

Danielle Godinho de Araújo

**Produção de Poli[3-hidroxibutirato-co-3-
hidroxivalerato] por *Escherichia coli* recombinante a
partir de Glicose e Ácido Propiônico**

**FLORIANÓPOLIS-SC
2005**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**Produção de Poli[3-hidroxi-butirato-co-3-
hidroxivalerato] por *Escherichia coli* recombinante a
partir de Glicose e Ácido Propiônico**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Profa. Regina Vasconcellos Antônio, Dr.

DANIELLE GODINHO DE ARAÚJO

FLORIANÓPOLIS, 2005

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Tudo é possível para quem tem coragem.

J.K. Rowling

Com todo carinho para as pessoas que
mais amo na vida: meus pais, Walter e
Vera, e meus irmãos, Fernando e Tinos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Prof. Dr^a Regina Vasconcellos Antônio pela orientação, amizade e apoio oferecido na realização deste trabalho.

Às professoras Dr^a Gláucia Maria Falcão de Aragão e Dr^a Valéria Reginatto Spiller por aceitarem a participar da banca de defesa dessa dissertação.

Minha gratidão ao pessoal do laboratório de engenharia bioquímica (ENGEBIO) pela ajuda nas análises cromatográficas.

Aos colegas do Intelab, Claudimir e Derce pelo ombro amigo nos momentos de dificuldades.

Agradeço com muito carinho aos meus colegas de laboratório, Ana Kelly, Cauê, Cristiene e Cássila pelo incentivo, ajuda e paciência.

À minha família aqui em Floripa: Lílian e Jeovana. Minha eterna gratidão a vocês por ouvirem meus desabafos, pela paciência, amizade e carinho.

Às pessoas que mesmo distantes fisicamente se fizeram presentes nessa etapa da minha vida: Vovó Cecília, “Madinha”, Mariana, minha grande amiga e Welder.

Também agradeço todas as pessoas que passaram pela minha vida na minha estada em Floripa, em especial ao Paulinho por me acolher e incentivar nos momentos mais difíceis.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XVI
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 DEFINIÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS	5
2.2 HISTÓRICO DOS POLIHIDROXIALCANOATOS	5
2.3 ESTRUTURA E PROPRIEDADES	6
2.4 APLICAÇÕES DOS PHA's	9
2.5 BIOSSÍNTESE DOS POLIHIDROXIALCANOATOS	11
2.5.1 Biossíntese de poli[3-hidroxi-butirato]	11
2.5.1.1 Enzimas envolvidas na biossíntese de P[3HB]	12
2.5.1.1.1 3- β -Cetotilase	12
2.5.1.1.2 Acetoacetil-CoA redutase	13
2.5.1.1.3 PHA sintase	13
2.5.1.2 Genes responsáveis pela biossíntese de P[3HB]	14
2.5.2 Biossíntese de poli[3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato]	14
2.5.2.1 Ácido propiônico	16
2.5.2.2 Enzima propionil-CoA carboxilase (PCC)	17
2.5.2.3 Estratégias para produção de P[3HB-co-3HV]	18
2.5.2.3.1 Ácido itacônico	19
2.6 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE PHA's	20
2.6.1 Alcaligenes	21
2.6.2 Azotobacter	22

2.6.3	Pseudomonas	22
2.6.4	<i>Ralstonia eutropha</i>	22
2.6.5	Produção a partir de plantas	23
2.6.6	<i>Escherichia coli</i> recombinante	24
2.7	DEGRADAÇÃO DE PHA's	25
2.8	BIODEGRADABILIDADE	26
	CAPÍTULO III – MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	LINHAGENS E PLASMÍDIOS EMPREGADOS	28
3.1.1	Microrganismo	28
3.1.2	Plasmídio	28
3.2	MEIOS DE CULTIVO E SOLUÇÕES EMPREGADOS	29
3.2.1	Meio Luria Bertani - LB	29
3.2.2	Solução de ampicilina	29
3.2.3	Tampão Tris-HCl, 1M, pH 8,0	30
3.2.4	Solução de EDTA, 0,5M, pH 8,0	30
3.2.5	Tampão Tris-EDTA (TE)	30
3.2.6	Solução de Cloreto de Cálcio (CaCl ₂)	30
3.2.7	Solução estoque de glicose	30
3.2.8	Suplementos	30
3.1.9	Inibidor Enzimático	31
3.3	METODOLOGIAS EMPREGADAS	31
3.3.1	Obtenção de <i>Escherichia coli</i> recombinante	31
3.3.1.1	Preparação de células competentes	31
3.3.1.2	Transformação de células competentes	31
3.3.1.3	Seleção dos recombinantes	32
3.3.1.4	Extração do DNA plasmidial	32
3.3.2	Experimento preliminar: Efeito do ácido propiônico sobre o crescimento de <i>Escherichia coli</i> JM101	32
3.3.3	Etapas da produção de polihidroxicanoatos por <i>Escherichia coli</i> recombinante	33
3.3.3.1	Preparo do pré-inóculo	34
3.3.3.2	Preparo do inóculo	34
3.3.4	Produção de P[3HB-co-3HV]	34
3.3.4.1	Produção sem utilização de suplementos	34
3.3.4.2	Produção com utilização de suplementos	34
3.3.4.3	Efeito do ácido itacônico sobre o crescimento de <i>E. coli</i>	35
3.3.4.4	Inibição química da atividade da propionil-CoA carboxilase pelo ácido itacônico	35

3.3.9 Determinações Analíticas	36
3.3.9.1 Concentração da biomassa	36
3.3.9.2 Extração dos PHA's produzidos	36
3.3.9.3 Avaliação do PHA produzido	36
CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Influência da concentração de ácido propiônico no crescimento de <i>E. coli</i>	38
4.2 Influência da concentração de ácido itacônico no crescimento de <i>E. coli</i>	39
4.3 Produção de P[3HB-co-3HV] por <i>E. coli</i> recombinante utilizando ácido propiônico como precursor de valerato	40
4.4 Influência da utilização de azeite de oliva na produção de P[3HB-co-3HV]	41
4.5 Influência da utilização de ácido acético na produção de P[3HB-co-3HV]	43
4.6 Influência da combinação de suplementos na produção de P[3HB-co-3HV]	45
4.7 Efeito do ácido itacônico sobre a produção de P[3HB-co-3HV]	46
CAPÍTULO V - CONCLUSÕES	49
CAPÍTULO VI – SUGESTÕES	51
CAPÍTULO VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Estrutura geral dos polihidroxicanoatos	6
Figura 2.2 – Estrutura do P[3HB-co-3HV]	9
Figura 2.3 – Frasco de shampo e aparelho de barbear produzidos com P[3HB-co-3HV]	10
Figura 2.4 – Esquema da via metabólica de produção de P[3HB]	12
Figura 2.5 – Genes responsáveis pela biossíntese de P[3HB] em <i>R. eutropha</i>	14
Figura 2.6 – Esquema da via metabólica da produção de P[3HB-co-3HV]	15
Figura 2.7 – Metabolismo do ácido propiônico	16
Figura 2.8 – Fontes de propionil-CoA	17
Figura 2.9 – Fórmula estrutural do ácido itacônico	19
Figura 2.10 – Células de <i>E. coli</i> recombinante produzindo P[3HB]	25
Figura 3.1 – Plasmídeo pBHR68	29
Figura 3.2 – Etapas da produção de PHA's	33
Figura 4.1 – Composição de 3HB e 3HV no copolímero obtido na cultura sem suplementação com azeite de oliva	43
Figura 4.2 – Composição de 3HB e 3HV no copolímero obtido na cultura com suplementação de azeite de oliva	43
Figura 4.3 – Comparação do crescimento celular entre as culturas com e sem adição de ácido itacônico	47
Figura 4.4 - Comparação do crescimento celular entre as culturas com e sem adição de ácido itacônico utilizando azeite de oliva como suplemento	47

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Propriedades de P[3HB-co-3HV] conforme incorporação de valerato	8
Tabela 2.2 – Produção de PHA por diversas bactérias	21
Tabela 2.3 – Biodegradação de um filme de P[3HB-co-3HV] em diversos ambientes	27
Tabela 4.1 – Efeito da concentração de ácido propiônico sobre o crescimento celular de <i>E. coli</i> JM101 após 18 h de cultivo	38
Tabela 4.2 – Efeito da concentração de ácido itacônico sobre o crescimento celular de <i>E. coli</i> JM101 após 18 h de cultivo	40
Tabela 4.3 - Efeito da utilização de ácido propiônico no crescimento celular e na produção de PHA por <i>E. coli</i> recombinante	41
Tabela 4.4 – Efeito da suplementação do meio com ácido oléico no crescimento celular e produção de PHA por <i>E. coli</i> recombinante	42
Tabela 4.5 – Efeito da suplementação do meio com ácido acético no crescimento celular e produção de PHA por <i>E. coli</i> recombinante	44
Tabela 4.6 – Efeito da combinação de suplementos no crescimento celular e produção de PHA por <i>E. coli</i> recombinante	45
Tabela 4.7 – Efeito da utilização de ácido itacônico nos diferentes cultivos	46

RESUMO

Os polihidroxicanoatos (PHA's) são substâncias naturais acumulados no interior das células como forma de reserva de carbono e energia em condições particulares de crescimento. Há um significativo interesse no estudo dos PHA's devido a seu valor comercial como termoplástico biodegradável sendo uma potencial alternativa para substituição da utilização dos plásticos derivados do petróleo. O poli[3-hidroxi-butirato] é o PHA mais bem caracterizado e diversas bactérias são capazes de sintetizá-lo, porém, este biopolímero não apresenta propriedades industriais interessantes (duro e quebradiço). A incorporação de monômeros de valerato e produção do copolímero poli[3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato] (P[3HB-co-3HV]), resulta na formação de um polímero com características industriais mais interessantes. O precursor das unidades de valerato mais empregado é o ácido propiônico e este é adicionado ao meio de cultivo a fim de se produzir o copolímero. Entretanto, grande parte do ácido propiônico não é incorporado na forma de valerato, visto que este é utilizado em outras vias metabólicas. Com a finalidade de aumentar a conversão de ácido propiônico em valerato, foi estudado o efeito da adição de suplementos (azeite de oliva e ácido acético) e de um inibidor enzimático (ácido itacônico) na incorporação de valerato no copolímero P[3HB-co-3HV]. Foi utilizada para produção de P[3HB-co-3HV] a bactéria *Escherichia coli* JM101, abrigando os genes de biossíntese de PHA's de *Ralstonia eutropha* (plasmídeo pBHR68). Os cultivos foram realizados em agitador orbital por 48 horas a temperatura de 37°C e agitação de 150 rpm em meio Luria Bertani contendo 20 g. L⁻¹ de glicose, 100mg.L⁻¹ de ampicilina com ou sem a adição de ácido propiônico, suplementos ou inibidor. Os resultados mostram que a *E.coli* JM101 recombinante, contendo os genes de biossíntese de PHA's de *R. eutropha* acumulou 61% de PHB. Na presença de ácido propiônico, foi acumulado 8,4% de PHA, com 20% de valerato incorporado no copolímero P[3HB-co-3HV]. Quando azeite de oliva foi utilizado como suplemento, a biomassa celular e o acúmulo de polímero aumentaram em 49% e 82% respectivamente, porém a porcentagem de valerato incorporada no polímero diminuiu. A adição de ácido acético no

meio de cultivo diminuiu drasticamente a biomassa e o acúmulo de polímero não pode ser detectado. Nos cultivos onde se empregou o ácido itacônico como inibidor químico da enzima propionil-CoA carboxilase (PCC), principal enzima atuante no catabolismo do ácido propiônico, o crescimento bacteriano diminuiu e não se teve acúmulo de PHA. Os resultados sugerem que os ácidos: propiônico, acético e itacônico, são tóxicos para *E. coli* JM101. No entanto, o ácido propiônico ainda continua sendo o principal precursor das unidades de valerato no copolímero.

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHA's) are polymeric compounds naturally accumulated inside bacterial cells, as carbon and energy storage. These polymers are produced by a number of wild bacterial strains under nutrient limitation. There is great interest in PHA's, since their biodegradability and thermoplastic characteristics make them useful as an alternative to petrol derived plastics. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) is the most studied and characterized PHA. However, this biopolymer does not present. Incorporation of valerate monomers into polymer, results production of a copolymer poly [3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate] [P[3HB-co-3HV]] with more interesting industrial characteristics. Copolymer production demands for a 3-hydroxyvalerate (3HV) precursor. Propionic acid is usually added to cultivation media as precursor of 3HV units. Nevertheless, great part of propionic acid is utilized in others metabolic pathway than polymer biosynthesis. Aiming to increase the conversion of propionic acid in 3HV and as a consequence its incorporation the copolymer, it were studied the effect of the addition of supplements (olive oil and acetic acid) and enzymatic inhibitor (itaconic acid), over P[3HB-co-3HV] production by recombinant *Escherichia coli* JM101 strain, sheltering the plasmid pBHR68. The plasmid pBHR68 harbors the PHA biosynthesis genes (*phaA*, *phaB* and *phaC*) from *Ralstonia eutropha*. All cultivations were carried out in flasks shaken through an orbital shaker for 48 hours, at 37 °C and 150 rpm, in LB medium, containing 20 g. L⁻¹ glucose, and 100 mg.L⁻¹ ampicilin, with or without addition of propionic acid, supplements or inhibitor. The results showed that recombinant *E. coli* harboring PHA genes from *R. eutropha* were able to accumulate up to 61g% of the homopolymer P[3HB].in the biomass, in absence of precursor or supplementation. In presence of propionic acid (10 mM), 8,4 g% of the copolymer P[3HB-co-3HV], containing 20 mol% of 3HV, were produced. The supplementation of the medium containing propionic acid with olive oil, increased the biomass production and copolymer accumulation in 49% and 82%, respectively, but valerate molar percentage into copolymer decreased. Addition of acetic acid to cultivation medium sharply decreases biomass and no polymer could be detected. When the itaconic acid, a chemical inhibitor of propionyl-CoA carboxilase (PCC), main

operating enzyme in the catabolism of the propionic acid, was added to cultivation medium the bacterial growth diminished and no PHA accumulation was observed. The results suggest that propionic acid, acetic acids and itaconic acid are quite toxic to *E. coli* JM101. Anyway, propionic acid was effective in as precursor of valerate units into copolymer.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Os polihidroxicanoatos (PHA's) são poliésteres biológicos acumulados por uma grande variedade de microrganismos, em condições desbalanceadas de crescimento, como reserva de carbono e energia (ANDERSON; DAWES, 1990, LEE, 1996a, POIRIER et al, 1995, STENBÜCHEL; FÜCHTENBUSCH, 1998, TSUGE, 2002).

Os PHA's possuem importantes propriedades que permitem sua aplicação em diversas áreas. São termoplásticos, insolúveis em água, enantioméricos puros, não tóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis (STENBÜCHEL; EVERSLOH, 2002). Esses poliésteres são uma alternativa para substituição da utilização dos plásticos derivados do petróleo.

Os plásticos de origem petroquímica são amplamente empregados devido fácil moldabilidade e alta resistência química, porém, são um problema ambiental. Devido ao alto peso molecular e a conformação da cadeia carbônica desses polímeros, a ação dos microrganismos no processo degradativo é dificultada, permanecendo no meio ambiente por um longo período de tempo.

A incineração e a reciclagem de plásticos não biodegradáveis são alternativas para se dar uma disposição final a esse material. Porém, essas alternativas não são muito viáveis, visto que o processo de combustão de plásticos é caro e perigoso, e a reciclagem se torna um processo difícil devido à diversidade de plásticos comercializados (JOHNSTONE, 1990).

