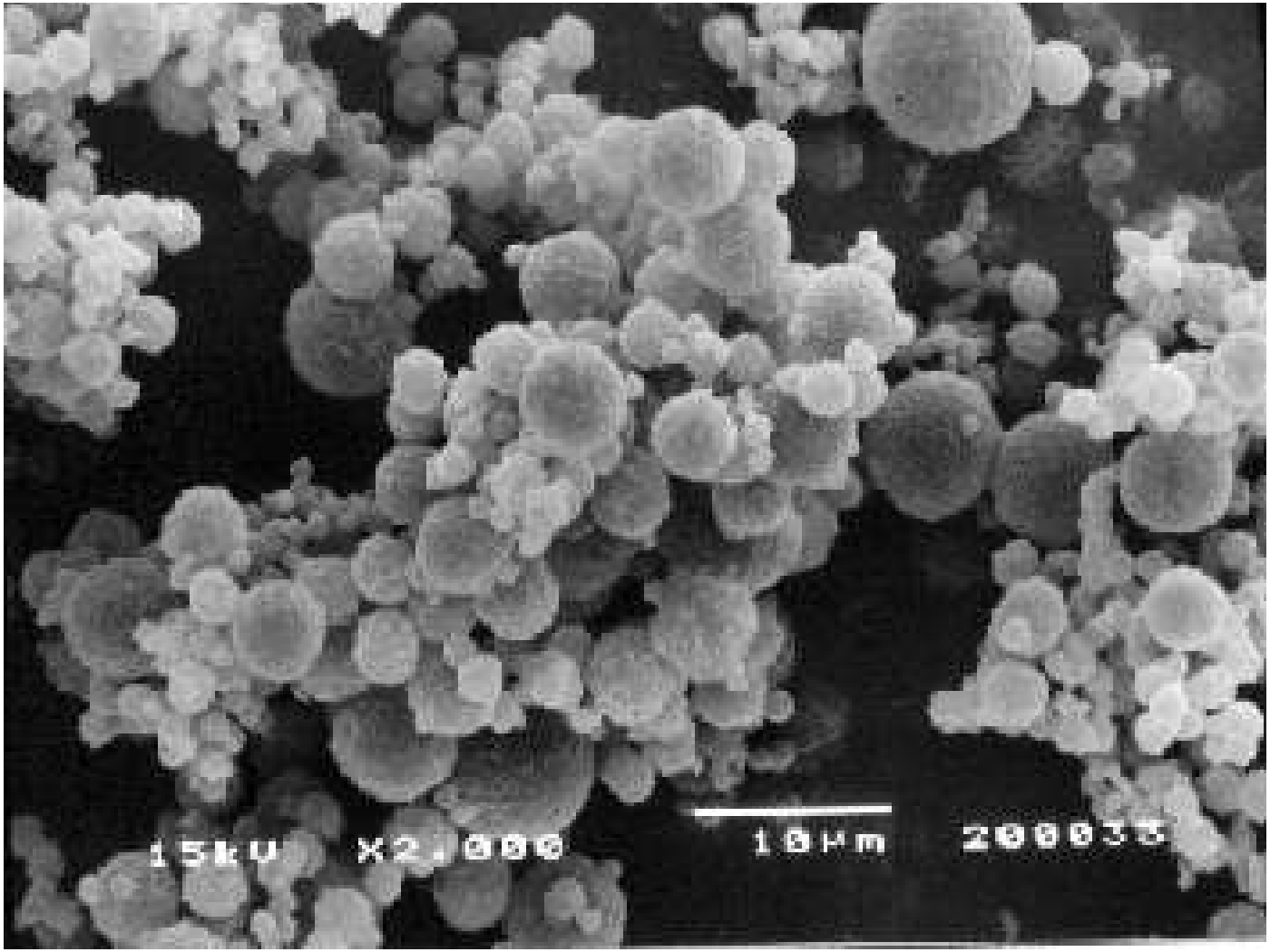
Purification of polyhydroxybutyrate produced by *Burkholderia cepacia* IPT64 through a chemical and enzymatic route

Daniel V. Suzuki · José M. Carter ·
Maria Filomena A. Rodrigues · Elda S. da Silva ·
Alfredo E. Maiorano

ipt

PHA em Sistemas de Liberação Controlada

Microcápsulas de PHA contendo ativo

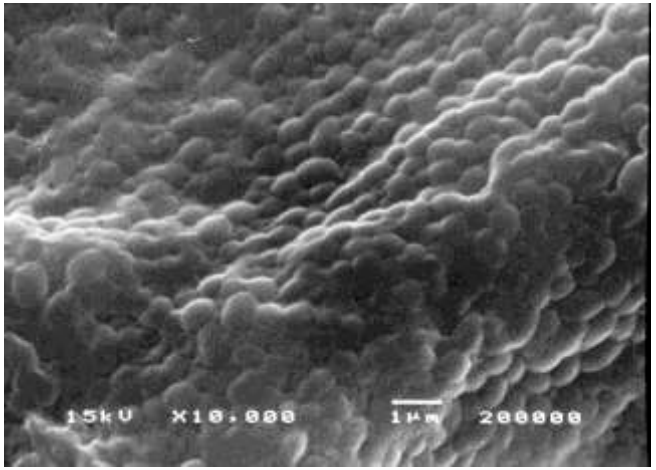


New PHB/PHPE microspheres obtained from *Burkholderia cepacia* as biodegradable drug delivery systems for photodynamic therapy

