



Estudo de biodegradação de polímeros derivados de cacau utilizando microrganismos.

Palavras-Chave: biodegradação fúngica, compósito polimérico e metabólitos secundários.

Autores(as):

Jonatas Viana de Souza, IQ – UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). Taicia Pacheco Fill (orientadora), IQ - UNICAMP

1. INTRODUÇÃO:

Os polímeros conquistaram espaço como um dos materiais mais relevantes para a sociedade, devido a sua ampla aplicabilidade, versatilidade e praticidade, sendo muito utilizados no nosso dia a dia.^{1,2} A produção mundial de materiais plásticos aumentou exponencialmente de 2,3 milhões de toneladas para 367 milhões no período entre 1950 e 2020. Sendo que, em 2017 havia cerca de 6,3 bilhões de toneladas residuais desse material.³ O aumento constante e significativo da quantidade de materiais plásticos no meio ambiente se dá em razão da sua extensa utilização, gerando uma preocupação ecológica e econômica a nível global, já que parte do plástico descartado incorretamente não é facilmente degradado e causa severos danos ao meio ambiente.^{3, 4.}

Muitas estratégias têm sido utilizadas para mitigar os impactos ambientais causados pela poluição de plásticos, entre elas está o desenvolvimento de polímeros biodegradáveis. Surgindo então como uma alternativa promissora, a utilização de microrganismos para realizar a biodegradação desses materiais.¹

O presente projeto de pesquisa buscou estudar a degradação de um compósito polimérico formado por polietileno reciclado e resíduos da indústria de cacau brasileira, manufaturado pela empresa Afinko – Soluções em polímeros, utilizando o fungo filamentosso *Trichoderma harzianum*, isolado durante o estudo. Com o intuito de avaliar a biodegradação microbiana foi realizado ensaio mecânico de tração, para determinar o grau de degradação do material. O estudo previu também a análise dos metabólitos secundários que são produzidos pelo fungo em consequência da biodegradação, utilizando-se da técnica de espectrometria de massas de alta resolução. Dessa forma, nosso grande objetivo é determinar o potencial de degradação do novo material polimérico pelo fungo, assim como estudar possíveis moléculas que possam ter valor agregado e que sejam provenientes desta biodegradação.

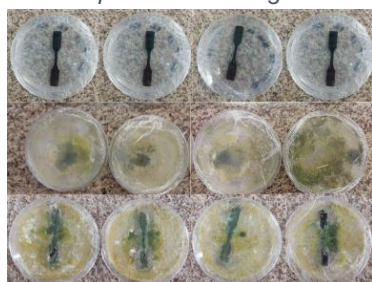
2. METODOLOGIA:

2.1 Identificação dos microrganismos: Houve o crescimento fúngico na superfície de grânulos poliméricos armazenados na empresa Afinko. Esse fungo foi isolado e identificado como *Trichoderma harzianum* pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA).

2.2 Estudos de biodegradação:

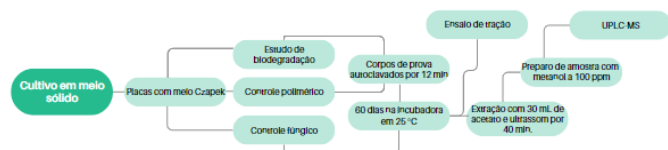
2.2.1 Cultivo em meio sólido: O material polimérico composto por uma matriz com 80% de polietileno reforçado com 20% de carga vegetal da casca de cacau foi esterilizado em autoclave por 12 minutos

Figura 1: Estudo de biodegradação, controle polimérico e fúngico.



para esterilização dos materiais. Em seguida, o material, em formato de corpo de prova, foi submetido ao estudo de biodegradação por 60 dias com o fungo *Trichoderma harzianum* em meio de cultivo Czapek. Para comparação, foi realizado o controle polimérico, em que não houve o crescimento fúngico. Também foi realizado um controle apenas com o crescimento do fungo em meio de cultura Czapek para posterior comparação metabólica. A figura 1 apresenta, de cima para baixo, o grupo controle polimérico (ausência do fungo), controle fúngico (ausência do polímero) e o estudo de biodegradação. A figura 2 apresenta o fluxograma completo desse experimento.