O Brasil consome cerca de 7 milhões de toneladas de plásticos por ano (Revista Pharmanews, 2003). Esse consumo ainda é muito baixo quando comparado ao consumo nos países desenvolvidos, como os Estados Unidos que consomem cerca de 54 milhões de toneladas por ano, mas esse índice tende a aumentar. Em vista disso, muitos países

estão investindo em programas para diminuir o lixo plástico, bem como no desenvolvimento de plásticos biodegradáveis (LEE, 1996a).

A substituição dos plásticos não biodegradáveis por polímeros biológicos é uma alternativa interessante para esse problema ambiental, mas requer estudos com a finalidade de aumentar a produção e diminuir custos do processo.

Os PHA's são alvo de diversos estudos devido a suas propriedades materiais similares aos termoplásticos sintéticos usados atualmente e serem completamente degradados a água e dióxido de carbono por microrganismos presentes no ambiente.

Um dos inconvenientes na produção de PHA's para aplicação comercial na produção de embalagens é o alto custo de produção. Estudos no desenvolvimento de melhores cepas produtoras, na utilização de substratos de baixo custo, na melhoria da eficiência dos processos fermentativos e de recuperação estão sendo realizados com o intuito de diminuir este custo.

A bactéria *Escherichia coli*, abrigando os genes de biossíntese de PHA's de *Ralstonia eutropha*, é uma excelente opção para potencializar a produção destes biopolímeros. A *E. coli* recombinante apresenta características interessantes quando comparadas a outras bactérias como: crescimento acelerado a altas temperaturas, célula de fácil lise, poder de acúmulo de até 80% de seu peso seco em biopolímeros e ausência de despolimerases.

Dentre os diversos PHA's produzidos, o mais bem caracterizado é o poli(3-hidroxi-butirato) P[3HB]. Este foi o primeiro PHA a ser descoberto e diversos microrganismos são capazes de sintetizá-lo. O P[3HB] não apresenta propriedades industriais interessantes. Este polímero é duro e quebradiço, além de apresentar alta temperatura de fusão (MADISON e HUISMAN, 1999).

A incorporação de monômeros de valerato e produção do copolímero poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) P[3HB-co-3HV], resulta na formação de um polímero com características industriais mais interessantes, o qual é menos duro e quebradiço. O copolímero também é mais fácil de ser moldado, visto que apresenta menor temperatura de fusão, e pode ser usada para produção de filmes resistentes ao vapor d'água e gases, propriedade similar ao polipropileno (MARCHESSAULT, 1996).

A composição do PHA depende do substrato e do microrganismo empregado. O precursor de valerato mais empregado é o ácido propiônico. A condensação de propionil-CoA e acetil-CoA forma cetovaleril-CoA, o qual sofre uma redução formando hidroxivaleril-CoA que juntamente com butiril-CoA, oriundo do metabolismo do carbono, são substratos para formação do copolímero poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato).

O ácido propiônico em determinadas concentrações é tóxico para a bactéria, além de contribuir para o aumento do custo do processo fermentativo. O custo do ácido propiônico é o dobro do custo da glicose, em vista disso os custos relacionados a produção do copolímero é bem mais alta que a produção do homopolímero de butirato (LEE, 1996a).

Além disso, na produção do copolímero grande parte do ácido propiônico adicionado ao meio não é incorporada na forma de valerato. Parte do ácido é desviada para via catalítica do ácido propiônico e este é degradado a succinil-CoA, o qual é um composto intermediário do ciclo de Krebs seguindo normalmente a via metabólica para produção de ATP.

A eficiência da conversão de substrato a polímero é muito importante. Estratégias metabólicas estão sendo utilizadas para atuar diretamente nas vias de produção do polímero e aumentar a conversão de substrato em biopolímero. Neste trabalho empregou-se como uma estratégia metabólica, a inibição de uma via metabólica capaz de desviar parte do ácido propiônico para a produção de energia, visando aumentar a conversão deste precursor de unidades de 3HV e como consequência sua incorporação ao copolímero.

Baseado nessa estratégia metabólica este trabalho apresenta como objetivo geral:

- Aumentar a incorporação de valerato no copolímero P[3HB-co-3HV], produzido por *Escherichia coli* recombinante, utilizando como substrato glicose e como precursor das unidades de valerato o ácido propiônico;

Objetivos específicos:

- Estudar a produção de copolímero P[3HB-co-3HV], em *E. coli* (recombinante) abrigando os genes de biossíntese de PHA's de *R. eutropha*, utilizando como precursor o ácido propiônico;

- Avaliar o efeito da adição de suplementos sobre a incorporação de valerato por *E. coli* recombinante;
- Alterar a via metabólica responsável pelo catabolismo de ácido propiônico através da utilização de um inibidor enzimático químico, a fim de se aumentar à incorporação de valerato no copolímero.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Definição de Polihidroxialcanoatos

Substâncias naturais acumuladas no interior das células, na forma de grânulos, como forma de reserva de carbono e energia em condições particulares de crescimento (Dawes e Senior, 1973).

2.2 Histórico dos Polihidroxialcanoatos

O primeiro polihidroxialcanoato a ser estudado foi o poli-3-hidroxitirato P(3HB), o qual foi descoberto por Lemoigne por volta de 1926. Wallen e Rohdwedder em 1974 observaram a presença de P(3HB) e poli-3-hidroxi-valerato em águas residuárias a partir de extração com clorofórmio (ANDERSON e DAWES, 1990).

Em 1983, Smet et al. relataram que *Pseudomonas oleovorans* cultivada em meio contendo n-octano acumulava grânulos parecidos com P(3HB), vistos em microscópio eletrônico, no entanto, os grânulos correspondiam a poliésteres de ácido 3-hidroxi-octanóico.

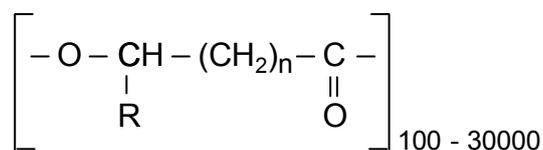
As propriedades desses termoplásticos biodegradáveis permaneceram arquivadas até 1982, quando a Imperial Chemical Industrie (ICI) iniciou a primeira produção em escala industrial de PHA, o qual foi comercializado com o nome de Biopol.

Em meados da década de 90, teve início no Brasil o desenvolvimento de tecnologia para a produção de plásticos biodegradáveis e biocompatíveis empregando matéria-prima renovável pela agricultura, em especial derivada da cana-de-açúcar, a partir de um projeto cooperativo desenvolvido pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), Copersucar e Universidade de São Paulo. Após um levantamento de

oportunidades, foi selecionado um grupo de polímeros da família dos polihidroxicanoatos (PHA) que podem ser produzidos por bactérias em biorreatores a partir de alguns carboidratos (SILVA; RODRIGUES; GOMEZ, 2001).

2.3 Estrutura e Propriedades

Os PHA's são poliésteres de vários hidroxiácidos sintetizados por bactérias gram-positivas e negativas de diferentes gêneros. A estrutura química geral desses poliésteres é mostrada na figura 2.1.



N = 1	R = hidrogênio	Poli (3-hidroxiopropionato)
	R = metil	Poli (3-hidroxiбутирато)
	R = etil	Poli (3-hidroxiуалерато)
	R = propil	Poli (3-hidroxiгексаноато)
	R = pentil	Poli (3-hidroxiоктаноато)
	R = nonil	Poli (3-hidroxiдodecanoato)
N = 2	R = hidrogênio	Poli (4-hidroxiбутирато)
	R = metil	Poli (4-hidroxiуалерато)
N = 3	R = hidrogênio	Poli (5-hidroxiуалерато)
	R = metil	Poli (5-hidroxiгексаноато)
N = 4	R = hexil	Poli (6-hidroxiдodecanoato)

Figura 2.1 – Estrutura geral dos polihidroxicanoatos.

Fonte: LEE, 1996a.

A polimerização acontece devido à ligação entre o grupamento carboxila de um monômero e o grupamento hidroxila de outro monômero, formando um éster.

Diferentes unidades monoméricas podem ser identificadas como constituintes de PHA's em várias bactérias, no entanto, poucos polihidroxicanoatos são produzidos em

quantidades suficientes para a caracterização e desenvolvimento de potenciais aplicações (LEE, 1996a).

Atualmente, aproximadamente 150 diferentes monômeros de PHA's são conhecidos e estes se encontram formando homopolíesteres ou copolíesteres (STEINBÜCHEL; EVERSLOH, 2003), sendo que os copolíesteres são oriundos da ligação entre unidades monoméricas diferentes.

Os monômeros que constituem os PHA's são divididos em duas classes: monômeros de cadeia curta (short-chain-length $-HA_{sci}$) e monômeros de cadeia média (medium-chain-length $-HA_{mcl}$). Unidades monoméricas de 3 a 5 carbonos são classificadas como de cadeia curta e unidades de 6 a 14 carbonos como de cadeia média (TSUGE, 2002).

As variações no tamanho da cadeia polimérica e dos monômeros constituintes ampliam as propriedades dos PHA's e suas potenciais aplicações (MADISON e HUISMAN, 1999). As propriedades físicas e mecânicas dos polihidroxialcanoatos, como: elasticidade, rigidez, temperatura de fusão, resistência à extensão, resistência a solventes orgânicos entre outras estão relacionadas com a composição monomérica dos polímeros (DU e YU, 2002).

Os PHA's são termoplásticos biodegradáveis, insolúveis em água, enantioméricos puros, não tóxico, biocompatíveis, piezoelétricos e apresentam alto índice de polimerização. De acordo com essas características, esses biopolímeros podem ser aplicados em diferentes áreas (HOCKING e MARCHESSAULT, 1994).

A similaridade estrutural do PHB com o polipropileno atraiu a atenção de diversas indústrias visando sua potencial aplicação em substituição aos plásticos de origem petroquímica e na área médica, em que biodegradabilidade e biocompatibilidade são fatores importantes. O PHB e o polipropileno apresentam graus de cristalinidade semelhantes, porém o PHB apresenta menor resistência a solventes e maior resistência aos raios UV (HOLMES, 1985).

O PHB é um material rígido e quebradiço, o que o caracteriza como um polímero com propriedades elásticas pouco satisfatórias. Por outro lado, polímeros de cadeia média (mcl-PHA) são altamente elásticos. Estudos recentes nesta área vem desenvolvendo um novo tipo de copolímero, com unidades monoméricas de cadeia curta

e média, a partir de bactérias recombinantes (TSUGE, 2002). Esses copolímeros são mais dúcteis e de fácil moldagem quando comparados ao homopolímero PHB.

O poli (3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-hexanoato) (PHBHHx) é um exemplo de copolímero contendo unidades monoméricas de cadeia curta e média. Este composto apresenta propriedades similares ao polietileno de baixa densidade (DOI *et al.*, 1995). *Aeromonas caviae* foi a primeira bactéria capaz de produzir tal polímero utilizando como substrato ácido alcanóico e diferentes óleos (KOBAYASHI *et al.*, 1994).

A incorporação de unidades de valerato (3HV) ao P(3HB) resulta na formação do copolímero poli[3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato] (P[3HB-co-3HV]). O copolímero apresenta propriedades mais interessantes do ponto de vista comercial (BYROM, 1987), visto que a incorporação de valerato diminui os níveis de cristalinidade e o ponto de fusão do polímero. Tais mudanças acarretam na diminuição da rigidez e aumento da resistência ao impacto. A incorporação de 3HV entre 17 a 20 mol% permite a obtenção de um copolímero com melhor flexibilidade e resistência ao impacto (HOLMES, 1985). A tabela 2.1 apresenta algumas propriedades dos copolímeros conforme o índice de incorporação de valerato.

Tabela 2.1: Propriedades de P[3HB-co-3HV] conforme a incorporação de valerato

P(3HB-co-3HV)	Ponto de Fusão (°C)	Rigidez (GPA)	Resistência à pressão (Mpa)	Resistência ao impacto (J/m)
3% mol de HV	170	2,9	38	60
9% mol de HV	162	1,9	37	95
14% mol de HV	150	1,5	35	120
20% mol de HV	145	1,2	32	200
25% mol de HV	137	0,7	30	400
P[3HB]	179	3,5	40	50
Polipropileno	170	1,7	34,5	45
Poliestireno	110	3,1	50	21

Fonte: Adaptado de LEE, 1996b.

O copolímero P[3HB-co-3HV] é mais facilmente manuseado industrialmente, devido maior elasticidade e resistência à extensão, quando comparado ao homopolímero de 3HB, o que acarreta na utilização desse copolímero na confecção de diferentes produtos. A estrutura do copolímero é apresentada na figura 2.2.

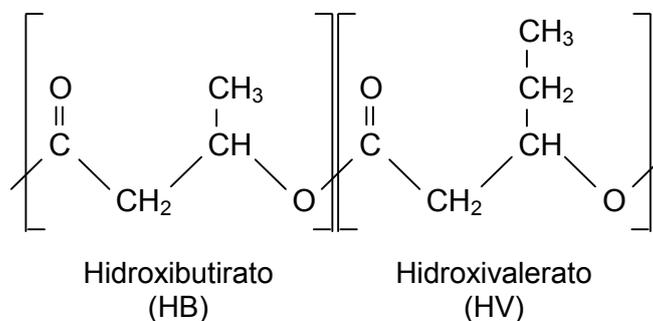


Figura 2.2 – Estrutura P[3HB-co-3HV].

Fonte: LEE, 1996a.

2.4 Aplicações dos PHA's

Existe um significativo interesse no estudo dos PHA's devido seu valor comercial como termoplástico biodegradável (LUIZIER, 1992). Biopolímeros como P[3HB], P[3HB-co-3HV], P[4HB] entre outros, são considerados uma alternativa para substituição dos plásticos não biodegradáveis, oriundos de combustíveis fósseis e apresentam como vantagem o fato de serem produzidos por fontes de carbono renováveis (LEE e PARK, 2002).

Há um grande interesse industrial no copolímero P[3HB-co-3HV], visto que suas propriedades físicas são bastante similares ao polipropileno (BYROM, 1987). Esse copolímero, conhecido comercialmente como Biopol, foi desenvolvido pela empresa "ZENECA Bio Products" (ICI) entre os anos de 1960 e 1970. Este foi utilizado na manufatura de filmes plásticos para revestimento de papel cartão, embalagens de alimentos e produtos moldados, como garrafas (LEE, 1996a). A companhia Monsanto adquiriu o processo de produção do copolímero em 1996 e recentemente este foi vendido a empresa Metabolix, Inc.

Com a descoberta de novas características dos PHA's ampliaram-se as áreas de aplicação e este está sendo utilizado na confecção de produtos como fraldas, absorventes femininos, frascos para cosméticos e copos, como é mostrado na figura 2.3.



Figura 2.3 – Frasco de shampoo e aparelho de barbear produzidos com P[3HB-co-3HV].

Fonte: <http://www.designinsite.dk/htmsider/m0955.htm>

Na área química, os PHA's são utilizados como precursores da síntese de compostos opticamente ativos, uma vez que apresentam carbono quiral (DAWES e SENIOR, 1973).

Devido sua biodegradabilidade, os polihidroxicanoatos podem ser utilizados na liberação controlada de drogas, hormônios, inseticidas e herbicidas. Devido sua biocompatibilidade, podem ser empregados no feitiço de materiais osteossintéticos, suturas cirúrgicas e reparos de vasos sanguíneos (WANG e BAKKEN, 1998).

A partir das despolimerizações dos polihidroxicanoatos são produzidos hidroxiácidos opticamente ativos. O ácido R-3-hidroxi-butírico, produzido a partir de PHB, é utilizado na síntese de um medicamento antiglaucoma pela empresa Merck's (REDDY *et al.*, 2003).

É relatado também a utilização de PHA's como matéria prima para produção de tintas, verniz e solventes (REDDY *et al.*, 2003).