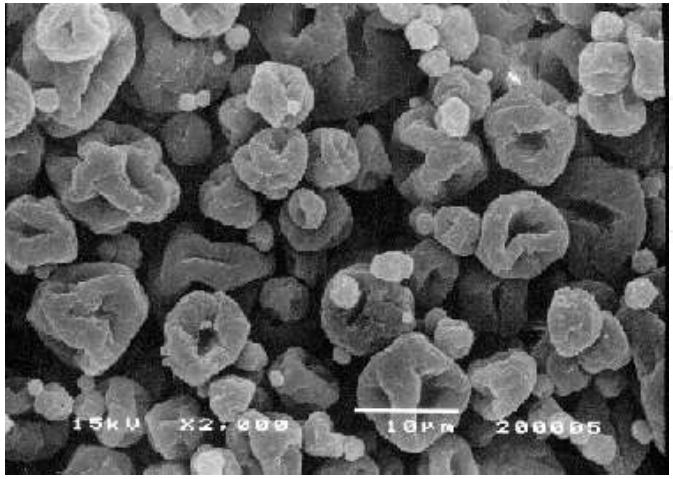
M. I. RÉ [1], M. F. A. RODRIGUES [2], E. S. SILVA [2] I. M. CASTRO [3]
A. R. SIMIONI [3], M. M. M. PELISSON [4], M. BELTRAME JR [4], A. C. TEDESCO [3]

ipt

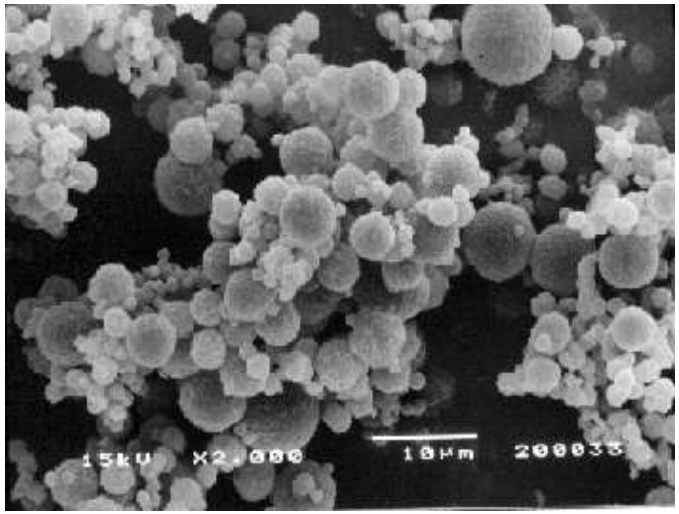
Process for production of biodegradable microparticles from granules in aqueous medium.



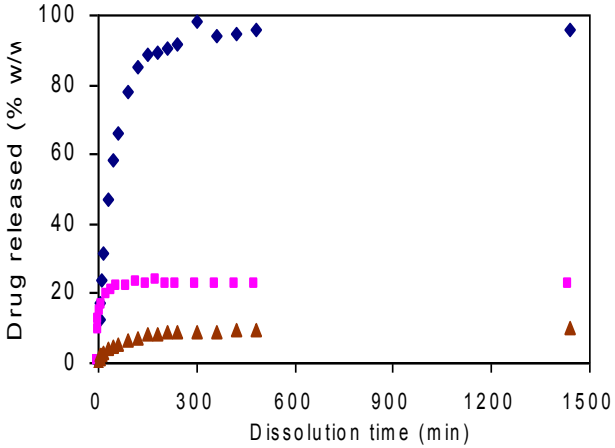
Granules of *B. cepacia* before (a) and after spray drying (b).



Granules of *B. cepacia* before (a) and after spray drying (b).

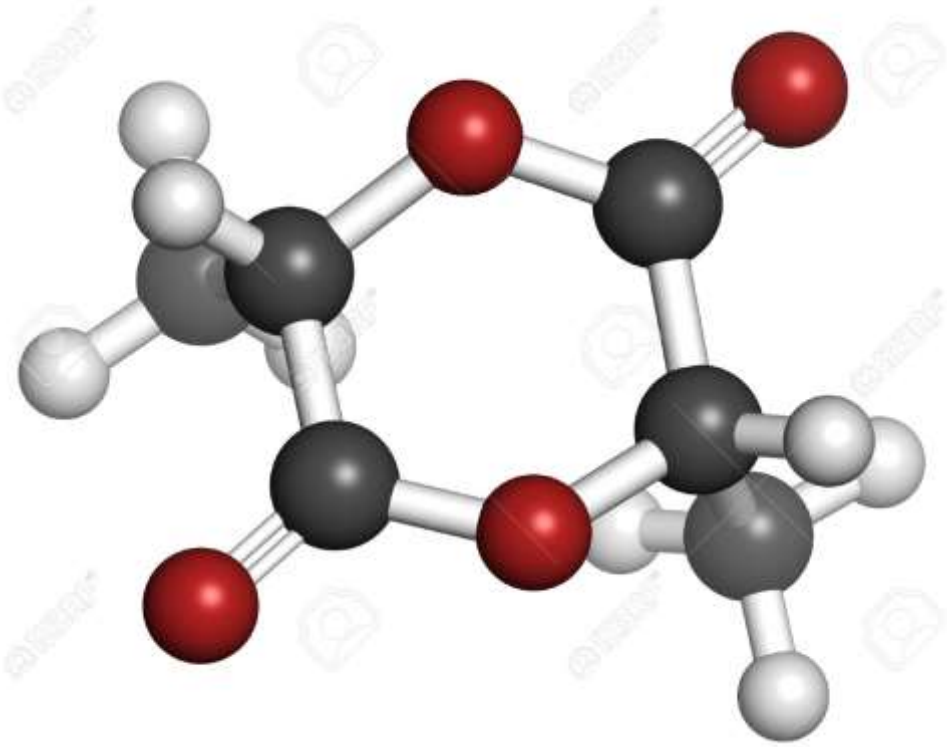


Spray-dried PHA particles loaded with Acetaminophen (drug : polymer of 1:1)



Acetaminophen release profiles from spray-dried PHA microparticles loaded with mass ratio of drug : polymer of (■) 1:1 and (▲) 4:1. The dissolution profile of the drug is presented as reference (◆).

