
Polihidroxibutirato (PHB) microbiano con potencial para aplicaciones médicas: Obtención y Caracterización

Diana Catalina Arcila Echavarría
Universidad de Antioquia, catalina.arcila@gmail.com

Resumen

Los materiales para aplicaciones médicas requieren ser biocompatibles, de tal manera que cumplan su función sin perjuicio de la salud humana. Los polihidroxicanoatos (PHAs) de origen microbiano son materiales poliméricos que dadas sus características han sido reportados para aplicaciones biomédicas, sin embargo su producción aún no es económicamente viable debido a los altos costos de producción, siendo uno de los factores que más aporta, el costo de los medios de cultivo para su obtención. En este estudio se evaluó la producción de PHA a partir de *Ralstonia eutropha* usando como fuente de carbono el hidrolizado de raquis de palma (HRP). En el proceso de obtención se evaluaron variables, tales como: concentración de inóculo, fuente de nitrógeno y relación C/N, que favorecieran la acumulación del biopolímero y en la etapa de extracción se evitó el uso de solventes que afectaran de manera negativa la posible aplicación del material. Por último, el material se identificó por Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) y se caracterizó térmicamente mediante un análisis calorimétrico (DSC). El PHA obtenido presentó características similares al Polihidroxibutirato (PHB) comercial y se concluyó que el hidrolizado de raquis es un buen sustrato para la biosíntesis de este biomaterial, lo cual permite valorizar este subproducto de la industria palmicultora colombiana.

Palabras clave: Polihidroxicanoato, polihidroxibutirato, hidrolizado de raquis de palma, biocompatibilidad.

Abstract

Materials for medical applications need to have biocompatibility, so that they fulfill their function without prejudice to human health. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) of microbial origin are polymeric materials due to their characteristics have been reported for biomedical applications, however their production is not economically feasible due to the high cost of production, even culture media for their preparation is a factor that affect in higher quantity than others. In this study the production of PHA was evaluated from *Ralstonia eutropha* using as a carbon source hydrolyzate rachis of palm (HRP). In the process of obtaining, some variables as a: inoculum concentration, nitrogen source and ratio C/N, were evaluated, it was looking for improving the biopolymer acumulation. In the extraction stage the use of solvents negatively affecting the possible application of the material is avoided. Finally, the material was identified by infrared spectroscopy with Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and thermally characterized by a Differential Scanning Calorimetry (DSC). The PHA obtained had characteristics similar to Polyhydroxybutyrate (PHB) commercial and concluded that the hydrolyzate rachis is a good substrate for the biosynthesis of this biomaterial, which can enhance this product of the Colombian oil palm industry.

Keywords: Polyhydroxyalkanoates, polyhydroxybutyrate, hydrolyzates rachis of palm, biocompatibility.

1 Introducción

Los Polihidroxialcanoatos (PHAs) son biopolímeros de origen microbiano de alto valor agregado; entre ellos el Polihidroxibutirato (PHB) cuenta con propiedades que le permiten tener una amplia variedad de aplicaciones, entre ellas la biomédicas, las cuales se deben a su biocompatibilidad con el tejido humano y reabsorbido a una baja velocidad. Cuando este material se implanta en el cuerpo se hidroliza en metabolitos biocompatibles, por lo que se ha usado como hilo para sutura, sustitutos pericárdicos y sistemas de liberación de medicamentos. También se ha propuesto usarlos para fabricar jeringas desechables y lubricantes para guantes de cirugía. Dentro de las aplicaciones biomédicas, también está su uso como material osteosintético o de fijación para estimular la formación de hueso, así como el uso de sus productos de hidrólisis como materia prima para la industria farmacéutica en la que se requieren moléculas estero específicas (González, Meza, González, & Córdova, 2013).

Sin embargo, estos biopolímeros de origen microbiano o PHAs no son competitivos con los polímeros de origen petroquímico debido a sus altos costos de producción. El costo total de producción de los PHAs depende del microorganismo (rendimiento y productividad), los sustratos utilizados como fuente de carbono y nitrógeno, las condiciones de la fermentación (temperatura, aireación, pH) y los procesos de recuperación y purificación. La fuente de carbono puede contribuir entre un 25 – 45% del costo total de producción (Naranjo, Posada, Higuita, & Cardona, 2013). Por lo cual se está trabajando en encontrar fuentes de carbono no convencionales, entre ellos los residuos agroindustriales.