A aplicação de PHA's em substituição aos plásticos de origem petroquímica ainda não é muito viável economicamente. O uso de plantas transgênicas seria uma opção para se diminuir o custo de produção, visto que produziriam alta biomassa e conseqüentemente altos índices de PHA's.

Na área médica é interessante o uso de PHA's, visto que este "nicho" de mercado não consome o biopolímero em larga escala e o preço não é um fator limitante, como na indústria em geral.

Os PHA's são mais utilizados no desenvolvimento de produtos aplicados ao setor cardiovascular. O P[3HB] está sendo empregado em cirurgias cardiovasculares para sutura do pericárdio sem formação de adesões entre o coração e o esterno (REDDY *et al.*, 2003).

2.5 Biossíntese dos Polihidroxicanoatos

Os polihidroxicanoatos são sintetizados por uma variedade de microrganismos como forma de reserva de carbono e energia quando estes se encontram em um meio rico em carbono e deficiente em algum outro nutriente como: nitrogênio, fósforo, potássio e oxigênio (DAWES e SENIOR, 1973).

O tipo de PHA produzido depende da espécie da bactéria, das condições de cultura e da fonte de carbono (BYROM, 1987).

Geralmente, o substrato para produção de PHA's é acetil-CoA. Tomando como exemplo a *Ralstonia eutropha*, em condições normais de crescimento essa bactéria cataboliza os carboidratos a piruvato, o qual é desidrogenado e convertido a acetil-CoA. Acetil-CoA entra no ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA) e segue-se normalmente o catabolismo para produção de energia. Na limitação de algum nutriente, a entrada de acetil-CoA no ciclo dos ácidos tricarbóxicos tende a diminuir e esta é utilizada como substrato para produção de PHA's (BRAUNEGG *et al.*, 1998).

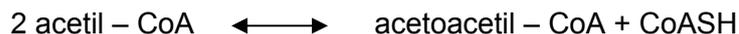
2.5.1 Biossíntese de P[3HB]

Um esquema da via de biossíntese de P[3HB], pode ser observada na Figura 2.4. Esta consiste de três reações catalisadas por enzimas distintas. A primeira reação, consiste na condensação de duas moléculas de acetil-CoA formando acetoacetil-CoA. A segunda reação é uma redução da acetoacetil-CoA a hidroxibutiril-CoA. A última reação é a polimerização dos monômeros de hidroxibutiril-CoA (MADISON e HUISMAN, 1999).

2.5.1.1 Enzimas envolvidas na Biossíntese de P[3HB]

2.5.1.1.1 3-β-Cetotiolase

A 3-β-Cetotiolase catalisa a primeira reação da biossíntese de P[3HB], que consiste na condensação de duas moléculas de acetil-CoA originando acetoacetil-CoA (MADISON e HUISMAN, 1999).



Estudos feitos por Oeding e Schelegel em 1973 revelaram a existência de dois tipos de 3-β-cetotiolase, cujas atividades estariam relacionadas com o substrato. Um tipo de enzima é ativa somente para substratos com quatro e cinco carbonos, já o outro tipo de enzima é ativa para substratos com cadeia carbônica variando de quatro a dez átomos. Os dois tipos de enzimas podem ser utilizados na biossíntese de P(3HB) (ANDERSON e DAWES, 1990).

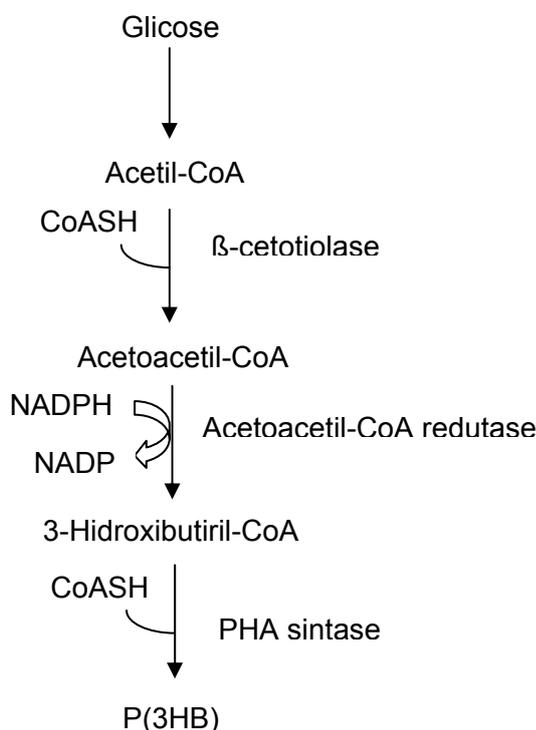


Figura 2.4 – Esquema da via Metabólica da Produção de P[3HB].

Fonte: MADISON e HUISMAN, 1999

2.5.1.1.2 Acetoacetil-CoA redutase

A conversão de acetoacetil-CoA a hidroxibutiril-CoA, segundo passo da síntese de P[3HB], é catalisada pela enzima acetoacetil-CoA redutase dependente de NADPH (MADISON e HUISMAN, 1999).



Como pode ser visto, a reação é NADPH dependente e este pode ser recuperado pela via das pentoses 6-fosfato ou pela reação envolvendo a isocitrato desidrogenase, enzima do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA).

2.5.1.1.3 PHA Sintase

Essa enzima é responsável pela polimerização das unidades de hidroxiácidos. A PHA sintase de *Ralstonia eutropha* é específica para D-enantiômeros e é ativa somente para incorporação de monômeros hidroxiácidos com quatro ou cinco carbonos (DOI *et al.*, 1990).

A PHA sintase pode ser isolada em uma forma solúvel, quando não se tem acúmulo de PHA, e em forma insolúvel (grânulos de PHA) quando se tem um acúmulo de polímero (HAYWOOD *et al.*, 1989). Na fase de acúmulo de PHA, a PHA sintase juntamente com outras proteínas atua na interface entre a superfície dos grânulos de PHA e o citoplasma celular (STEINBÜCHEL *et al.*, 1995).

De acordo com a especificidade pelo substrato, são descritas três diferentes classes de PHA sintases do tipo I, II e III. As PHA sintases do tipo I incorporam unidades monoméricas, hidroxiácidos (HA) contendo 3 a 5 unidades de carbono; as do tipo II de 6 a 12 átomos de carbono; enquanto que as do tipo III incorporam HA de 3 a 5 átomos de carbono, porém difere estruturalmente da primeira no peso molecular (STEINBÜCHEL *et al.*, 2003).

2.5.1.2 Genes responsáveis pela Biossíntese de P[3HB]

As enzimas 3- β -Cetotiolase, acetoacetyl-CoA redutase e PHA sintase, responsáveis pela biossíntese de P[3HB], são codificadas pelos genes estruturais *phbA*, *phbB* e *phbC*, respectivamente. Em *Ralstonia eutropha*, esses genes estão organizados em um único operon (*phbCAB*), de acordo com a figura 2.5.

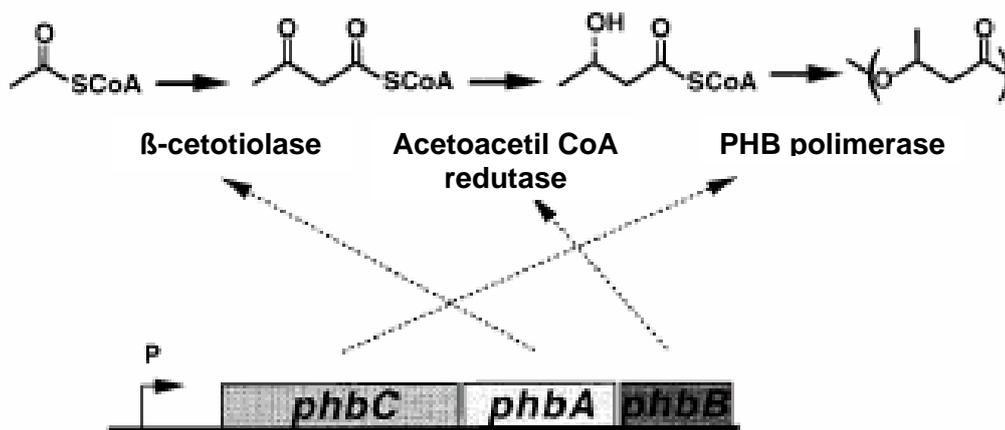


Figura 2.5 – Genes responsáveis pela biossíntese de P[3HB] em *Ralstonia eutropha*.

Fonte: Adaptado de MADISON e HUISMAN, 1999

De acordo com a diversidade das vias de biossíntese de P[3HB], não é de se impressionar com as diversas organizações dos genes de biossíntese de PHA's (*pha*) em diferentes microrganismos. Em bactérias como: *Paracoccus denitrificans*, *Rhizobium meliloti* e *Z. ramigera*, os genes *phbAB* e *phbC* se encontram separados (LEE, 1996c).

2.5.2 Biossíntese de P[3HB-co-3HV]

O copolímero de butirato e valerato é sintetizado a partir dos substratos: acetil-CoA e propionil-CoA (ALDOR et al, 2002). A produção de P[3HB-co-3HV] por *R. eutropha* requer a presença de substratos como propionato e valerato, precursores deste polímero. Estes compostos são degradados a propionil-CoA ou hidroxivaleril-CoA e na presença de outras fontes de carbono, como glicose ou frutose, formam P[3HB-co-3HV] (STEINBÜCHEL & PIEPER, 1992). A via de produção do copolímero utilizando como substrato glicose e como precursor ácido propiônico é apresentada pela Figura 2.6.

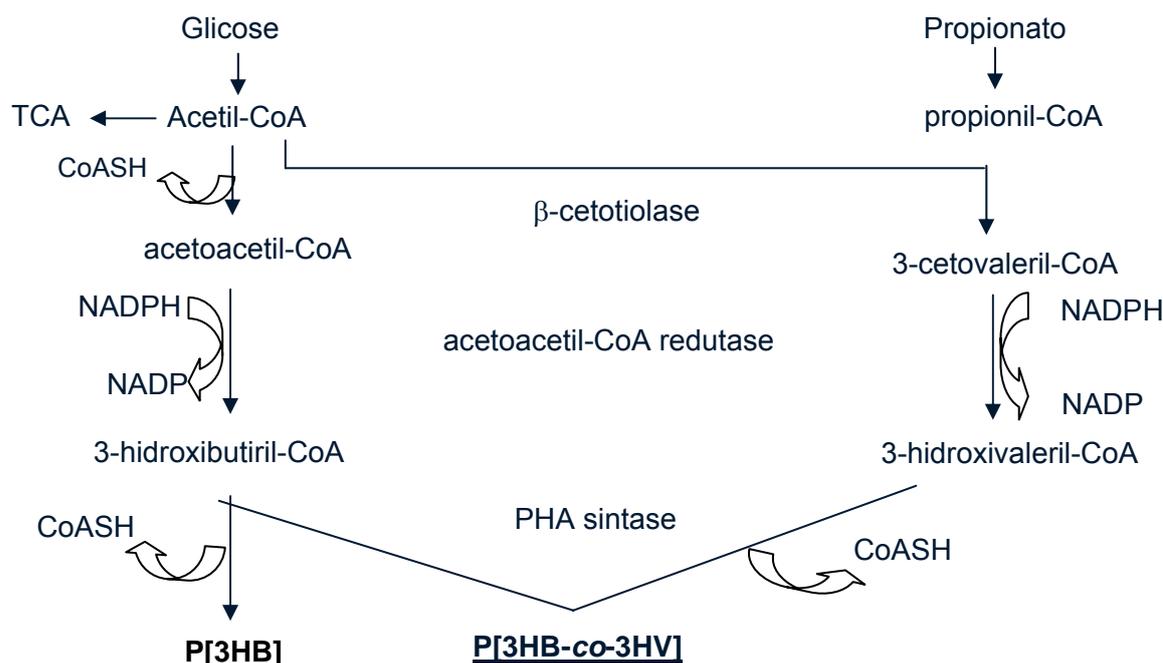


Figura 2.6 – Esquema da via Metabólica da Produção de P[3HB-co-3HV].

Fonte: DOI *et al.*, 1990.

A primeira etapa da via corresponde à condensação de duas moléculas de acetil-CoA ou a condensação de uma molécula de acetil-CoA com propionil-CoA, reação catalisada pela enzima β-cetotiolase. O produto da reação são os compostos acetoacetil-CoA e cetovaleril-CoA, os quais são reduzidos pela acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente a 3-hidroxiacetil-CoA e hidroxi valeril-CoA, respectivamente. Esses compostos são incorporados na cadeia polimérica pela PHA sintase ou polimerase (ALDOR *et al.*, 2002).

O ácido valérico também é utilizado como precursor de valerato (unidades 3HV), sendo este incorporado ao polímero diretamente via valeril-CoA, o qual é oxidado a hidroxi valeril-CoA. O uso de ácido valérico proporciona uma maior incorporação de unidades 3HV ao copolímero quando comparado ao precursor ácido propiônico (DOI *et al.*, 1987). No entanto, o ácido valérico é pouco utilizado devido seu odor desagradável.

2.5.2.1 Ácido Propiônico

O ácido propiônico é o precursor de valerato mais empregado na biossíntese de poli [3HB-co-3HV]. Porém, este precursor apresenta algumas desvantagens. Uma primeira desvantagem é o fato do ácido propiônico ser mais caro que outras fontes de carbono, como a glicose. Uma outra desvantagem está relacionada à sua toxicidade, razão pela qual esse ácido é empregado na conservação de alimentos (STEINBÜCHEL e EVERSLOH, 2003).

Grande parte do ácido propiônico adicionado no meio de cultura não é convertida a monômeros de valerato, visto que esse ácido é catabolizado a ácido pirúvico ou succinil-CoA, os quais são compostos intermediários do metabolismo central. O ciclo do ácido metilcítrico (MCC) e a via do metilmalonil-CoA são as vias mais utilizadas para a oxidação do ácido propiônico em bactérias aeróbicas (LIU e STEINBÜCHEL, 2000). A Figura 2.7 apresenta esquematicamente a via de oxidação do ácido propiônico a succinil-CoA.

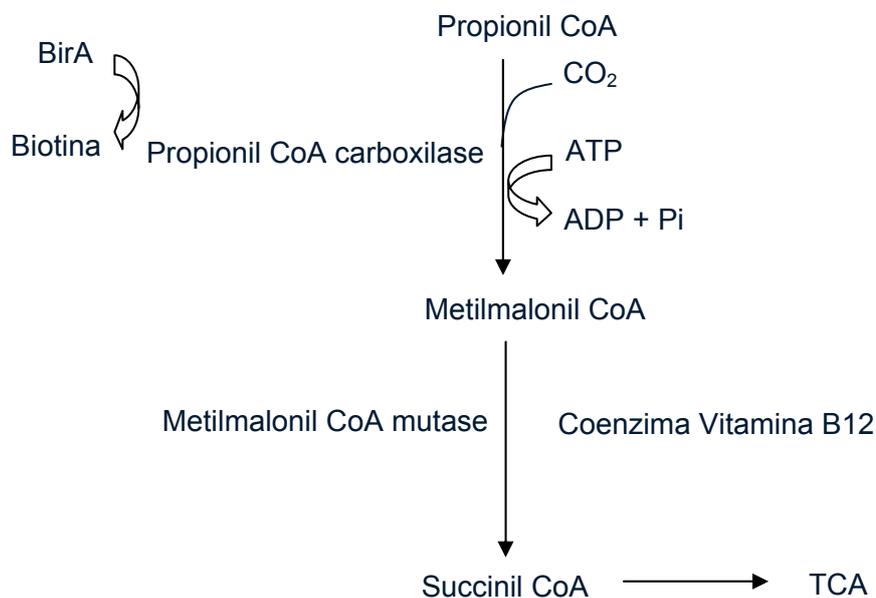


Figura 2.7 – Metabolismo do Ácido Propiônico.