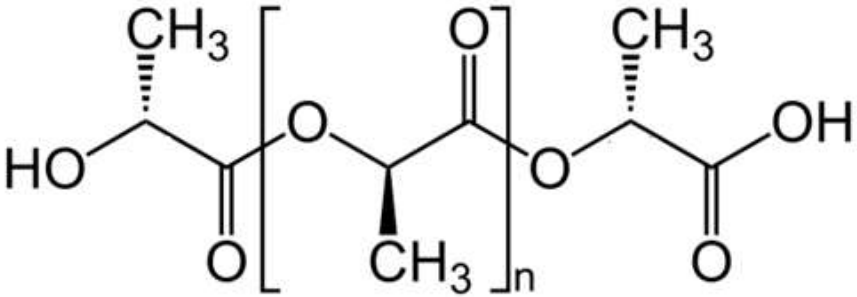
Polilactato - PLA



Polilactato - PLA

Estrutura do Polímero

O ácido polilático (PLA) é um polímero do tipo poliéster alifático.

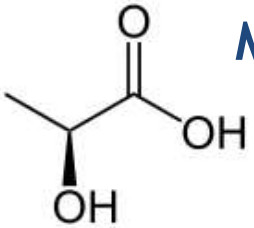


- biodegradável;
- biocompatível;
- pode ser produzido em massa.

Fonte: K.M. Nampoothiri, N.R. Nair, R.P. John, *Bioresource Technology*, 101 (2010) 8493-8501.

Polilactato - PLA

Monômero: Ácido Lático



PRODUÇÃO

BIOSSÍNTESE

Síntese Química

Fermentação

Adição de ácido cianídrico

CH_3CHO (Acetaldeído) + HCN (Ácido cianídrico) $\xrightarrow{\text{Catalisador}}$ $CH_3CHOHCN$ (Lactonitrila)

Hidrólise por H_2SO_4

$CH_3CHOHCN + H_2O + ½\ H_2SO_4 \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + ½\ (NH_4)_2SO_4$

Lactonitrila; Ácido sulfúrico; Ácido lático; Sal de amônia

Esterificação

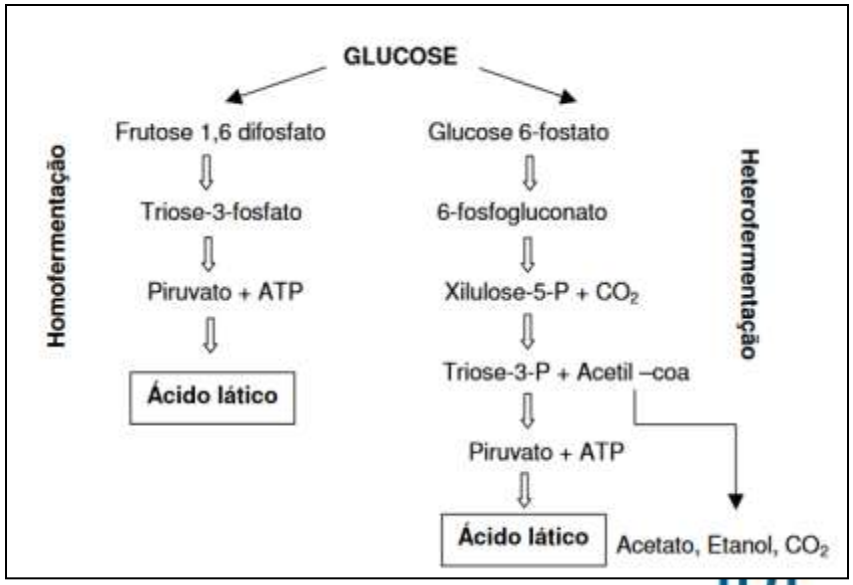
$CH_3CHOHCOOH + CH_3OH \longrightarrow CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O$

Ácido lático; Metanol; Metil lactato

Hidrólise por H_2O

$CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3OH$

Metil lactato; Ácido lático; Metanol



Fonte: M.R.A. Arcanjo, *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Ceará – Departamento de engenharia química, Fortaleza, 2014.

Biossíntese do Ácido Lático: Rota Biotecnológica

- Matérias-primas: di ou polissacarídeos tendo como base pentoses ou hexoses (como glicose, frutose e galactose);
- Micro-organismos: bactérias, principalmente láticas (homofermentativas e heterofermentativas);