Siendo Colombia el cuarto productor de aceite de palma a nivel mundial, está generando 1,2 Millones de Toneladas de biomasa lignocelulósica, en el proceso de extracción del aceite, representada por

los racimos de frutos vacíos o raquis y la fibra (Fedepalma, 2012). Dada la disponibilidad de estos residuos agroindustriales en el país y de la posibilidad de ofrecer un mayor valor agregado para ellos, la Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite (Cenipalma), creada en 1991 con el propósito de generar, adaptar, validar y transferir tecnología en el cultivo de la palma de aceite, su procesamiento y su consumo, ha definido su plan de investigación e innovación, con el fin de investigar física, química y mecánicamente el proceso de extracción del aceite de palma para reducir pérdidas, optimizar el volumen, mejorar la calidad del aceite y hacer un uso eficiente de la energía, así como investigar sobre sus usos alternativos (oleoquímica) y el aprovechamiento de los subproductos (biomasa) propios de la actividad palmicultora.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, este estudio propone obtener un biopolímero con potencial para aplicaciones biomédicas a partir de una materia prima nacional renovable y económica.

2 Metodología

Las etapas y metodología empleadas en el estudio se describen a continuación.

2.1 Revisión bibliográfica

Esta etapa se ha realizado durante todo el proyecto haciendo uso de bases de datos como: Bio One, Scopus y Science Direct, disponibles en la Universidad de Antioquia, además se ha utilizado el programa Mendeley para la sistematización de los artículos y generación de la bibliografía para presentar los artículos y/o informes.

2.2 Técnicas analíticas

La determinación del crecimiento microbiano se realizó por determinación del peso seco (Quillaguanán, Delgado, Mattiasson, & Hatti-Kaul, 2006), los

azúcares reductores se cuantificaron por el método DNS (Miller, 1959) y la glucosa mediante el kit de glucosa oxidasa (BioSystem S.A.). El PHA se extrajo mediante la metodología propuesta por Yu y Chen, 2006, en el cual inicialmente se esteriliza la biomasa para inactivar el microorganismo y posteriormente se realiza la disrupción de la membrana celular mediante digestión ácida. Se realizó blanqueamiento usando hipoclorito de sodio, luego de realizar varios lavados se secó hasta peso constante.

El rendimiento biomasa – sustrato se definió como el cociente entre el incremento de masa celular obtenida y el consumo de sustrato:

$$Y_{(x/s)} = g \text{ biomasa seca} / g \text{ sustrato consumido}$$

Mientras que la productividad se definió como el cociente entre la cantidad de producto obtenido y el volumen por el tiempo de fermentación:

$$Q = g \text{ producto} / \text{Volumen tiempo}$$

El material se caracterizó químicamente por Infrarrojo con Transformada de Fourier, además se obtuvieron sus propiedades térmicas mediante un Análisis Diferencial de Calor (DSC).

2.1 Métodos

2.1.1 Adecuación y caracterización de la fuente de carbono

La adecuación del raquis de palma se realizó siguiendo los protocolos establecidos previamente en el grupo de Bioprocesos (UdeA), producto del desarrollo de proyectos anteriores (Peñuela, 2013). El raquis requiere para su uso como fuente de carbono de pretratamientos como la disminución de tamaño, la remoción de lignina a través del uso de NaOH y la hidrólisis enzimática. Esta última se hizo con la enzima Acellerase 1500. La caracterización de este material se realizó mediante protocolo de NREL estandarizado por el grupo de Bioprocesos (UdeA).

2.1.2 Obtención del PHB: Para la obtención del material se estandarizaron variables como: concentración de inóculo, fuente de nitrógeno, relación C/N.

2.1.2.1 Concentración de inóculo: se evaluaron tres concentraciones: 0,5 g/l, 1.0 g/l y 1,5 g/l.

2.1.2.2 Fuente de nitrógeno: se evaluaron tres condiciones: Extracto de Levadura, Sulfato de Amonio y sin N.

2.1.2.3 Relación C/N: Se evaluaron cuatro niveles: 10, 20,40 y 57.

3 Resultados y discusión

Para la obtención del PHA se encontraron como condiciones que favorecen los rendimientos y la productividad trabajar con una concentración de inóculo de 1 g/l, usar como fuente de nitrógeno Sulfato de Amonio y tener una relación C/N de 40. Con estas condiciones y usando como fuente de carbono (FC) el hidrolizado del raquis de palma se obtuvieron los resultados presentados en la tabla 1, en términos de rendimiento de biomasa y productividad, los cuales se comparan con los resultados obtenidos al usar como FC glucosa pura.

Tabla 1. Rendimientos y productibilidades de las FC evaluado a las 48 horas

FC	Y _{xs} g biomasa/g sustrato	Q g producto /L.h
Re. Glucosa	0,16	22,8
Re. Raquis	0,17	17,3

Para la verificación del tipo de PHA obtenido se realizó infrarrojo usando como patrón un estándar del PHB. En la figura 1, se muestran los espectros del estándar y del material obtenido usando como FC glucosa e hidrolizado de raquis.