Fonte: LIU e STEINBÜCHEL, 2000.

O ácido propiônico é convertido a propionil-CoA por diferentes enzimas, conforme a Figura 2.8.

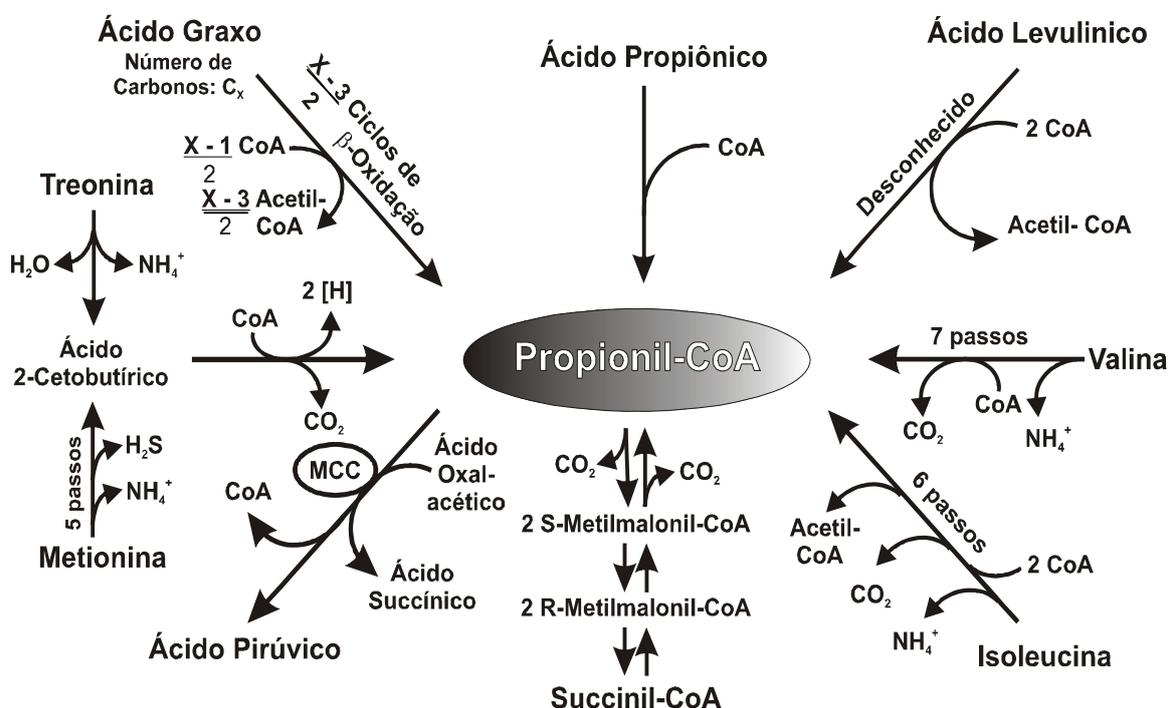


Figura 2.8 – Fontes de propionil-CoA.

Fonte: STEINBÜCHEL e EVERSLOH, 2003.

Enzimas do tipo tioquinases, como: propionil-CoA sintetase de *Salmonella entérica serovar Typhimurium*, acetil-CoA sintetase de *R. eutropha* (VALENTIN *et al.*, 2000) ou diversas coenzimas-A transferases, como: propionil-CoA transferase de *Clostridium propionicum* (SCHWEIGER e BUCKEL, 1984) podem catalisar a conversão do ácido propiônico a propionil-CoA. Algumas destas enzimas são utilizadas em técnicas de engenharia metabólica a fim de se potencializar a produção de P[3HB-co-3HV] a partir unicamente de ácido propiônico ou este combinado à outra fonte de carbono.

2.5.2.2 Enzima Propionil-CoA Carboxilase (PCC)

A enzima propionil-CoA carboxilase catalisa a conversão do propionil a metilmalonil-CoA de acordo com a reação abaixo:



Essa enzima atua no catabolismo de ácidos graxos com número ímpar de carbono e alguns aminoácidos (RAWN, 1983). A propionil-CoA carboxilase participa também da assimilação de CO₂ em organismos autotróficos, como *Chloroflexus aurantiacus* (STRAUSS e FUCHS, 1993). Além disso, esta enzima é utilizada por alguns organismos para assimilação de propionato. A participação dessa enzima na assimilação de propionato em *Rhodospirillum rubrum* é bem descrita, sendo que nesse microrganismo a PCC está envolvida também no ciclo do citramalato (BERG *et al.*, 2000). Em *M. extorquens* a PCC é requerida para oxidação de acetil-CoA a glioxilato (KOROTKOVA *et al.*, 2002). Em humanos, a deficiência da PCC causa distúrbios no metabolismo dos ácidos graxos e aminoácidos (VARGAS *et al.*, 2002).

Estruturalmente, a propionil-CoA carboxilase é composta de duas subunidades: α e β . É na subunidade alfa de 74 kDa que ocorre a ligação covalente do cofator biotina à enzima. A subunidade β tem peso molecular de 55 kDa e não tem sua função descrita (VARGAS *et al.*, 2002).

A vitamina solúvel biotina atua como cofator da propionil-CoA carboxilase, assim como das enzimas piruvato carboxilase (PC), metilcrotonil-CoA carboxilase (MCC) e acetil-CoA carboxilase. A eficiência da atuação dessas enzimas é dependente da presença da vitamina. A adição da biotina a essas enzimas é catalisada por biotinas ligases, as quais são conhecidas como BirA em procariotos e holocarboxilase sintetase (HCS) em eucariotos (VARGAS *et al.*, 2002).

A proteína BirA é a catalisadora da ligação da vitamina biotina à enzima propionil-CoA carboxilase em *Escherichia coli*, conforme pode ser visualizado na Figura 2.7.

2.5.2.3 Estratégias para produção de P[3HB-co-3HV]

Como foi descrito anteriormente, para biossíntese do copolímero, se faz necessário à utilização de um precursor, como o ácido propiônico. Contudo, grande parte do ácido propiônico adicionado ao meio é utilizado para a produção de energia. Por esta razão, estratégias metabólicas são utilizadas com a finalidade de desviar o fluxo do ácido propiônico proporcionando uma maior incorporação do mesmo ao polímero na forma de valerato. Dentre as estratégias metabólicas mais empregadas está a utilização de suplementos no meio, como ácido oleico e acético. Sabe-se que o ácido itacônico é

inibidor da propionil-CoA carboxilase (PCC), principal enzima responsável pelo catabolismo do ácido propiônico (BERG *et al.*, 2002).

2.5.2.3.1 Ácido Itacônico

Ácido itacônico ou metileno succinato é um composto insaturado, cuja fórmula estrutural é apresentada na figura 2.9 abaixo.

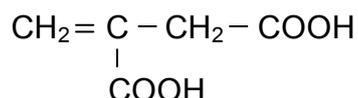


Figura 2.9 – Fórmula estrutural do ácido itacônico.

Diversas são as aplicações do ácido itacônico e dos ésteres originados a partir do mesmo. Estes podem ser usados como desodorantes já que reagem com odores alcalinos ou ácidos, produzidos por amônio, amina ou hidrogênio sulfídrico. Baseado nessa propriedade desodorante, o ácido itacônico pode ser utilizado na confecção de filmes de papéis ou plásticos (Jinan huaming biochemistry homepage).

Ésteres derivados do ácido itacônico podem ser usados como lubrificantes, plasticidas, selantes, resinas e tintas. Outros derivados desse ácido são usados na medicina, na indústria de cosméticos e na indústria agrícola como herbicidas (Jinan huaming biochemistry homepage).

Experimentos realizados Berg *et al.*, 2002, revelaram que o itaconato inibiu a atividade da enzima propionil-CoA carboxilase (PCC) quando adicionado ao extrato celular da bactéria *Rhodospirillum rubrum*. A PCC é responsável pela primeira etapa do catabolismo do ácido propiônico.

O itaconato também inibe o ciclo do glioxilato, o qual é responsável pela assimilação de acetato, quando este é fornecido como fonte de carbono para a bactéria. O itaconato atua como inibidor competitivo da isocitrato liase (ICL), enzima responsável pela clivagem do isocitrato em glioxilato e succinato, primeira etapa do ciclo do glioxilato (WILLIAMS *et al.*, 1971).

2.6 Microrganismos Produtores de PHA's

Dentre as mais de 300 bactérias diferentes, capazes de sintetizar PHA's, apenas poucas estão sendo empregadas para produção destes biopolímeros. Dentre essas bactérias estão: *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, algumas cepas de bactérias metilotrófias, *Pseudomonas oleovorans*, *Escherichia coli* recombinante e *Klebsiella aerogenes* recombinante (LEE, 1996a).

Estas bactérias foram selecionadas para produção por que acumulam quantidades elevadas de sua massa celular seca em PHA em um período curto de cultivo, o que resulta em uma alta produtividade (LEE, 1996a).

O microrganismo escolhido para produção industrial do biopolímero tem uma influência crítica sobre os custos de produção (BYROM, 1987). A seleção do microrganismo deve levar em consideração a capacidade do mesmo em utilizar fontes baratas de carbono, ter alta velocidade de crescimento e síntese de polímero, além de alto acúmulo de PHA, em relação à massa celular seca (LEE, 1996b).

O elevado custo de produção de PHA também se deve ao processo de extração do mesmo. Para que o processo seja viável, é necessário que a cepa seja capaz de acumular pelo menos 60% de sua massa celular em polímero. Isto elimina as bactérias Gram-positivas e aquelas que não são capazes de acumular porcentagens elevadas de polímero (RAMSAY et al, 1990). Na Tabela 2.2 apresenta-se a produção de PHA's por diversas bactérias.

As bactérias empregadas na produção de PHA's podem ser divididas em 2 grupos, baseado nas condições de cultivo requeridas para produção. O primeiro grupo de bactérias requer excesso de carbono e limitação de algum nutriente como nitrogênio, fósforo, magnésio, potássio, oxigênio ou enxofre para a síntese do polímero. Fazem parte desse grupo *Ralstonia eutropha*, *Protomonas extorquens*, *Pseudomonas oleovorans* e outras. O outro grupo de bactérias não requer limitação de nutriente para síntese de PHA e tem-se como exemplo *Escherichia coli* recombinante, cepa mutante de *Az. Vinelandii* (LEE, 1996a).

Tabela 2.2: Produção de PHA por diversas bactérias

Microrganismo	Fonte de Carbono	PHA	Conteúdo de PHA (%w/v)
	Gluconato	PHB	46-85
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Propionato	PHB	26-36
	Octanoato	PHB	38-45
<i>Bacillus megaterium</i> QMB 1551	Glicose	PHB	20
<i>Klebsiella aerogenes</i> recombinants	Melaço	PHB	65
<i>Methylobacterium rhodesianum</i> MB1267	Frutose/ metanol	PHB	30
<i>Mextorquens</i> (ATCC5566)	Metanol	PHB	40-46
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Eutorbio e óleo de ricínia	PHA	20-30
	Metanol	P(3HB)	0.02
<i>P.denitrificans</i>	Pentanol	P(3HB)	55
	Gluconato	PHB	1.1 - 5.0
<i>P.oleovorans</i>	Octanoato	PHB	50-68
	Octanoato	PHB	14-22
<i>P.putida</i> Gp104	Óleo de Palma	PHA	37
	Ácido laurico	PHA	25
<i>P. putida</i>	Ácido Mirístico	PHA	28
	Ácido Óleico	PHA	19
<i>P.putida</i> BM01	Ácido decanoico	5POHV	15-35
<i>Sphaerotilus natans</i>	Glicose	PHB	40

Fonte: Adaptado de REDDY *et al.*, 2003

2.6.1 Alcaligenes

Alcaligenes latus sintetiza PHA associada ao crescimento, no entanto esta cepa é capaz de acumular uma maior quantidade de PHA em condições de limitação de algum nutriente (CHOI e LEE, 1999). A desvantagem desse microrganismo é sua sensibilidade aos precursores utilizados na produção de poli [3HB-co-3HV] (Ramsay *et al.*, 1990).

2.6.2 *Azotobacter*

Microrganismos desse gênero são capazes de utilizar sacarose e glicose como substrato. Page (1992) produziu P[3HB-co-3HV] utilizando como substrato uma combinação de sais e melão de beterraba a partir de uma cepa mutante de *Azotobacter vinelandii*. A utilização do melão de beterraba como fonte de carbono reduziria a metade o custo de produção quando comparado à utilização da glicose como fonte de carbono. Uma desvantagem das bactérias desse gênero é que, paralelamente à produção de PHA ocorre a síntese de um polissacarídeo, diminuindo a produtividade do polímero (BYROM, 1987).

2.6.3 *Pseudomonas*

As bactérias desse gênero são capazes de acumular PHA's de cadeia média. *Pseudomonas oleovorans* é um exemplo de bactéria que sintetiza PHA's de cadeia média utilizando as mais variadas fontes de carbono, incluindo álcoois e ácidos alcanóicos. O tipo de substrato empregado interfere no crescimento celular, formação de PHA e composição do copolímero (DU e YU, 2002).

Estudos relatam que *P. putida* e *P. aeruginosa* são capazes de acumular PHA's a partir de glicose e outros açúcares visto que elas são capazes de sintetizar monômeros de cadeia média a partir de acetil-CoA. *P. oleovorans* é uma exceção dentre o gênero *Pseudomonas* devido ser incapaz de sintetizar PHA's, a partir de carboidratos (HUIJBERTS *et al.*, 1992).

2.6.4 *Ralstonia eutropha*

A *Ralstonia eutropha* é um dos microrganismos mais estudados e aplicados para produção de PHA's, pela sua facilidade de utilização de fontes renováveis de carbono e habilidade de acumular até 80% de seu peso seco em polímero. A produção de polímero por *R. eutropha* é realizada em duas fases, uma fase inicial de crescimento não limitado visando a produção de massa celular, seguida de uma fase limitada em algum nutriente, exceto carbono, com acúmulo de polímero (BYROM, 1987).

Industrialmente, a *R. eutropha* é uma bactéria amplamente empregada para produção de PHA's, em especial P[3HB] e P[3HB-co-HV] (LEE *et al.*, 1999). Na produção de copolímero, ácido propiônico é adicionado no meio durante a fase de acúmulo e a

proporção de valerato incorporada depende da razão de alimentação ácido propiônico/açúcar. Essa bactéria também é capaz de acumular polímero contendo monômeros de 4 hidroxibutirato [4HB] e 5 hidroxivalerato [5HV], conforme o substrato utilizado (ANDERSON e DAWES, 1990).

A cepa nativa de *R. eutropha* H16 não utiliza glicose nem sacarose como fontes de carbono. A cepa utilizada para produção industrial de PHA's é a mutante DSM545, a qual consome glicose como fonte de carbono (MADISON e HUISMAN, 1999). A *R. eutropha* 290/sac, também mutante, é capaz de consumir sacarose (FAVA, 1997).

Diversos estudos estão sendo realizados a fim de se diminuir o custo de produção dos PHA's utilizando *R.eutropha* como microrganismo produtor. MARANGONI (2000) testou diversas fontes de carbono na produção de P[3HB-co-3HV], dentre as fontes testadas estão: lactose hidrolisada, galactose, frutose, glicose e açúcar invertido. O crescimento celular em açúcar invertido, glicose e frutose foram semelhantes e mostraram ser as fontes de carbono nas quais se tem as maiores velocidades de crescimento específica. SQUIO e colaboradores (2003) utilizaram suplementos para a produção de copolímero e observaram que a suplementação com ácido linoleico/oléico (2:1) aumentou em 11% a produção de polímero.