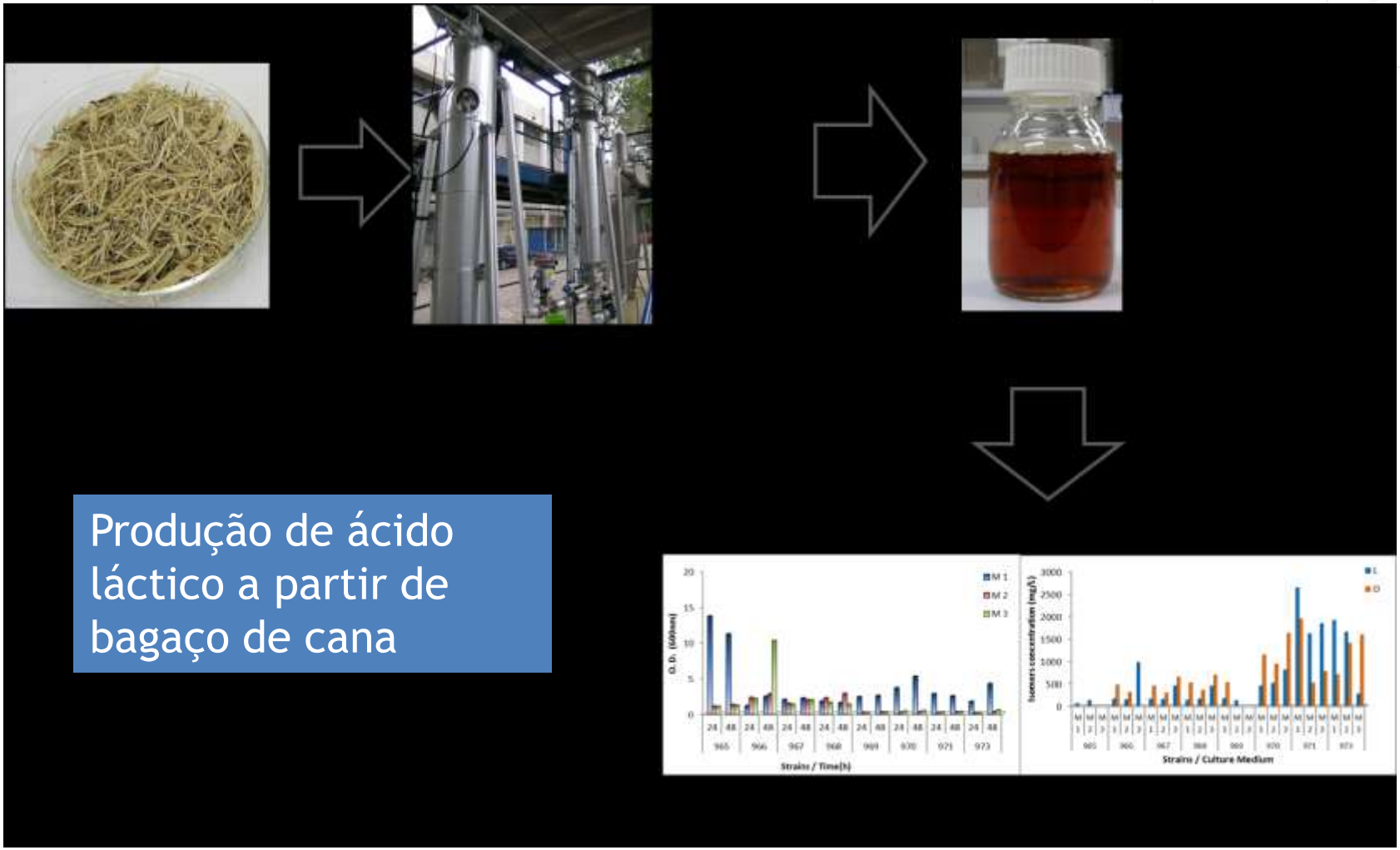
Vantagens sobre a rota química

- viabilidade econômica,
- menor consumo de energia
- Especificidade dos isômeros D e L (Leuconostocos para o isômero D e Streptococos para o isômero L);
- Fontes de carbono de menor custo renováveis: glicose, lactose, e resíduos que contenham açúcar, como melaço, soro de leite, bagaço de cana e de mandioca, e outros

Fonte: R. Ventura, *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

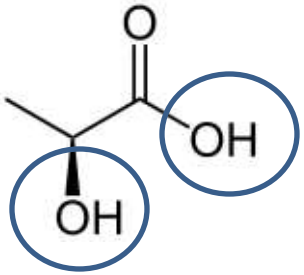
ipt

Biossíntese do Ácido Lático: Rota Biotecnológica



Polimerização

O ácido lático possui dois sítios de condensação (grupamentos álcool e ácido carboxílico)



(Policondensação)

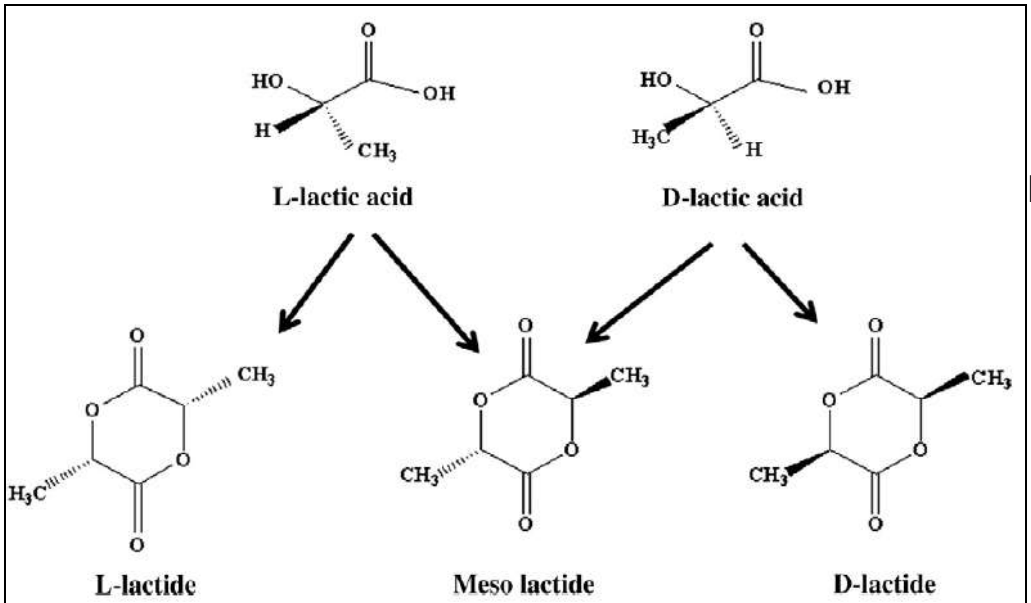
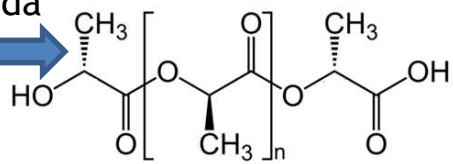


Fig. 1. Stereoforms of lactides.