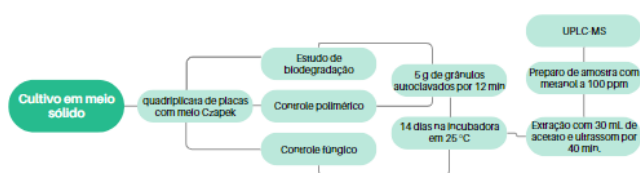
Figura 2: Cultivo em meio sólido com os corpos de prova.



O estudo de biodegradação também foi realizado com o composto no formato de grânulos. Para isso, partiu-se de 5 gramas de grânulos poliméricos, e avaliou-se a

biodegradação do material no período de 14 dias, como apresentado no fluxograma da figura 3. Para efeito de comparação, foi realizado o experimento de controle fúngico, em que o microrganismo cresceu

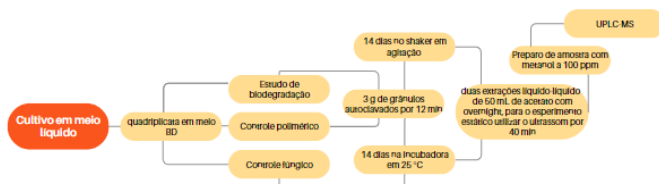
Figura 3: Cultivo em meio sólido com grânulos poliméricos



na ausência do polímero. O propósito era demonstrar que os possíveis produtos eram provenientes da biodegradação e não do metabolismo fúngico.

2.2.1 Cultivo em meio líquido: O cultivo também foi realizado utilizando 50 mL do meio líquido BD (batata dextrose), partindo de 3 gramas de grânulos poliméricos, também esterilizados em autoclave por

Figura 4: Cultivo em meio líquido com e sem agitação.



12 minutos. O fluxograma da figura 4 apresenta o experimento, no qual foram realizados o controle polimérico (ausência do fungo), controle fúngico (ausência do polímero) e o estudo de biodegradação. O cultivo foi realizado em duas

condições diferentes, a primeira mantida durante 14 dias na incubadora a 25°C e a segunda mantida durante 14 dias em agitação a 120 RPM (rotações por minuto) e a 25°C.

2.3 Preparo das amostras para determinação do potencial de biodegradação:

2.3.1 Cultivo em meio sólido: Os corpos de prova foram removidos, ao final dos 60 dias, e imersos em álcool etílico 70% durante 15 minutos, com o intuito de eliminar o microrganismo remanescente na superfície do material polimérico. Os extratos dos cultivos em meio sólido foram preparados utilizando 30 mL de acetato de etila com agitação por 40 minutos em banho ultrassom. Posteriormente foi realizada a filtração a vácuo e as amostras foram secas sob fluxo de nitrogênio. Em seguida, as amostras foram filtradas em filtros PTFE 0.22 e submetidas a análises de UPLC-MS.

2.3.2 Cultivo em meio líquido: Os extratos do cultivo em meio líquido foram preparados a partir de duas extrações líquido-líquido utilizando 50 mL acetato de etila. Por fim, todas as amostras foram filtradas e secas sob fluxo de nitrogênio. Posteriormente, as amostras foram analisadas via UPLC-MS.

2.4 Análises de desreplicação por UPLC-MS: Foram realizadas análises via cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com ionização por electrospray em um aparelho triplo-quadrupolo Q executive com analisador orbitrap (MS/MS).

2.5 Ensaios mecânicos: Os polímeros, em formato de corpo de prova, foram enviados para a empresa fornecedora para realizar o ensaio mecânico de tração.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.2 Cultivo em meio sólido com grânulos poliméricos:

Foi realizada a análise estatística de componentes principais (PCA), utilizando o programa MetaboAnalyst, para avaliar a inter-relação entre o número de variáveis através da combinação linear dos dados originais, e o VIP Scores, uma medida da importância de uma variável na análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLSDA). Os gráficos 1 e 2 apresentam o PCA bidimensional (2D) e o PCA loadings, respectivamente. O gráfico de PCA 2D indica