2.6.5 Produção a partir de Plantas

Recentemente, estudos variados estão sendo realizados a fim de se implementar a produção de P[3HB] em plantas. A produção de PHA em escala agrônômica aumentaria a síntese dos biopolímeros para milhões de toneladas sendo infinitamente vantajosa quando se compara à produção por processo fermentativo. Potencialmente, os PHA's poderiam ser produzidos a um custo de US\$ 0,20 a 0,5/kg, caso fossem sintetizados por plantas a uma porcentagem variando entre 20 a 40% de seu peso seco, podendo competir com os plásticos oriundos do petróleo (REDDY *et al.*, 2003).

Arabidopsis thaliana foi a primeira planta escolhida para estudos da expressão dos genes de biossíntese de PHA's (MADISON e HUISMAN, 1999). Como a enzima 3-cetoacil-CoA tiolase está presente na *A. thaliana*, somente os genes *phaB* e *phaC* de *R. eutropha* foram inseridos na planta, o que resultou em acúmulo de grânulos de PHB no citoplasma, vacúolo e núcleos, porém, a crescimento da planta foi afetado. A expressão de todos os genes *phaCAB* no plastídeo de *A. thaliana* melhorou o sistema de produção. O máximo acúmulo de PHA foi 14% em peso seco (NAWRATH *et al.*, 1994). Nos

plastídeos o fluxo de carbono é alto e conseqüentemente tem-se alta concentração de acetil-CoA, o que seria uma hipótese para se ter melhorado a produção de PHB sem causar defeitos na planta (MADISON e HUISMAN, 1999; REDDY, 2003).

As plantas oleaginosas são interessantes para a síntese de PHA's, visto que o PHB e o óleo são derivados da acetil-CoA. Estratégias utilizando engenharia metabólica podem ser empregadas para deslocar a acetil-CoA apenas para produção de PHB, diminuindo a produção de óleo. Outras plantas testadas para produção de PHA's são *Gossypium hirsutum* (algodão) e *Zea mays* (milho). Empresas como Monsanto (USA) e Zeneca (UK) estão investindo em estudos para produção de PHA's a partir de plantas, como soja (REDDY, 2003).

2.6.6 *Escherichia coli* recombinante

Cepas de *Escherichia coli* abrigando os genes de biossíntese de PHA's de *Ralstonia eutropha* são empregadas com freqüência para produção de P[3HB] com alto conteúdo de PHA e alta produtividade. Diversos plasmídios foram desenvolvidos a fim de se produzir PHA em *E. coli* (LEE, 1996a).

A produção de P[3HB-co-3HV] por *E. coli* recombinante é considerada difícil visto que essa bactéria não utiliza o ácido propiônico com eficiência. Entretanto estudos recentes empregando cepas mutantes de *E. coli* ou ácido acético e oléico como indutor na cultura têm sido bem sucedidos (LEE, 1999).

E. coli é capaz de utilizar diversas fontes de carbono, incluindo glicose, sacarose, lactose e xilose. Isso representa uma potencial redução no custo de produção de PHA's pela utilização de substratos baratos, como: melão, soro de leite e hemicelulose hidrolisada (LEE e CHANG, 1995).

FONSECA (2003) utilizando *E. coli* abrigando os genes de biossíntese de PHA's de *R. eutropha* (plasmídio pBHR68), testou diferentes combinações de fontes de carbono em diversas concentrações, através de planejamento fatorial, e verificou que a combinação de substratos soro de leite (5%), óleo de soja (1,5%) e amido de milho hidrolisado (5%), fornecem uma massa celular em torno de 1,9 g.L⁻¹, sendo que 50% da massa era de PHB.

A bactéria *E. coli* apresenta como vantagens o rápido crescimento celular a altas temperaturas, a ausência de despóimerases e a fácil lise celular. O custo da extração

dos grânulos de PHA é menor a medida que as células são facilmente lisadas (STEINBÜCHEL e SCHLEGEL, 1991; WANG e BAKKEN, 1998; MADISON e HUISMAN, 1999). A Figura 2.10 mostra células de *E. coli* produzindo P[3HB].

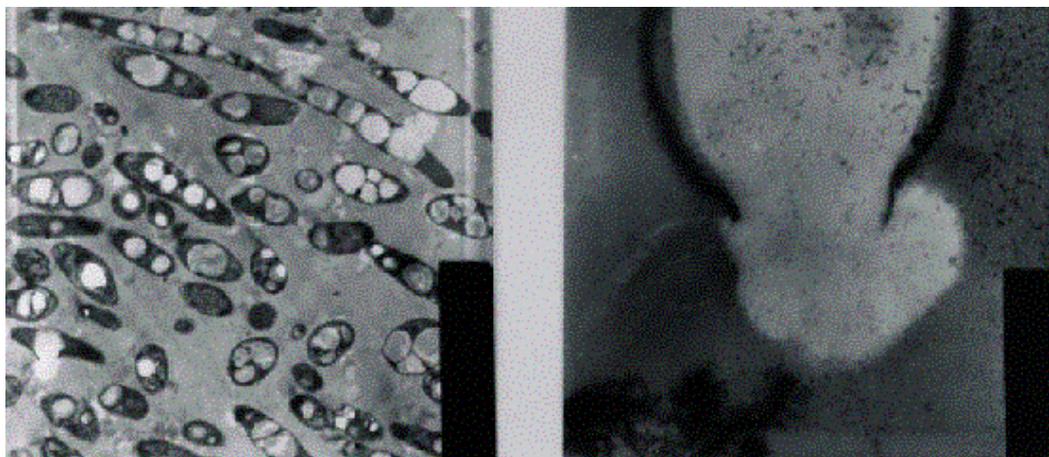


Figura 2.10 – Células de *E. coli* recombinante produzindo P[3HB].

Fonte: Metabolix homepage

Uma outra vantagem da *E. coli* é o fato desta bactéria ter seu genoma e fisiologias bem caracterizadas. Isso oferece vantagens para manipulação genética e desenvolvimento de estratégias de engenharia metabólica (ESCHENLAUER *et al.*, 1996).

O custo da produção de PHA usando a produtora natural *R. eutropha* é de US\$16/kg. Alguns estudos mostram que utilizando *E. coli* recombinante o custo de produção pode ser reduzido para US\$ 4/kg. Sendo assim, o emprego de *E. coli* recombinante pode ser considerado promissor para se minimizar custos na produção de PHA (LEE, 1996a).

2.7 Degradação de PHA's

Além da síntese, a degradação intracelular dos polihidroxialcanoatos é de fundamental importância para o metabolismo dos microrganismos produtores (KAWAGUCHI *et al.*, 1992). A PHA despolimerase é a enzima que catalisa a primeira etapa da degradação, tendo sido estudada em microrganismos como: *Bacillus megaterium*, *Zoogloea ramigera* e *Ralstonia eutropha* (SAITO *et al.*, 1995).

O gene que codifica para PHA despolimerase em *Pseudomonas aeruginosa* (*phaD*) se encontra entre dois genes *phaC1* e *phaC2* (TIMM e STEINBÜCHEL, 1992). Em *R. eutropha*, o gene *phaZ*, codifica para PHA despolimerase. A expressão deste gene em *Escherichia coli* resultou na degradação de grânulos de PHA (SAEGUSA *et al*, 2001).

Sugere-se que o mecanismo de degradação dos grânulos de PHA em *R. eutropha* é o seguinte: inicialmente a enzima PHA despolimerase, catalisa a despolimerização do polímero P[3HB] a ácido D(-)-3-hidroxi-bútfico. Em seguida, este composto é oxidado a acetoacetato pela enzima 3-hidroxi-bútfato desidrogenase NAD⁺ dependente. A molécula de acetoacetato é convertida a acetoacetil-CoA pela acetoacetil-CoA sintase. Em condições de cultivo balanceada, os altos níveis de NADH e acetoacetato podem inibir a ação da enzima 3-hidroxi-bútfato desidrogenase, cessando a despolimerização do P(3HB) (STEINBÜCHEL e SCHLEGEL, 1991).

Quando o microrganismo encontra-se em meio rico em energia (excesso de carbono), o alto nível de NADH inibe o ciclo dos ácidos tricarbóxicos bem como a despolimerização de PHA. A diminuição da concentração de coenzima A livre (CoA) favorece a atividade da β -cetotilase e a síntese de P[3HB] (BYROM, 1987).

2.8 Biodegradabilidade

Biodegradabilidade significa capacidade de um material ser degradado sob a ação de organismos vivos. A "degradação" (passagem de um estado de referência a um estado degradado) leva uma modificação estrutural do material caracterizado por uma diminuição de suas qualidades e desempenho.

Na realidade, além dos organismos vivos, é necessário levar em consideração o biótopo do conjunto (orgânico, mineral e climático) necessário para que a biodegradação ocorra. Biótopo é o meio complexo onde ocorrem as reações de biodegradação. Nele, devem ser considerados todos os parâmetros físicos (temperatura, pressão, ação mecânica dos ventos, chuva e neve, de alagamentos, ação da luz), a composição química da água, do ar e do solo, além dos parâmetros biológicos (ação dos animais, vegetais e microorganismos). Todos os parâmetros são interdependentes. Por exemplo, os microrganismos não podem estar ativos a não ser em condições físicas, químicas e biológicas bem particulares.

Os microrganismos presentes em diversos ambientes na natureza excretam enzimas extracelulares como PHA-hidrolases e PHA-despolimerases, as quais são responsáveis pela degradação do PHA (MADISON e HUISMAN, 1999). A degradação enzimática do polímero é uma reação heterogênea que envolve duas etapas: adsorção e hidrólise. A etapa inicial consiste na adsorção da enzima na superfície do polímero, a etapa subsequente consiste na hidrólise das cadeias poliméricas pelo sítio ativo das enzimas (SUDESH *et al.*, 2000).

A degradação de P[3HB] e P[3HB-co-3HV] ocorre em sistemas aeróbios e anaeróbios, sendo que em ambientes aeróbios os produtos finais da degradação são dióxido de carbono, água e húmus. Em condições anaeróbias, metano também é produzido (LUZIER, 1992).

A velocidade de biodegradação dos polímeros depende de fatores como: área superficial, atividade microbiana, ambiente disponível, pH, temperatura, nível de mistura e presença de outros materiais nutrientes (SUDESH *et al.*, 2000).

A Tabela 2.3 apresenta o tempo necessário para a degradação completa de um filme de 1mm de P[3HB-co-3HV] em diferentes ambientes.

Tabela 2.3: Biodegradação de um filme de P[3HB-co-3HV] em diversos ambientes.

Ambiente	Número de semanas necessárias para 100% de perda de massa
Ambiente anaeróbio	6
Sedimentos estuários	40
Ambiente aeróbio	60
Solo	75
Água do mar	350

Fonte: LUZIER, 1992.

A degradação microbiana de PHA's no solo é favorecida com o aumento da temperatura, sendo que o copolímero P[3HB-co-3HV] tende a degradar mais rapidamente do que o homopolímero P[3HB] (MERGAERT *et al.*, 1993).

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens e plasmídios empregados

3.1.1 Microrganismo

Foi utilizada para os cultivos a bactéria *Escherichia coli* linhagem JM101. Esta linhagem foi escolhida devido a sua capacidade de acumular polímero ser maior que outras linhagens comerciais já testadas por FONSECA (2003).

A bactéria sem plasmídio foi estocada em solução 0,9% de NaCl à temperatura ambiente. As bactérias ancorando o plasmídio foram estocadas em meio Luria Bertani (LB) sólido, acrescido de uma solução de ampicilina, à temperatura de 4 °C. Conforme a utilização, essas colônias eram repicadas em meio LB líquido contendo ampicilina.

3.1.2 Plasmídio

O plasmídio utilizado foi o pBHR68, o qual possui as seguintes características relevantes para este estudo: ancora o gene de resistência a ampicilina (*Amp^r*) e os genes de biossíntese de polihidroxicanoatos de *Ralstonia eutropha* (*phaA*, *phaB* e *phaC*), esboçado na Figura 3.1. Este plasmídio foi cedido pelo Dr. Alexander Steinbüchel, do Instituto de Microbiologia da Westfälische Wilhelms Universität Münster, Münster, Alemanha. A suspensão estoque do plasmídio foi armazenada à temperatura de -20 °C.

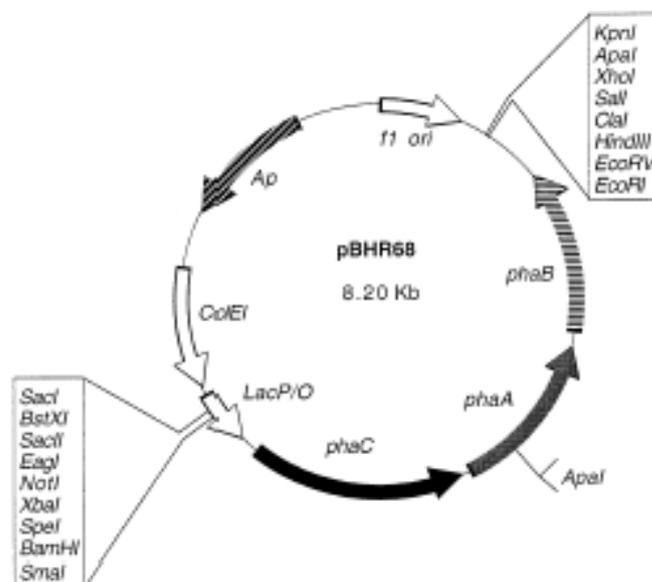


Figura 3.1 – Plasmídeo pBHR68, ancorando os genes *Amp^r* e *phaA*, *phaB* e *phaC* de *R. eutropha*.

3.2 Meios de cultivos e soluções empregados

3.2.1 Meio Luria Bertani – LB

Para os cultivos, preparação do inóculo, preparação de células competentes e estocagem da *E. coli* foram utilizados o meio Luria Bertani (LB) sólido e líquido, cuja composição é a seguinte: 10 g.L⁻¹ de triptona, 5g.L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g.L⁻¹ de NaCl, com adição de 15 g.L⁻¹ de agar para o meio sólido (BERTANI,1951). Quando apropriado foi adicionado o antibiótico ampicilina ao meio na concentração descrita para cada ensaio.

3.2.2 Solução de ampicilina

Para seleção e cultivo da *E.coli* recombinante contendo o plasmídeo pBHR68 foi acrescido ao meio LB uma solução de ampicilina na concentração de 100 mg. L⁻¹. Foram preparados 10 mL de uma solução estoque de ampicilina, na concentração de 100 g.L⁻¹. O antibiótico foi dissolvido em água ultra pura esterilizada, sob condições assépticas, e a solução foi estocada em microtubos esterilizados à temperatura de -20 °C.

3.2.3 Tampão Tris-HCl, 1M, pH=8,0

Foram pesados 12,1 g de tris (hidroximetil) amino metano e dissolvidos em 50 mL de água destilada e filtrada. A solução resultante foi levada ao pHmetro. Com agitação constante foi adicionado ácido clorídrico concentrado, gota a gota, até que a solução alcançasse o pH=8,0. Completou-se o volume da solução para 100 mL, com água destilada e filtrada.

3.2.4 Solução de EDTA 0,5M, pH=8,0

Pesou-se 18,6 g do sal dissódico do ácido etileno diamino tetraacético Na₂EDTA e completou-se o volume até 100 mL com uma solução de NaOH 0,5M. O pH final deverá ser aproximadamente igual a 8,0.

3.2.5 Tampão Tris-EDTA (TE)

Foram misturados 1 mL de tampão tris-HCl (1 M, pH=8,0) e 0,2 mL de EDTA (0,5 M, pH=8,0). O volume da mistura foi completado com água destilada filtrada até 100 mL e posteriormente esterilizada, em autoclave, a 121° C / 1atm/ 15 min.