Polimerização por abertura do anel e catalisada



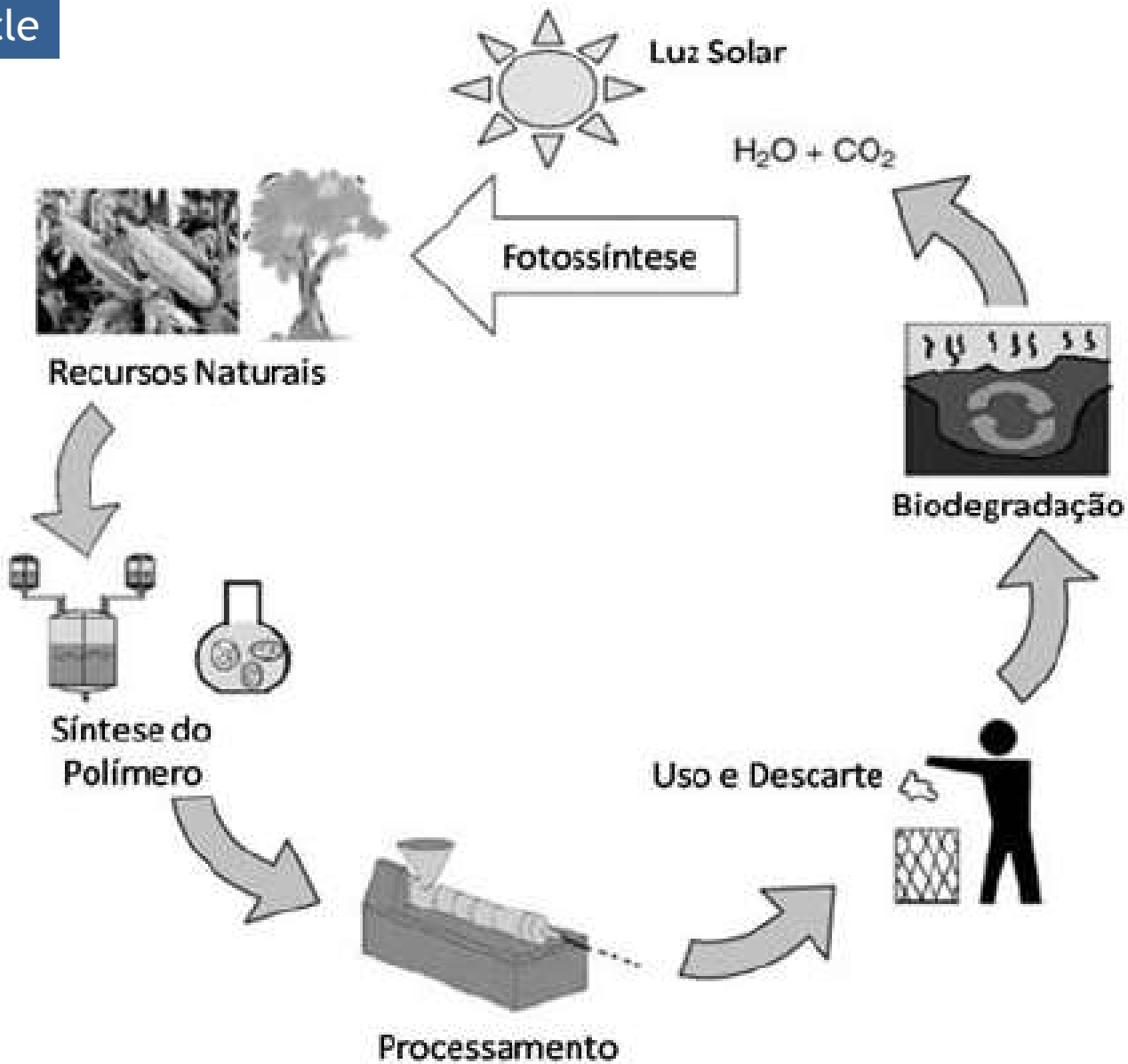
- Dímeros intermediários formados após remoção de água

Aplicações do PLA

- Embalagens e vestimentas descartáveis;
- Confecção de diversos produtos mimetizando PVC, LDPE, LLDPE, PP e PS;
- Aplicações como **dispositivos biomédicos**: suturas, *stents*, diálise e entrega controlada de medicamentos.

Fonte: Natureworks

Life-cycle



Ideal life cycle of biodegradable polymers from renewable resources (Brito et al, 2011) - Self-sustaining system.