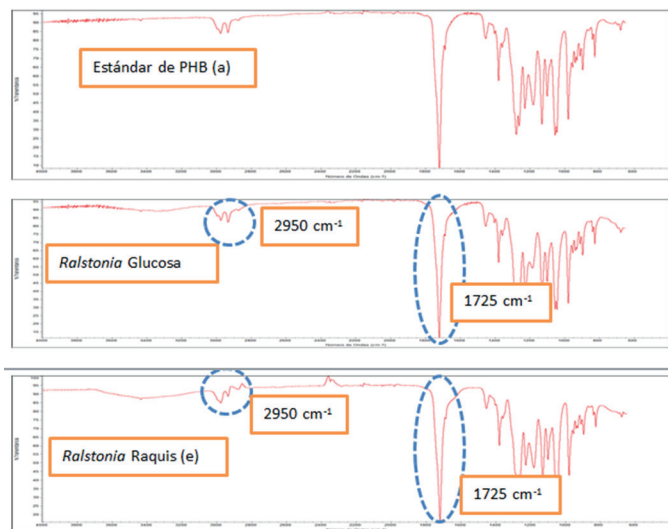


Figura 1. Infrarrojos obtenidos con *Ralstonia eutropha* con las diferentes fuentes de carbono.

El resumen de las propiedades térmicas del material obtenido se presenta en la tabla 2. Con estos resultados se confirma que con *Ralstonia eutropha* el material obtenido fue PHB, encontrando que los valores más cercanos al PHB comercial fueron los encontrados para el PHB obtenido usando como FC el hidrolizado de raquis.

Tabla 2. Propiedades Térmicas del Biopolímero

Polímero	T _m (°C)	T _g (°C)	T _{cc} (°C)	ΔH _m (J/g)	X _c (%)
PHB (Ralstonia – Raquis)	169	3,7	46	87	60
PHB (Ralstonia – Glucosa)	167	-10,8	40	49	34
PHB Comercial*	175,4	3,5	48	99	68

*(Tanadchangsang & Yu, 2012)

4 Conclusiones y recomendaciones

Las propiedades identificadas en el biopolímero obtenido, permitieron establecer que el tipo de PHA producido fue Polihidroxiburato (PHB).

Por lo tanto podría emplearse en la obtención de materiales con aplicaciones biomédicas entre ellas: hilo para sutura, sustitutos pericárdicos y sistemas de liberación de medicamentos.

El PHB que se obtuvo con *Ralstonia eutropha* en hidrolizados de raquis de palma, presentó propiedades térmicas similares a las del biopolímero comercial (PHB). Por lo tanto, este sustrato se constituye en una buena FC no convencional para la obtención de este material.

Se recomienda realizar pruebas de toxicidad y biocompatibilidad con el fin de garantizar la seguridad del paciente.

Realizar una valoración técnico-económica para establecer la viabilidad de producción de PHB a una escala mayor, considerando para ello una aplicación que permita darle un mayor valor agregado, como las aplicaciones médicas.

Agradecimientos

La autora agradece el apoyo económico, Convocatoria Estrategia de Sostenibilidad 2013-2014 de la Universidad de Antioquia.

Referencias

Alvero, C. 1998, Ingeniería Bioquímica. Madrid. Ed. Síntesis.

Davis, R., Kataria, R., Cerrone, F., Woods, T., Kenny, S., O'Donovan, A., ... O'Connor, K. E. (2013). Conversion of grass biomass into fermentable sugars and its utilization for medium chain length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) production by *Pseudomonas* strains. *Bioresource Technology*, 150, 202–9. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.001>

Fedepalma. (2012). Anuario estadístico: La agroin-

dustria de la palma de aceite en Colombia y en el mundo (Edición Ge). Bogotá. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Anuario+Estadístico#0>

Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N. L., & Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144, 73–95. <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>

González, Y., Meza, J. C., González, O., & Córdova, J. A. (2013). Síntesis y Biodegradación de Polihidroxicanoatos: Plásticos de Origen Microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(1), 77–115.

Meeker, E.W y E.C Wagner. (1933) Titration of ammonia in presence of boric acid. *Ind. Eng. Chem. Anal Ed* 5:396.

Miller, G.L.(1959).Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chame*, vol 31, No. 3, pp 426-428.

Peñuela, M., (2013). Productos de valor agregado a partir de fibra y raquis de palma de aceite. Informe Final Grupo de Bioprocesos UdeA. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural

Quillaguamán, J., Delgado, O., Mattiasson, B., & Hatti-Kaul, R. (2006). Poly(β -hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1-2), 148–154. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.05.013>

Tanadchangsaeng, N., & Yu, J. (2012). Microbial synthesis of polyhydroxybutyrate from glycerol: gluconeogenesis, molecular weight and material properties of biopolyester. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(11), 2808–18. <http://doi.org/10.1002/bit.24546>

Yu J, Chen LXL. Cost Effective recovery and purification of polyhydroxyalkanoates by selective dissolution of cell mas. *Biotechnol. Prog.* 2006, 22:547-553.