Gráfico 1: PCA scores do cultivo em meio sólido

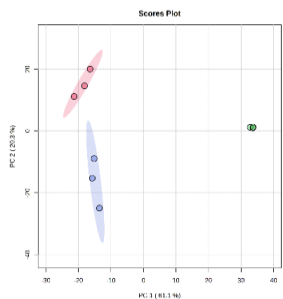
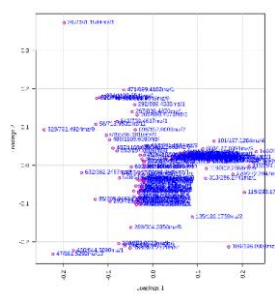


Gráfico 2: PCA loadings do cultivo em meio sólido



a alteração metabólica do fungo no estudo de biodegradação em comparação ao controle fúngico (CFS em vermelho) e o controle polimérico (CPS em verde), uma vez que se encontram em regiões distintas do gráfico. Observa-se que a interação com o compósito polimérico modificou o metabolismo do fungo quando comparado com o controle fúngico

(crescimento sem a presença do polímero). O PCA loadings, gráfico 2, apresenta a composição das componentes principais em relação às variáveis, portanto, exibindo as variáveis que são díspares e que indicam a modificação do processo metabólico. A comparação entre os cromatogramas do estudo de biodegradação e o controle fúngico indicam o acúmulo de alguns metabólitos secundários ou até mesmo

a indução de compostos no experimento de biodegradação. Desta maneira, o próximo passo é a tentativa de identificar essas variáveis e verificar se possuem importância e valor agregado.

Figura 5: VIP scores do cultivo em meio sólido.

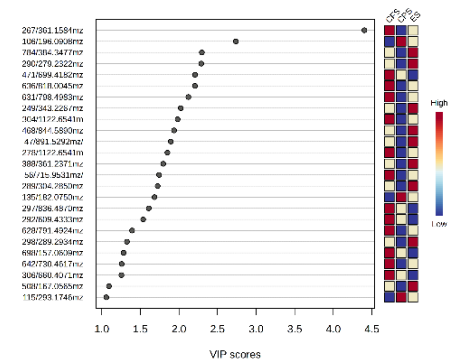


Figura 5 apresenta o gráfico de VIP scores com as 25 principais variáveis. O gráfico demonstra a maior intensidade ou única presença de uma variável (High) comparando com os três grupos de amostra (controle polimérico (CPS), controle fúngico (CFS) e estudo de biodegradação (ES)).

O estudo visa identificar se essas variáveis são produtos da biodegradação ou produtos advindos da interação fungo-polímero.

3.3. Cultivo em meio líquido: O cultivo em meio líquido mantido durante 14 dias na incubadora apresentou pigmentação verde nas amostras do estudo de biodegradação (na presença do polímero)

Figura 6: cultivo em meio líquido, da esquerda para direita CPLE, CFLE e ELE.



em relação às amostras do controle fúngico (sem a presença do polímero). A figura 6 evidencia essa disparidade, que pode potencialmente indicar uma diferença no processo metabólico na presença do composto. Os gráficos 3 e 4 expressam, respectivamente, as análises estatísticas de componentes principais (PCA) bidimensional scores e loadings, que foram obtidas utilizando o programa MetaboAnalyst. Novamente o gráfico de PCA 2D expressa a disparidade do processo metabólico do fungo, em razão das amostras se encontrarem em regiões distintas, no qual, CPLE (em vermelho) é o controle polimérico, CFLE (em verde) é o controle fúngico e

Gráfico 3: PCA scores do cultivo em meio líquido estático

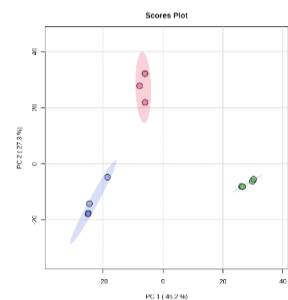
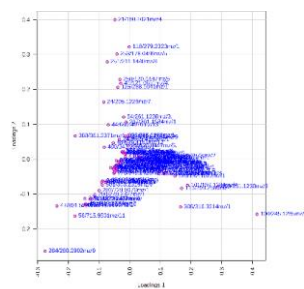


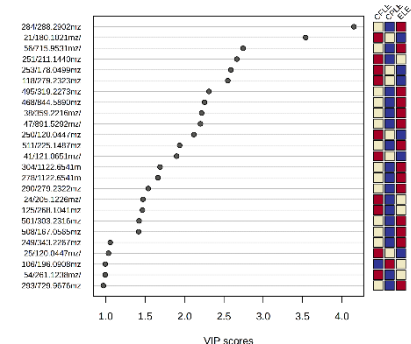
Gráfico 4: PCA loadings do cultivo em meio líquido estático



ELE (em azul) é o estudo de biodegradação, e o PCA loadings as variáveis que são díspares.