3.2.6 Solução de cloreto de cálcio (CaCl₂)

Foram pesados 1,11 g de CaCl₂, dissolvidos em 100 mL de água destilada filtrada e esterilizada.

3.2.7 Solução estoque de glicose

Como fonte de carbono foi utilizada glicose, a qual foi adicionada ao meio LB na concentração de 20g.L⁻¹. A solução estoque de glicose adicionada ao meio, foi preparada na concentração de 400 g. L⁻¹ e esterilizada separadamente em autoclave (temperatura e 121° C / 1atm/ 15 min.), a fim de se evitar a caramelização da mesma.

3.2.8 Suplementos

Com o objetivo de avaliar o efeito da adição de suplementos sobre a incorporação de valerato no copolímero foram empregados o ácido acético e ou azeite de oliva, os quais foram adicionados ao meio LB antes da esterilização do mesmo. Nos experimentos realizados neste estudo utilizou-se 10 mM de ácido acético no meio de cultura.

Em outro ensaio, o azeite foi adicionado no meio de cultura em uma concentração de 1g.L⁻¹.

3.2.9 Inibidor Enzimático

O ácido itacônico (Sigma I29204) foi empregado nos estudos de inibição enzimática “in vivo” da PCC, responsável pelo catabolismo do ácido propiônico. A concentração de ácido utilizada nos cultivos para produção de PHA's foi de 5 mM.

3.3 Metodologias Empregadas

3.3.1 Obtenção de *Escherichia coli* recombinante

Para obtenção da bactéria recombinante, a linhagem nativa de *E. coli* JM101 foi submetida à preparação de células competentes, transformação e seleção. Essas etapas estão descritas nos itens a seguir.

3.3.1.1 Preparação de Células Competentes

O procedimento empregado para preparação das células está baseado no método descrito por HANAHAN (1983). Uma alçada de suspensão estoque de *E. coli* foi transferida para meio agar LB e cultivada por aproximadamente 18 h a 37° C. Com o auxílio de um palito de madeira estéril foi transferida uma única colônia isolada da bactéria para um tubo contendo 5 mL de meio LB. O tubo foi incubado por aproximadamente 3 h, ou até o caldo de cultivo atingir a absorbância entre 0,5 e 0,6, sob agitação de 150rpm e temperatura de 37°C. Transferiu-se 1 mL do caldo de cultivo para um microtubo plástico (2 mL) estéril e centrifugou-se a 4000 rpm, 4 °C por 10 min. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL de uma solução de CaCl₂ 0,1 M gelado e repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições. Novamente o precipitado foi ressuspenso com 0,1 mL de CaCl₂ 0,1 M gelado.

3.3.1.2 Transformação de Células Competentes

A transformação das células (*E.coli*) foi realizada de acordo com metodologia descrita por SAMBROOK e colaboradores (1989). Em 200 µL de suspensão de células competentes, preparadas conforme foi descrito no item 3.3.1, foi adicionado 2 µL da solução de DNA plasmidial (5 a 10 µM). O recipiente contendo células e plasmídeo foi incubado em banho de gelo por 30 min e em seguida em banho Maria a 42 °C por 45 segundos. Novamente resfriou-se a mistura em banho de gelo por 5 min e adicionou-se 800 µL de meio LB. Incubou-se a 37 °C, sob agitação de 150 rpm, durante uma hora, para recuperação das células. Centrifugou-se a 4000 rpm por 10 min à temperatura

ambiente e descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso em 100 μL de meio LB e alíquotas de 50 μL dessa solução foram transferidas e espalhadas em placas de meio agar LB, contendo ampicilina (100 mg.L^{-1}) a fim de se selecionar os transformantes, contendo o plasmídio que ancora o gene de resistência ao antibiótico. As placas foram incubadas por 24 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3.1.3 Seleção dos Recombinantes

Os recombinantes foram selecionados do meio agar LB contendo o antibiótico ampicilina, o qual é adequado para seleção, visto que o plasmídio ancora o gene de resistência a este antibiótico. Foi coletada das placas contendo os transformantes, uma única colônia com auxílio de um palito de madeira estéril. A colônia foi incubada em tubos de vidro rosqueados contendo 5 mL de LB e 5 μL de ampicilina, na concentração de 100 mg.L^{-1} durante aproximadamente 18 h em agitador orbital a 150 rpm e $37 \text{ }^\circ\text{C}$. A etapa posterior consiste na extração do DNA plasmidial e análise do mesmo em eletroforese em gel de agarose.

3.3.1.4 Extração do DNA plasmidial

Para o isolamento do DNA plasmidial foi utilizado um “kit” comercial para extração de DNA plasmidial do fabricante Gibco BRL. O preparo da cultura para extração do DNA plasmidial consistiu na transferência de uma colônia de transformante para um tubo contendo LB e ampicilina, o qual foi cultivado durante 24 horas em *shaker* a 150 rpm e temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$. A massa celular foi obtida pela centrifugação de uma alíquota de 1 mL do caldo de cultivo a 10000 rpm durante 10 min ($4 \text{ }^\circ\text{C}$). A massa foi ressuspenso nos tampões adequados a fim de se romper as células, eliminar o DNA genômico e obter o DNA plasmidial, sendo que o DNA plasmidial é ressuspenso em 75 μL de tampão TE.

3.3.2 Experimentos Preliminares: Efeito do ácido propiônico sobre o crescimento de *Escherichia coli* JM101

Sabe-se que o excesso de ácido propiônico no meio interfere negativamente no crescimento da *Escherichia coli*. Sendo este ácido um precursor do valerato, composto que está presente na composição do polímero desejado, foi necessário o estudo da quantidade de ácido a ser acrescentada no meio de cultura visando o crescimento sem causar inibição do mesmo. Assim, concentrações de 10, 15, 20 e 25 mM de ácido propiônico foram testadas neste trabalho. O meio de cultura utilizado foi o meio LB e

neste se adicionou 100 μ L de *Escherichia coli*, linhagem JM 101. Cultivou-se a bactéria a 37 ° C por 24 h, sob agitação de 150 rpm. Para avaliação do crescimento celular dos caldos de cultivo foram lidas as absorbâncias a 620 nm em fotolorímetro

3.3.3 Etapas da produção de polihidroxialcanoatos por *Escherichia coli* recombinante

Para os estudos de produção de PHA's por *E. coli* recombinante, de modo geral seguiu-se o fluxograma apresentado na figura 3.2.

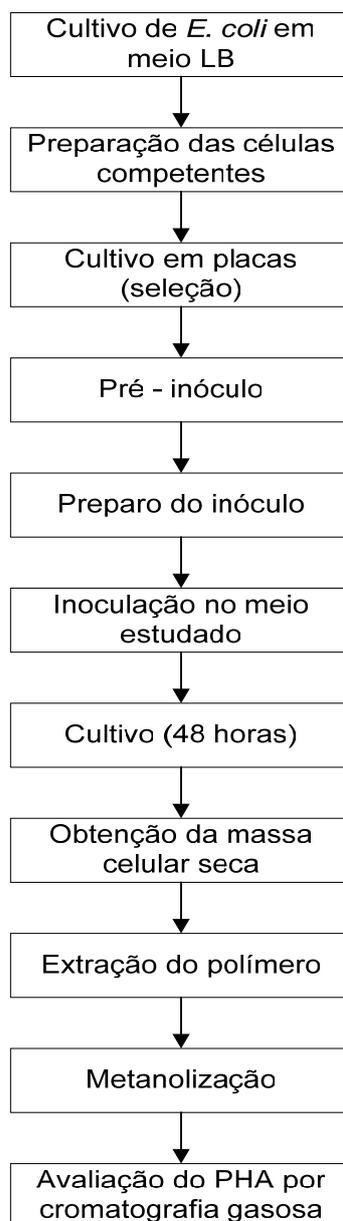


Figura 3.2 – Etapas da Produção de PHA's.

3.3.3.1 Preparo do pré-inóculo

Foi coletada da placa de Petri com os transformantes, com auxílio de um palito estéril, uma colônia e transferiu-se a mesma para meio LB contendo ampicilina na concentração de 100 mg. L⁻¹. O cultivo foi realizado em *shaker* por 24 horas a 37 °C sob agitação de 150 rpm.

3.3.3.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado a partir de 1 mL do pré-inóculo, sendo que este foi transferido para 100 mL de meio LB contendo ampicilina (100 mg. L⁻¹). O volume do pré-inóculo (1mL) correspondeu a 1% do volume total do meio utilizado para cultivo. O cultivo foi realizado nas mesmas condições do pré-inóculo, conforme descritas anteriormente.

3.3.4 Produção de P[3HB-co-3HV]

3.3.4.1 Produção sem utilização de suplementos

Neste tipo de produção, o inóculo foi adicionado ao meio de cultivo (LB) e glicose (20 g.L⁻¹), sendo que o volume de inóculo representa 10% do volume total de meio de cultivo. Neste meio de cultivo foi adicionado ainda ampicilina na concentração de 100mg. L⁻¹. O precursor de valerato empregado, ácido propiônico, foi adicionado ao meio na concentração de 10 mM, melhor condição encontrada, conforme determinado nos ensaios preliminares descritos anteriormente em 3.3.2. O pH foi verificado a fim de se manter o meio próximo da neutralidade.

O cultivo propriamente dito foi realizado em frascos agitados de 5 L, contendo 1 L de meio, sob agitação de 150 rpm, 37 °C, durante 48 horas.

3.3.4.2 Produção com utilização de suplementos

Os cultivos com utilização de suplementos seguiram as mesmas condições de temperatura, agitação e tempo dos cultivos sem suplementos. A adição dos suplementos ao meio de cultivo foi realizada antes da esterilização do mesmo.

Na ocasião em que o azeite de oliva foi utilizado como suplemento, este foi adicionado ao meio na concentração de 1,0 g. L⁻¹.

O ácido acético também foi utilizado como suplemento na concentração de 10 mM e quando este foi adicionado no meio, houve-se a necessidade de se corrigir o pH para 7,0, com solução de NaOH 10 M.

Foi realizada também a produção de poli [3HB-co-3HV] utilizando a combinação dos dois suplementos: ácido acético e azeite de oliva, nas mesmas concentrações de 10 mM e 1 g. L⁻¹, respectivamente.

3.3.4.3 Efeito do ácido itacônico sobre o crescimento de *E. coli*

Com o objetivo de determinar a concentração máxima de ácido itacônico que poderia ser empregada, sem inibição do crescimento celular, foram testadas três concentrações (5mM, 10mM e 15 mM) de ácido itacônico em um experimento prévio. Para isto cultivou-se a bactéria por 24 h em agitador orbital sob agitação de 150 rpm, temperatura de 37 °C e avaliou-se o crescimento celular medindo a absorbância a 620 nm em fotocolorímetro.

3.3.4.4 Inibição química da atividade de propionil-CoA carboxilase pelo ácido itacônico

Com o objetivo de inibir a atividade da enzima propionil-CoA carboxilase, foram realizados cultivos com e sem suplementos nas mesmas condições descritas anteriormente. Na presença de ácido itacônico, as concentrações dos suplementos também foram semelhantes às concentrações empregadas nos experimentos anteriores. Nestes experimentos também se avaliou o pH do meio a fim de mante-lo próximo à neutralidade.

3.3.9 Determinações Analíticas

3.3.9.1 Concentração de biomassa

A determinação da concentração da biomassa foi realizada por fotocolorimetria e gravimetria.

Utilizando um fotocolorímetro avaliou-se a turbidez do meio a uma absorvância de 620nm.

A massa celular seca foi avaliada por gravimetria, através da pesagem da massa celular produzida, após uma centrifugação a 8000 rpm e 4 °C durante 10 min em centrífuga Hitachi (modelo HIMAC CR20B2) e secagem dos precipitados obtidos em estufa a 50 °C por até 48 horas ou peso constante.

3.3.9.2 Extração dos PHA's produzidos

Da massa celular seca foram extraídos os biopolímeros produzidos. Essa massa foi macerada a fim de se aumentar a superfície de contato facilitando a extração dos PHA's. A extração foi feita utilizando o princípio de extração fracionada tipo Soxhlet, empregando como solvente o clorofórmio. O período de extração foi de 48 horas.

Após o refluxo, a massa celular seca foi filtrada e descartada. Os PHA's foram precipitados em metanol, sob agitação manual, e recuperados pela filtração da solução. A massa de polímero obtida foi pesada, para quantificação.

3.3.9.3 Avaliação do PHA produzido

A análise qualitativa foi feita por cromatografia gasosa conforme o método descrito por BRAUNEGG e colaboradores (1978).

Aproximadamente 10 mg do polímero é colocado em tubo de ensaio com tampa rosqueada (bem vedados) e neste foram adicionados 1 mL de uma solução de metanol acidificado (H_2SO_4 15%) contendo ácido benzóico na concentração de $0,4 \text{ g.L}^{-1}$, como padrão interno, e 1 mL de clorofórmio. A mistura foi aquecida em banho de óleo, a 100 °C durante 4 horas, sendo que após 1 hora de aquecimento a mistura deve ser agitada durante alguns segundos e depois devolvida ao aquecimento. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, adicionou-se 0,5 mL de água destilada às amostras, agitou-se e deixou-se decantar. A fase inferior (orgânica) foi recolhida com micropipeta e levada para

análise em cromatógrafo gasoso CG-90 equipado com detector de ionização de chama (DIC ar-hidrogênio).

A coluna utilizada no cromatógrafo é de sílica fundida (0,53 mm X 30 m) modelo Supercowax-10. O gás de arraste utilizado é o nitrogênio a 20 mL.min⁻¹ e as temperaturas de injeção, detecção e coluna são respectivamente de 90 °C, 230 °C e 110 °C. O volume injetado é de 1 µL.

Foram também submetidos à metanolização os padrões: poli-3-hidroxi-*butirato-co-3-hidroxi-*valerato** e poli-3-hidroxi-*butirato* (Sigma-Aldrich) com massa variando entre 0,0010 g e 0,010 g.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Influência da concentração de ácido propiônico no crescimento de *Escherichia coli*

Concentrações de 10, 15, 20 e 25 mM de ácido propiônico foram testadas a fim de se verificar seu efeito sobre o crescimento celular de *E. coli* e escolher a concentração menos tóxica para dar prosseguimento aos ensaios de produção de polímeros. Os resultados dos testes apresentados na Tabela 4.1 mostram que ácido propiônico exerce um efeito inibitório no crescimento celular da bactéria *E. coli* JM101 e que a concentração que menos inibiu o crescimento celular, dentre as testadas foi a de 10 mM.

Tabela 4.1 - Efeito da concentração de ácido propiônico sobre o crescimento celular de *E. coli* JM101 após 18 h de cultivo

Concentração de ácido propiônico (mM)	Absorbância 620 nm
10	0,064
15	0,040
20	0,040
25	0,006

Esta mesma concentração de ácido propiônico foi empregada por RHIE e DENNIS (1995) para avaliar a incorporação de valerato no copolímero P[3HB-co-3HV] produzido por *E. coli* K-12 recombinante. No entanto, com o mesmo propósito, FIDLER e DENNIS (1992) utilizaram 25 mM de ácido propiônico para outra linhagem de *E. coli* conseguindo incorporação de 20 a 30% mol de hidroxivalerato, enquanto CHOI e LEE (1999) em seus estudos acrescentaram 20 mM de ácido ao meio e conseguiram 7,2 % mol de incorporação de hidroxivalerato (HV).

Estas observações sugerem que a toxicidade exercida pelo ácido propiônico depende também da linhagem bacteriana empregada.