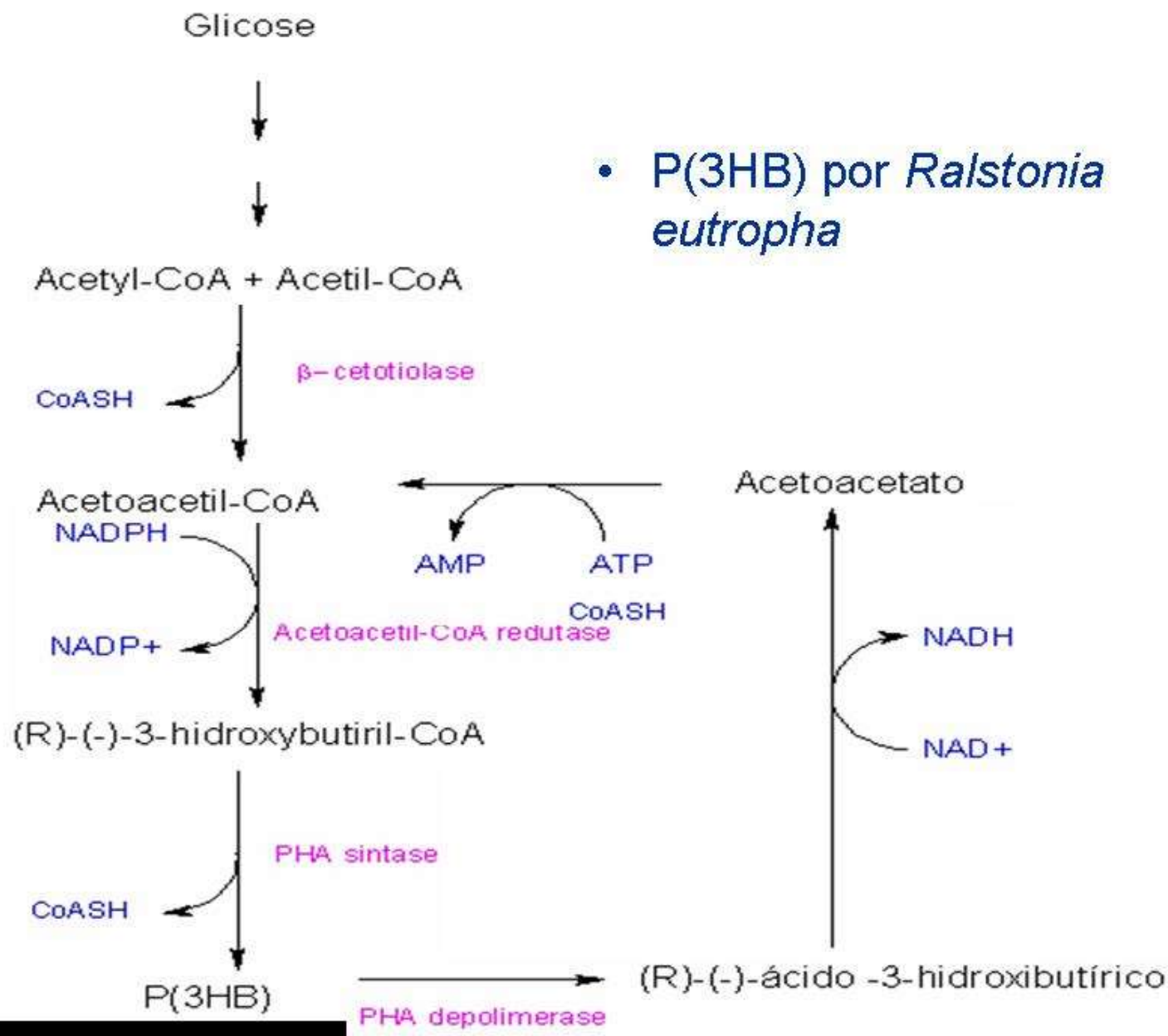
Biodegradação

Biodegradação de PHA

- intracelular

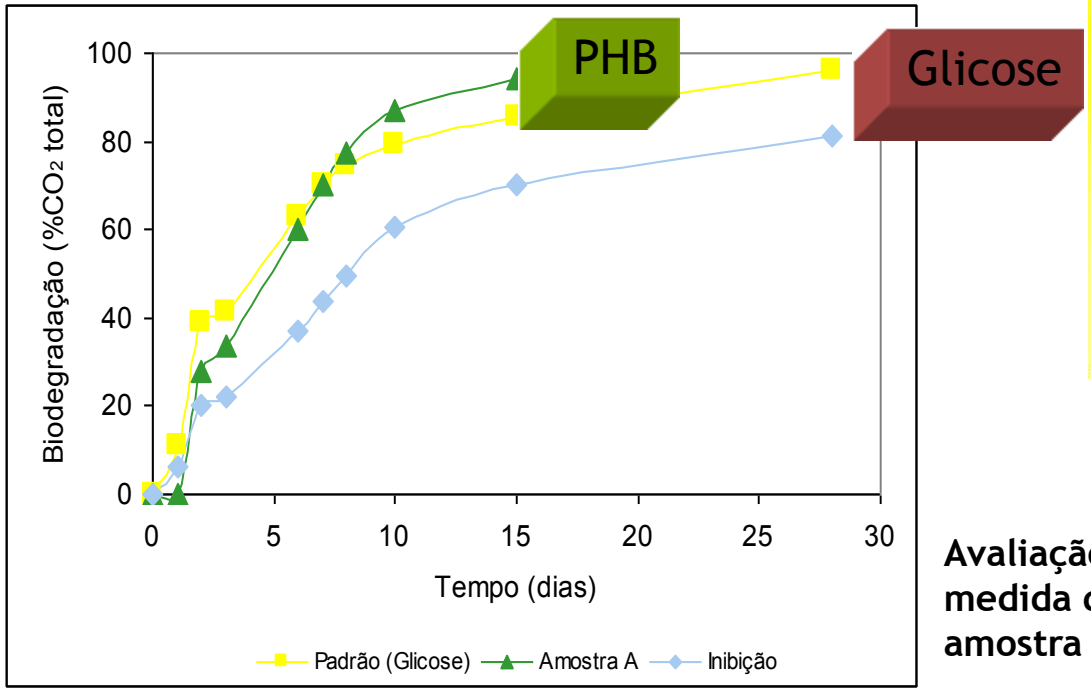
- extracelular

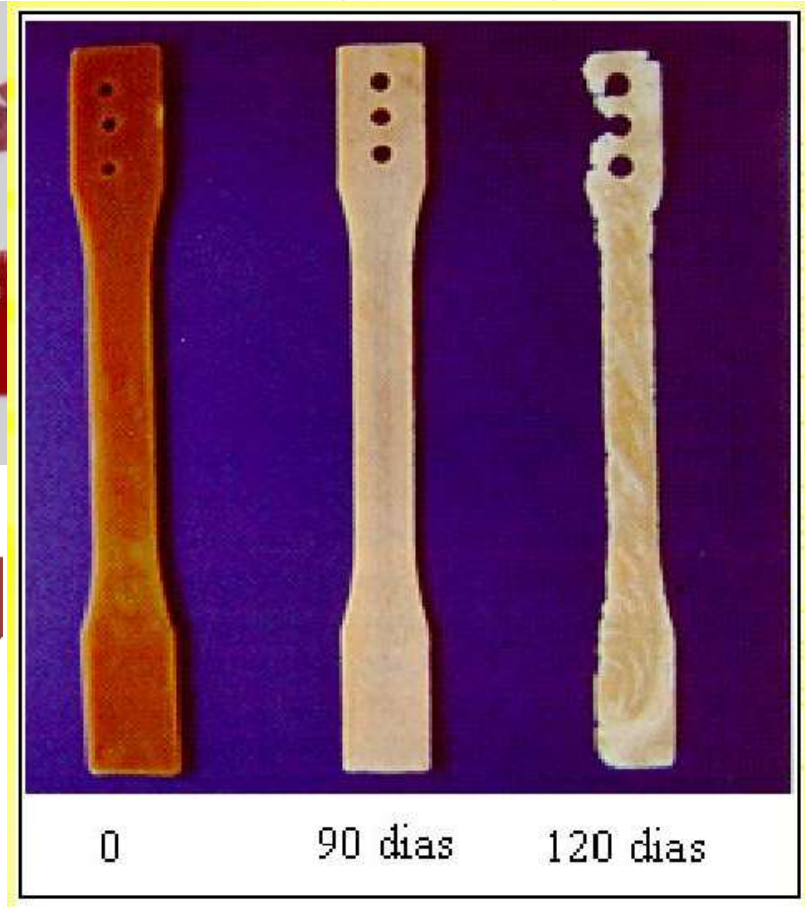
Metabolismo dos PHA



- P(3HB) por *Ralstonia eutropha*

Biodegradação of PHA





Avaliação da biodegradabilidade por medida do CO_2 liberado a partir de amostra de PHB

Biodegradação de PHA

Polímero	t_{10} (dias)
Sutura absorvível Vicryl ® (PLLA 8%-co-PGA 92%)	18,8