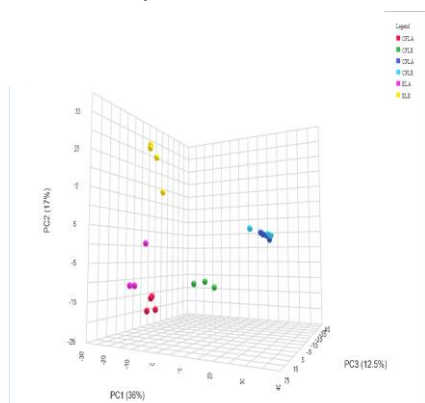
O gráfico da figura 6 é VIP Scores do cultivo em meio líquido estático com as 25 principais variáveis que representam as fundamentais diferenças entre o controle polimérico (CPLE em verde), controle fúngico (CFLE em vermelho) e o estudo de biodegradação (ELE em azul)

Figura 6: VIP scores do meio líquido estático



Por fim, o cultivo em meio líquido com agitação apresentou maior semelhança com o controle fúngico do que o cultivo sem agitação. O gráfico 5 apresenta a análise estatística de componentes principais (PCA) tridimensional com ambos os cultivos líquidos, no qual, CPLA é o controle polimérico com agitação (azul escuro), CPLA é o controle fúngico com agitação (vermelho) e ELA é o estudo de biodegradação com agitação (rosa). O gráfico também apresenta o CPLE (azul ciano), CFLE (verde) e ELE (amarelo). Desta maneira, o

Gráfico 5: PCA 3D comparando ambos os cultivos líquidos



estudo de biodegradação sem agitação possui maior disparidade do seu controle comparado a condição em agitação.

4. CONCLUSÕES:

A interação entre o fungo *Trichoderma Harzianum* e o compósito polimérico com pó da casca do cacau apresentou diferenças significativas. As análises estatísticas expressam uma disparidade no processo metabólico do fungo ao interagir com o compósito.

A identificação desses possíveis metabólitos produzidos ou inibidos ainda devem ser realizadas, assim como novos ensaios de tração para verificação do grau de degradação do material, uma vez que os ensaios não foram bem-sucedidos. Além disso, o cultivo no meio líquido estático apresentou maiores disparidades no metabolismo fúngico quando comparado com o cultivo no meio líquido com agitação, desta forma, a maneira de cultivo influencia na interação fungo-polímero.

Os primeiros ensaios de tração foram inconclusivos devido a grandes variações entre as replicatas, sendo assim, novos ensaios deverão ser realizados.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Almeida, A. C., Pontes, J. G., Alvarenga, G. R., Finocchio, H., Fill, T. P., (2021). **The sustainable cycle of a new cacao-based bioplastic: from manufacturing to exploitable biodegradation products**. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/ra/d1ra04432j>. Acesso em: 18/07/2023.
- [2] Cruz, S. A., Oliveira, E. C., Oliveira, F. C., Garcia, P. S., Kaneko, M. L., (2011). **Polímeros reciclados para contato com alimentos**. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/po/a/nySXr8srkrNh68Sg8XzFctd/?format=html&stop=next&lang=pt>. Acesso em: 18/07/2023.
- [3] Abrantes, A. C., Borges, E.R., Bassin, I. S., (2022). **Impacto das medidas de controle da pandemia de Covid-19 na geração de resíduos plásticos – Uma pesquisa com a comunidade acadêmica da UFRJ**. Disponível em: <https://pantheon.ufrj.br/bitstream/11422/16703/1/ACCAbrantes.pdf> Acesso em: 18/07/2023
- [4] Parker, Laura. (2018). We made plastic. We depend on it. Now we're drowning in it. National Geographic. Disponível em: <https://www.nationalgeographic.com/magazine/article/plastic-planet-waste-pollution-trash-crisis>. Acesso em: 19/07/2023.