Levando-se em conta que os PHA's são armazenados intracelularmente, o crescimento bacteriano exerce grande influência na produtividade destes biopolímeros. Conforme já foi dito anteriormente, os polihidroxialcanoatos são acumulados na forma de grânulos no interior das células bacterianas. Assim, escolheu-se trabalhar com a concentração de 10 mM de ácido propiônico uma vez que a bactéria alcançou crescimento maior nesta condição.

4.2 Influência da concentração de ácido itacônico no crescimento de *Escherichia coli*

O itaconato é um forte inibidor do ciclo do glioxilato, característico de bactérias e tem a função de metabolizar acetato, quando este é a única fonte de carbono disponível para o crescimento celular. Este composto inibe a enzima isocitrato liase que tem papel fundamental no ciclo do glioxilato, visto que esta cliva o isocitrato em glioxilato e succinato.

MACFADDEN e colaboradores (1977) relataram que o itaconato reprime o crescimento bacteriano quando a ação catalisadora da isocitrato liase é obrigatória para o crescimento; um exemplo disso seria quando acetato é utilizado como única fonte de carbono. Porém, quando outras fontes de carbono estão presentes, a atividade da isocitrato liase não é requerida e o itaconato não é capaz de interferir no crescimento bacteriano.

Berg e colaboradores (2002) avaliaram a assimilação de propionato e acetato em *Rhodospirillum rubrum* utilizando diferentes concentrações de itaconato (0,5; 1,0; 1,5; 10 e 20 mM) com o objetivo de verificar a ação inibitória do mesmo na atividade da enzima propionil-CoA carboxilase.

Nesse trabalho foram empregadas concentrações parecidas às empregadas por BERG e colaboradores (2002) em seu estudo, com o objetivo de avaliar o crescimento de *E.coli* frente ao ácido itacônico.

A Tabela 4.2 apresenta os diferentes valores de crescimento, expressos como absorbância em 620 nm, em função da concentração empregada. O ácido itacônico

assim como o propiônico exerceu forte inibição do crescimento bacteriano. No entanto, a concentração de 5 mM foi empregada para os cultivos posteriores, visto que o crescimento bacteriano foi maior nesta condição.

Tabela 4.2 - Efeito do ácido itacônico no crescimento celular de *E. coli* JM101 após 18h de cultivo.

Concentração de ácido itacônico (mM)	Absorbância 620 nm
5,0	1,02
10,0	0,22
15,0	0,04

4.3 Produção de P[3HB-co-3HV] por *E. coli* recombinante utilizando-se ácido propiônico como precursor de valerato

O ácido propiônico é o precursor de valerato mais empregado atualmente para produção de P[3HB-co-3HV]. Conforme determinado em ensaio preliminar, a concentração de ácido propiônico empregada nesse estudo para produção de P[3HB-co-3HV] foi de 10 mM. A Tabela 4.3 apresenta o acúmulo de massa celular e produção de PHA utilizando glicose como fonte de carbono (20 g. L⁻¹). Observa-se uma diminuição no acúmulo de massa celular de 2,67 g. L⁻¹ para 0,56 g. L⁻¹ quando ácido propiônico é adicionado no meio. Também nota-se a diminuição drástica no acúmulo de PHA que passa de 1630 mg. L⁻¹ para 47 mg. L⁻¹ quando ácido propiônico é adicionado no meio de cultivo.

Esses resultados comprovam a toxicidade do ácido propiônico frente à *E. coli* JM101.

Conforme já era esperado, o polímero produzido no experimento na ausência de ácido propiônico consiste em P[3HB], visto que o precursor de valerato (ácido propiônico) não estava presente no meio.

Tabela 4.3 - Efeito da utilização de ácido propiônico no crescimento celular e na produção de PHA por *E. coli* recombinante

Meio de Cultura	Suplemento	Massa Celular (g.L ⁻¹)	Acúmulo de PHA (mg.L ⁻¹)	PHA	
				HB (mol%)	HV (mol%)
LB + Glicose	-	2,67	1630	100	0
LB + ác. Propiônico + glicose	-	0,56	47,0	80	20

4.4 Influência da utilização de azeite de oliva na produção de P[3HB-co-3HV]

O azeite de oliva é constituído de aproximadamente 70% de ácido oleico. LEE e colaboradores (1999) observaram que a utilização de ácido oleico como suplemento no cultivo de *E. coli* XL1-Blue (pJC4) recombinante proporcionava um aumento de 4% no acúmulo de PHA e de 12% na incorporação de valerato ao polímero. Sugere-se que este resultado seja devido ao fato de que o ácido oleico seria utilizado pela bactéria para o crescimento, aumentando assim, a quantidade de ácido propiônico disponível para ser incorporada como valerato.

LEE e colaboradores (1999) utilizaram uma concentração de 1 g.L⁻¹ de ácido oleico para produção do copolímero por *E. coli* recombinante. Nesse estudo empregou-se a concentração de 1 g.L⁻¹ de azeite de oliva como precursor de ácido oleico. Considerando-se que 70% do azeite de oliva é constituído de ácido oleico, a concentração de ácido oleico presente no meio de cultivo corresponderia a 0,7 g.L⁻¹. Os resultados obtidos com a utilização do ácido oleico como suplemento podem ser observados na Tabela 4.4.

De acordo com a Tabela 4.4, pode-se observar que a suplementação com azeite de oliva aumentou de 0,56 g. L⁻¹ para 1,1 g. L⁻¹ a massa celular produzida e de 47 mg.L⁻¹ para 261,5 mg .L⁻¹ a quantidade de polímero acumulada.

Tabela 4.4 - Efeito da suplementação do meio com ácido oléico no crescimento celular e na produção de PHA por *E. coli* recombinante

Meio de Cultura	Suplemento	Massa Celular (g.L ⁻¹)	Acúmulo de PHA (mg.L ⁻¹)	PHA	
				HB (mol%)	HV (mol%)
LB + ác. Propiônico + glicose	-	0,56	47,0	80	20
LB + ác. Propiônico + glicose	Azeite de oliva	1,10	261,5	96	4,0

O azeite de oliva é catabolizado nas bactérias por ação de lipases, liberando ácidos graxos. Os ácidos graxos são catabolizados através da β -oxidação. Um dos compostos intermediários gerados pela β -oxidação são os hidroxiacil-CoA, os quais são substratos para a biossíntese de PHA's. O aumento do acúmulo de polímero, bem como o crescimento celular, podem ser explicados pelo fato dos hidroxiacil-CoA, formados através do catabolismo dos ácidos graxos (azeite de oliva) serem utilizados tanto para síntese de polímeros quanto para o crescimento celular.

Avaliou-se também o efeito da suplementação com azeite sobre a incorporação de valerato através de cromatografia gasosa. A Figura 4.1 ilustra a composição de 3HB e 3HV no copolímero obtida na cultura sem suplementação de azeite de oliva e a Figura 4.2 apresenta a composição do polímero obtida com a suplementação de azeite de oliva.

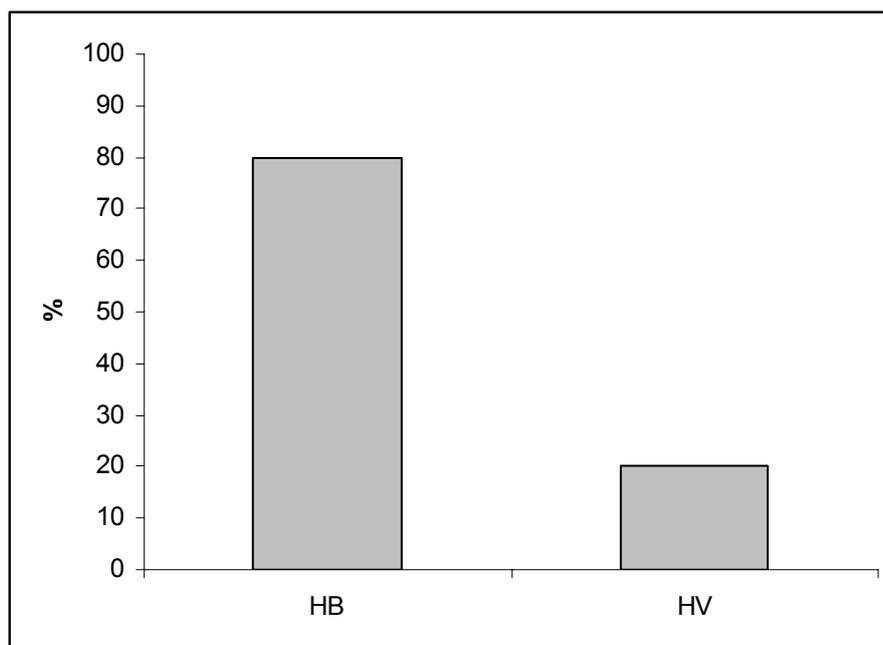


Figura 4.1 – Composição de 3HB e 3HV no copolímero obtida na cultura sem suplementação de azeite de oliva

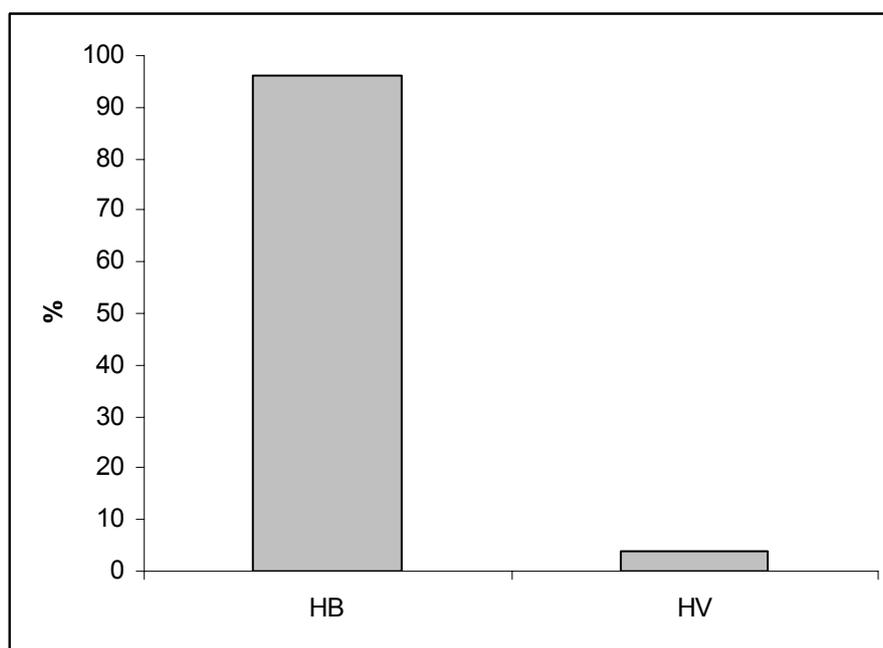


Figura 4.2 – Composição de 3HB e 3HV no copolímero obtida na cultura com suplementação de azeite de oliva

Embora a suplementação da cultura com de azeite de oliva tenha levado a um acréscimo no acúmulo de polímero, nesta condição ocorreu uma diminuição na incorporação de 3HV. MARANGONI (2000) e SQUIO e colaboradores (2003) também observaram um aumento no acúmulo de polímero e uma diminuição na incorporação de valerato em culturas de *Ralstonia eutropha* suplementadas com ácidos oleico e linoleico. Pode-se explicar a diminuição da incorporação de 3-hidroxicincoano, quando se utiliza a suplementação com azeite, pela maior produção do intermediário 3-hidroxiacetil-CoA, vindo da β -oxidação, o qual deverá competir com o sítio ativo da PHA sintase com o 3-hidroxicincoil-CoA, produzido a partir do propionato (propionil-CoA).

4.5 Influência da utilização de ácido acético na produção de P[3HB-co-3HV]

Sabe-se que os mecanismos de absorção e degradação do ácido propiônico são semelhantes aos mecanismos de degradação e absorção de ácido acético. LEE e colaboradores (1999) avaliaram a produção de P[3HV-co-3HB] por *Escherichia coli* recombinante utilizando ácido acético como indutor da incorporação de 3HV e obtiveram um aumento de 6,6% na incorporação de 3-hidroxicincoano.

Com o objetivo de aumentar o acúmulo de P[3HB-co-3HV] bem como a incorporação de valerato no copolímero foi utilizado nesse estudo ácido acético concentrado. Na Tabela 4.5 são apresentados os resultados obtidos nos experimentos com a utilização de ácido acético e sem a adição de qualquer outro suplemento.

Tabela 4.5 - Efeito da suplementação de ácido acético no crescimento celular e na produção de PHA por *E. coli* recombinante

Meio de Cultura	Suplemento	Massa Celular (g.L ⁻¹)	Acúmulo de PHA (mg.L ⁻¹)	PHA	
				HB (mol%)	HV (mol%)
LB + ác. Propiônico + glicose	-	0,56	47,0	80	20
LB + ác. Propiônico + glicose	Ácido acético	0,15	ND	ND	ND

ND: Não detectável

A utilização de ácido acético como suplemento na concentração de 10 mM diminuiu em 73,21% a massa celular acumulada. Ao contrário de LEE e colaboradores (1999), a quantidade de polímero acumulada foi insignificante. Segundo YIM e colaboradores (1995) o ácido acético tem efeito negativo sobre o crescimento celular o que se pode explicar o fato de se ter uma menor massa celular e conseqüentemente um menor acúmulo do polímero.

Um outro fato que pode explicar a baixa massa celular é a linhagem da bactéria utilizada para os cultivos. Acredita-se que a linhagem JM101 seja bem sensível ao ácido acético o que difere da linhagem XL1-Blue empregada por LEE e colaboradores (1999).

4.6 Influência da combinação de suplementos na produção de P[3HB-co-3HV]

A combinação dos suplementos azeite de oliva e ácido acético, também não apresentou vantagens sobre acúmulo de massa celular e polímero. Os resultados deste experimento e dos experimentos utilizando cada um dos suplementos separadamente podem são apresentados na Tabela 4.6.

Novamente se confirma o fato de que a utilização de ácido acético inibe o crescimento celular bem como o acúmulo de polímero, sendo que em ambos os cultivos em que se utilizou ácido acético como suplemento não foi verificado o acúmulo de polímero. Conforme já foi dito, acredita-se que a linhagem JM101 de *Escherichia coli* não seja capaz de catabolizar com sucesso o ácido acético e em conseqüência este é acumulado no microrganismo, tornando-o tóxico.

Tabela 4.6 - Efeito da combinação de suplementos no crescimento celular e na produção de PHA por *E. coli* recombinante

Meio de Cultura	Suplemento	Massa Celular (g.L ⁻¹)	Acúmulo de PHA (mg.L ⁻¹)	PHA	
				HB (mol%)	HV (mol%)
LB + ác. Propiônico + glicose	-	0,56	47,0	80	20
LB + ác. Propiônico + glicose	Azeite de oliva e ácido acético	0,10	ND	ND	ND

ND: Não detectável

4.7 Efeito do ácido itacônico sobre a produção de P[3HB-co-3HV]

O ácido itacônico foi utilizado na concentração de 5 mM visto que nessa concentração BERG e colaboradores (2002), inibiu a atividade da propionil-CoA carboxilase de *Rhodospirillum rubrum*. O itaconato foi utilizado como uma estratégia metabólica para favorecer a incorporação de valerato a partir do ácido propiônico.

Espera-se que com o emprego do ácido itacônico, uma maior quantidade de ácido propiônico esteja disponível para ser incorporada na forma de valerato, uma vez que a principal enzima do catabolismo do ácido propiônico vai estar inativa ou inibida. A via catabólica do ácido propiônico compete com a via de biossíntese de PHA's pelo ácido adicionado no meio de cultivo.

Foram realizados experimentos utilizando o ácido itacônico com e sem o emprego de suplementos, sendo que os suplementos e as concentrações empregadas foram semelhantes aos experimentos anteriores em que não se utilizava ácido itacônico. A Tabela 4.7 relata os resultados dos experimentos utilizando ácido itacônico.