Sutura Dexon® (PGA)	22,9
Sutura PDS® (poly(p-dioxanona)	50,0
PHBV (20% HV) peso molecular de 300.000 Da	229,1
PHBV (12% HV) peso molecular de 350.000 Da	229,1
PHB (0% HV) peso molecular de 800.000 Da	104,2

Reduction of 10% in weight under phisiologic condictions (37ºC, pH 7,4) (HOLLAND, 1986; AMASS *et al.*, 1998).

ipt

Biodegradação de materiais poliméricos

ipt

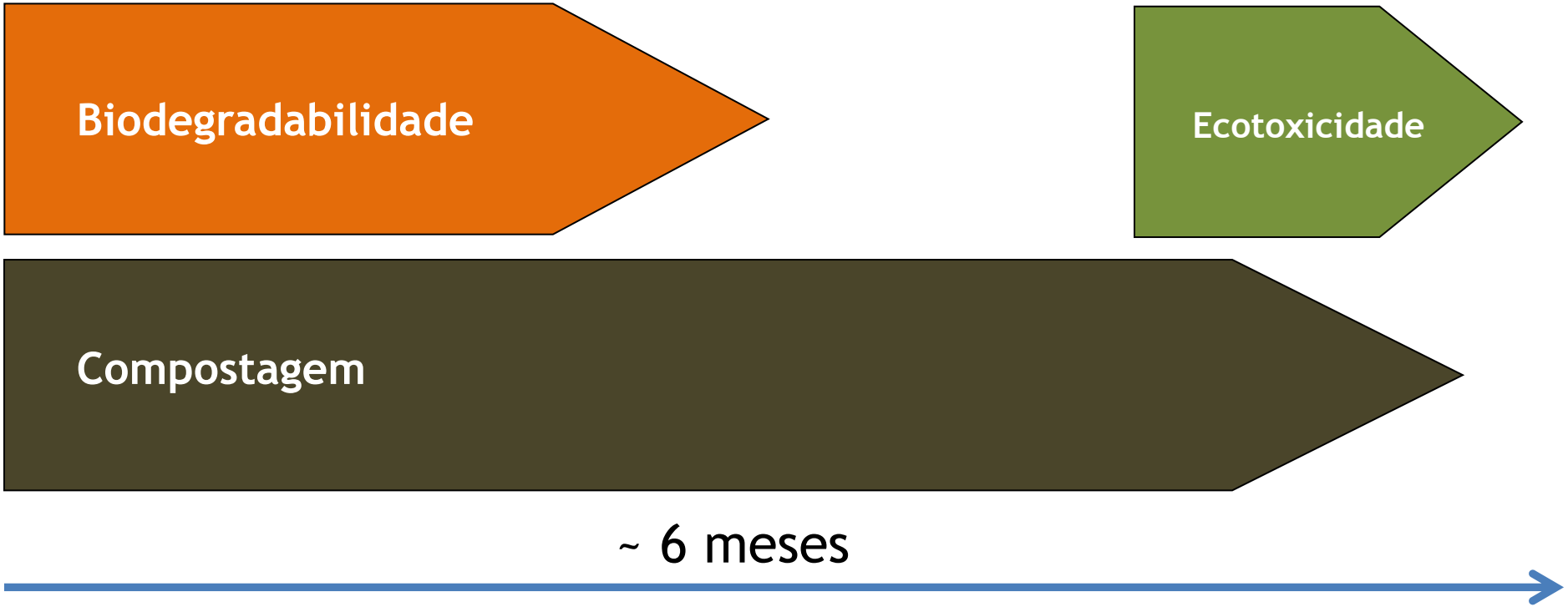
Biodegradabilidade aeróbia de embalagens plásticas

→ Associação Brasileira de Normas Técnicas

NBR 15448–1 e 15448–2

Resumo do Ensaio

ABNT NBR 15448-2:2008



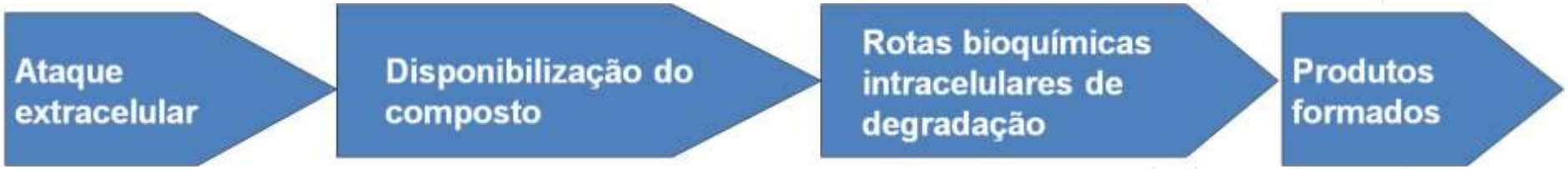
Biodegradação de materiais poliméricos

Impacto ambiental do descarte

Necessidade de testes de avaliação - rotulagem e venda

Apoio ao desenvolvimento de novos materiais

Etapas da Biodegradação

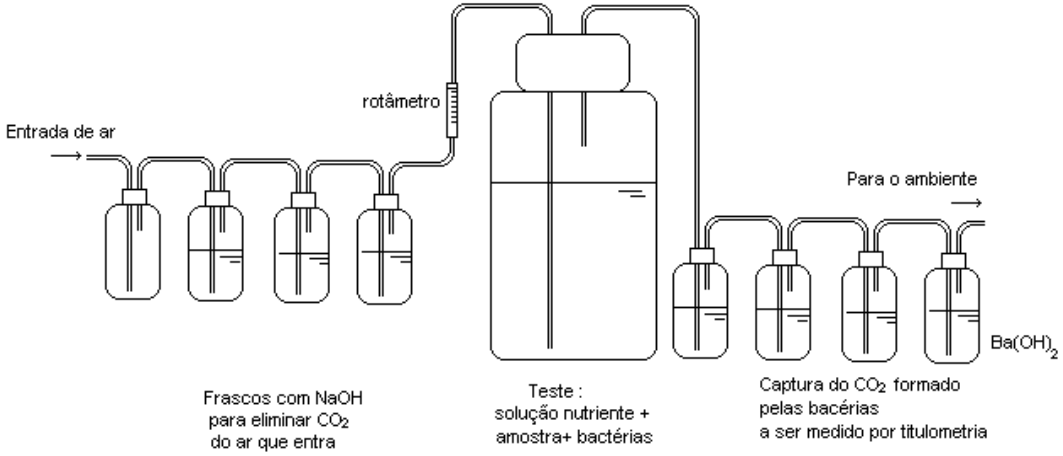


PROCESSOS ENZIMÁTICOS NA BIODEGRADAÇÃO

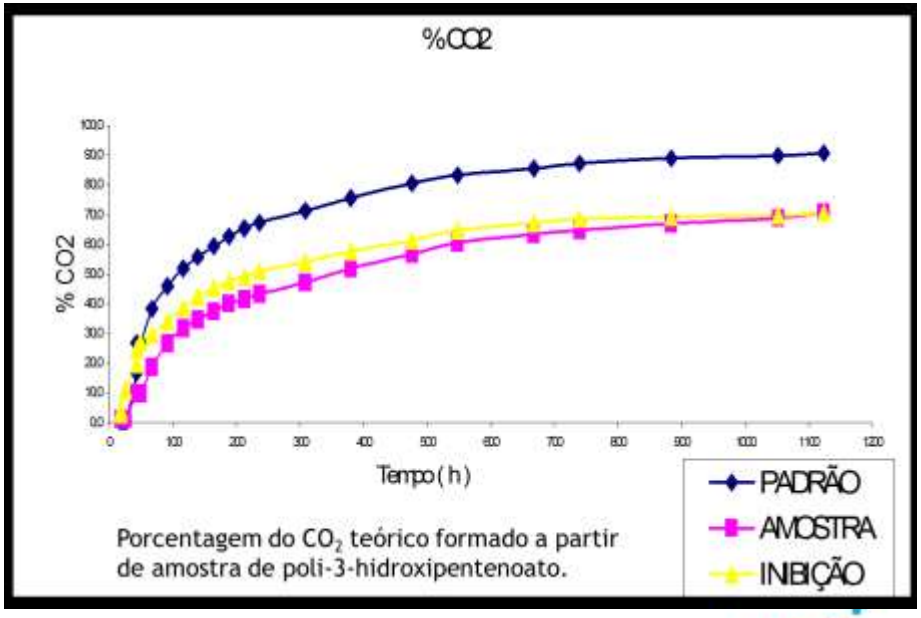
- Oxidação
- Hidroxilação
- Redução
- Hidrólise
- Descarboxilação
- Dehalogenação
- Conjugação
- Dealquilação

[redacted]

TESTES DE BIODEGRADABILIDADE



Desenho esquemático do teste de biodegradabilidade pela medida do CO_2 formado



Ensaio de Eco-toxicidade

BS EN 13432-2000
Requirements for packaging recoverable through composting and biodegradation. A.4

Determinar possíveis efeitos tóxicos de substâncias químicas sólidas ou líquidas incorporados ao solo.

Considerações Finais

- ✓ Os polímeros de origem fóssil vem sendo cada vez mais relacionados a problemas ambientais;
- ✓ O desenvolvimento de biopolímeros é uma importante alternativa;
- ✓ A área de biopolímeros é bastante vasta e a pesquisa pode ter diferentes abordagens;
- ✓ Devem-se intensificar os estudos para avaliação dos impactos ambientais causados por estes novos materiais biopolímeros <u>biodegradáveis</u> ou <u>não biodegradáveis;</u>
- ✓ Os estudos de biodegradabilidade devem estar disponíveis tanto nas etapas de desenvolvimento de novos materiais como também na avaliação de produtos de produtos finais.

ipt

Agradecimentos

Suporte financeiro

✓IPT

✓Fapesp

✓Finep

✓CNPq

✓Empresas privadas

ipt

Obrigada!

filomena@ipt.br
www.ipt.br