Tabela 4.7 - Efeito da utilização de ácido itacônico nos diferentes cultivos

Meio de Cultura	Suplementos	Massa Celular (g.L ⁻¹)	Acúmulo de PHA (mg.L ⁻¹)
LB + ác. propiônico + glicose + ác. itacônico	-	0,36	NC
LB + ác. propiônico + glicose + ác. Itacônico	azeite de oliva	0,38	ND
LB + ác. propiônico + glicose + ác. Itacônico	ácido acético	0,17	ND
LB + ác. propiônico + glicose + ác. itacônico	azeite de oliva e ácido acético	0,13	ND

NC: Não caracterizavel; ND: Não detectável

De acordo com a tabela 4.7, observa-se que na maioria dos cultivos não ocorreu formação de PHA, sendo que no cultivo sem a utilização de suplementos houve a formação de PHA em pequena quantidade impossibilitando a caracterização do mesmo. Também nota-se que a massa celular obtida não foi muito significativa. As Figuras 4.3 e 4.4 apresentam uma comparação entre o crescimento celular das culturas com adição de ácido itacônico e sem a adição do mesmo.

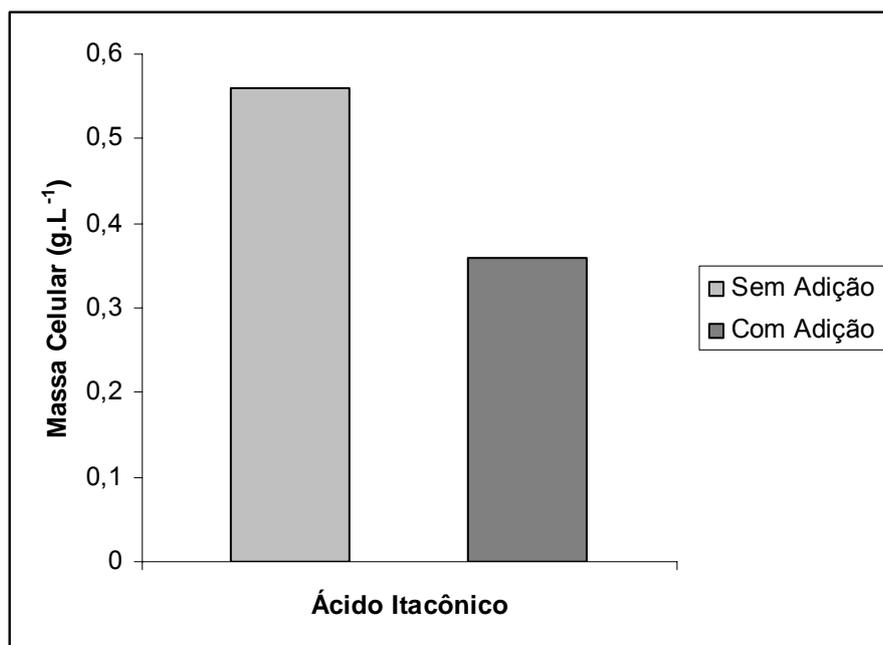


Figura 4.3 – Comparação do crescimento celular entre as culturas com e sem adição de ácido itacônico

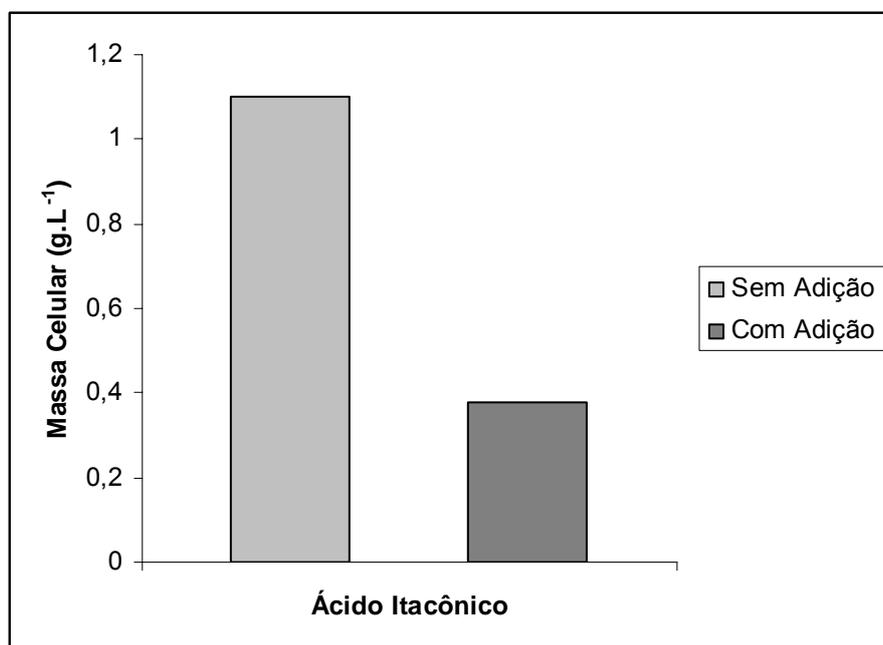


Figura 4.4 – Comparação do crescimento celular entre as culturas com e sem adição de ácido itacônico utilizando azeite como suplemento

Na cultura não suplementada a adição de ácido itacônico diminuiu em torno de 36% o crescimento celular. Na cultura suplementada com azeite de oliva, a adição do ácido teve um efeito inibitório muito significativo visto que diminuiu em 65% o crescimento celular.

MACFADDEN e colaboradores (1977) relataram que o itaconato não reprime o crescimento bacteriano quando a ação catalisadora da isocitrato liase não é obrigatória para o crescimento, ou seja, quando se tem outra fonte de carbono além de acetato. Ao contrário de MACFADDEN e colaboradores (1977), o ácido itacônico mostrou-se reprimir o crescimento de *E. coli* JM101 recombinante, sendo a principal fonte de carbono a glicose.

Acredita-se que devido o crescimento celular ter sido baixo, o PHA produzido não foi possível de ser quantificado e caracterizado.

Capítulo 5

CONCLUSÕES

De acordo com os experimentos realizados pode-se concluir que:

- A maior massa celular ($2,67 \text{ g.L}^{-1}$) e o maior acúmulo de PHA (61%) foi obtido no experimento em que o ácido propiônico não foi adicionado ao meio. Neste experimento foi produzido unicamente P[3HB].

- A linhagem *E. coli* JM101, empregada neste estudo, mostrou-se extremamente sensível aos ácidos propiônico, itacônico e acético. A toxicidade destes ácidos diminui a produção de massa celular.

- Embora tóxico, o ácido propiônico se mostrou um precursor efetivo das unidades de valerato na produção do copolímero. A adição de ácido propiônico propiciou o acúmulo de 8,4% de P[3HB-co-3HV] com incorporação de 20% de HV. Esta porcentagem de valerato no copolímero dificilmente é alcançada quando linhagens selvagens são utilizadas.

- A suplementação com azeite de oliva mostrou resultados bastante similares aos de trabalhos anteriores utilizando outras linhagens bacterianas. A adição de azeite aumentou a massa celular e a produção de polímero.

- Em termos absolutos, a quantidade de valerato em mg.L^{-1} , incorporado ao polímero, com e sem suplementação é de 9,4 e 10,4 respectivamente. Esse resultado e a observação de que 740 mg.L^{-1} de ácido propiônico é adicionado no meio, portanto não é limitante, sugerem que não é possível aumentar a incorporação de valerato ao polímero.

- Surpreendentemente ao contrário dos outros resultados da literatura, o ácido acético, na concentração estudada, inibe o crescimento de *E. coli* JM101, e por esta razão não foi possível à determinação de polímero na biomassa. Sugere-se que este efeito está relacionado à linhagem empregada.

- O ácido itacônico, na concentração estudada, foi o que teve efeito negativo sobre o crescimento celular, assim não foi possível avaliar a produção de polímero e estratégia de inibição da PCC.

Capítulo 6

SUGESTÕES

De acordo com os resultados e conclusões obtidas nesse estudo pode-se sugerir alguns trabalhos futuros como:

- Estudar a suplementação com ácido acético empregando diferentes concentrações (inferiores a empregada nesse estudo) desse ácido a fim de se obter uma concentração ótima capaz de não exercer poder inibitório no crescimento celular;
- Avaliar a produção de PHA por *E. coli* recombinante empregando outras linhagens menos sensíveis a ácido propiônico;
- Estudar a produção de PHA's e incorporação de valerato por *E. coli* recombinante JM101 empregando concentrações menores de ácido propiônico;
- Testar concentrações menores de ácido itacônico no cultivo de *E. coli* recombinante JM101 para produção de copolímero.
- Estudar a utilização da água de biodigestão como precursor de unidades de valerato visto que esta contém ácidos orgânicos, inclusive o ácido propiônico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDOR, I. S.; KIM, S. W.; PRATHER, J. K. L.; KEASLING, J. D. Metabolic engineering of novel propionate-independent pathway for the production of poly(3-hydroxybutirate-co-3-hydroxyvalerate) in recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3848-3854, 2002.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Reviews**, v. 54, p. 450-472, 1990.

BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R.M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutiric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 6, p. 29-37, 1978.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 65, p. 127-161, 1998.

BERG, I.A.; FILATOVA, L.V.; IVANOVSKY, R.N. Inhibition of acetate and propionate assimilation by itaconate via propionyl-CoA carboxylase in isocitrate lyase-negative purple bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 216, p. 49-54, 2002.

BERTANI, G. Studies on lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 62, p. 293-300, 1951.

BYRON, D. Polymer synthesis by microorganisms; technology and economics. **Trends Biotechnol.**, v. 5; p. 246-250, 1987.

CIÊNCIA HOJE. **Como nocautear um gene**. V. 25, p. 22-23, 1999.

CHOI, J.; LEE, S.Y. Factors affecting the economics of polyhydroalkanoates production by bacterial fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, V. 51, p. 13-21, 1999.

DAWES, E.A.; SENIOR, P.J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. **Adv. Microbiol. Physiol.**, v. 10, p. 135-266, 1973.

DEE SMET, M. J.; EGGINK, B.; WITHOLT, J.; KINGMA, J.; WYNBERG, H. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. **Journal Bacteriol.**, v. 154, p. 870-878, 1983.

DOI, Y.; KUNIOKA, M.; NAKAMURA, Y.; SOGA, K. Biosynthesis of polyesters by *Alcaligenes eutrophus*: Incorporation of ¹³C-labelled acetate and propionate. **Journal Chemical Socyete**, p. 1696-1697, 1987.

DOI, Y.A.; SEGAWA; KUNIOKA, M. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutirate-co-4-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*. **Int. Journal Biol. Macromol.** v. 12, p.106-111, 1990.

DOI, Y.; KANESAWA, Y.; KUNIOKA, M.; SAITO, T. Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutirate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutirate-co-4-hydroxybutyrate). **Macromol.**, v. 23, p. 26-31, 1990.

DOI, Y.; KITAMURA, S.; ABE, H. Microbial synthesis and characterization of poly (3-hydroxybutirate-co-3-hydroxyhexanoate). **Macromol.**, v. 28, p. 4822 – 4828, 1995.

DU, G.; YU, J. Metabolic análise on fatty acid utilization by *Pseudomonas oleovorans*: Mcl-poly(3-hydroxyalcanoates) síntesis versus β -oxidation. **Process Biochemistry**, v.38, p.325-332, 2002.

FAVA, A. L. B. **Clonagem e expressão do regulon-scr em *Alcaligenes eutrophus* visando a produção de poli-hidroxibutirato a partir de sacarose.** 1997. 101p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)- Instituto de Ciência Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FONSECA, G. G. **Produção de polihidroxialcanoatos por *Escherichia coli* recombinante.** 2003. 154p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina (Centro Tecnológico), Florianópolis.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v. 166, p. 557-580, 1983.

HAWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J; DAWES, E.A. The importance of PHB sintase substrate specificity in poly-hydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microb. Letters**, v. 57, p. 1-6, 1989.

HOCKING, J.; MARCHESSAULT, R.H. Biopolyesters, In : G.F.L. Griffin (Ed.), **Chemistry and Technology of biodegradable Polymers**, Chapman and Hall, London, p. 48-96, 1994.

HOLMES, P.A. Applications of PHB - a microbially produced biodegradable thermoplastic. **Phys. Technol.**, v.16, p. 32-36, 1985.

HUIJBERTS, G.N.M.; EGGINK, P.W.; HUISMAN, G.W.; WITHOLD, B. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly (3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. **Appl. Environ. Microbiol.**, V. 58, p. 536-544.

JINAN HUAMING BIOCHEMISTRY Co, LTD. Catálogo de Produtos. Disponível em: <<http://www.jnhuaming.com>>. Acesso em: outubro de 2004.

JOHNSTONE, B. A throw away answer. **Far Eastern Econ. Rev**, v. 174, p. 62-63, 1990.

JOURNAL OF AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. Composition of seven different types of plant oils analyzed for 38 compounds. V.62, n. 3, p. 533, 1985.

KAWGUCHI, Y.; DOI, Y. Kinetics and metabolism of synthesis and degradation of poly(3-hydroxybutirate) in *Alcaligenes eutrophus*. **Macromolecules**, v.25, p. 2324-2329, 1992.

KOBAYASHI, G.; SHIOTANI, T.; SHIMA, Y.; DOI, Y. Biosynthesis and characterization of (3-hydroxybutirate-co-3-hydroxyhexanoate) from oils and fats by *Aeromonas* sp. OL-338 and *Aeromonas* sp. FA440. **Biodegradable Plastics and Polymers**, p. 410-416, 1994.

KOROTKOVA, N.; CHISTOSERDOVA, L.; KUKSA, V.; LIDSTROM, M.E. Glyoxylate regeneration pathways in the methylotroph *Methylobacterium extorquens*. **AMI. J. Bacteriol.** V. 184, p. 1750-1758, 2002.

LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Production of poly(hydroxyalkanoic acid). **Adv. In Bioch Eng/Biotechnol**, v. 52, p. 27-85, 1995.

LEE, S.Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Elsevier Science**, v.14, 1996a.

- LEE, S.Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnol. Bioeng.** , v. 49, p.1-14, 1996b.
- LEE, S.Y.; DO; V.M.; HUISMAN, G.W.; PEOPLES, O.P. PHB polymerase from *Zoogloea ramigera*. Gen Bank accession nºU66242, 1996c.
- LEE, S.Y.; CHOI, J.I. High-Level production of Poly(3-hydroxybutirate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 4363-4368, 1999.
- LEE, S.Y.; PARK, S.J. Fermentative production of SCL-PHA's in: Doi, Y.; STEIBÜCHEL (Eds). **Biopolymers**, v.3, p. 263-290, 2002.
- LUIZIER, W.D. Materials derived from biomass biodegradable materials. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.89, p. 839-842, 1992.
- MACFADDEN, B. A.; PUROBIT, S. Itaconate, an isocitrato lyase-directed inhibitor in *Pseudomonas indigofera*. **Journal Bacteriol.**, v. 144, p. 131-136, 1977.
- MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic Engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, nº 1, p. 1092-2172, 1999.
- MARANGONI, C. **Estudo de Estratégias de Produção de Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha* utilizando substratos de baixo custo e Ácido Propiônico**. 2000. 191p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina (Centro Tecnológico), Florianópolis.
- MARCHESSAULT, R. H. Tender morsels for bacteria: recent developments in microbial polyesters. **Trends Polymer**, v.4, p. 163-168, 1996.
- MERGAERT, J.; WEBB, A.; ANDERSON, C.; WOUTERS, A.; SWINGS, J. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutirate) and poly(3-hydroxybutirate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 3233-3238, 1993.
- METABOLIX. Nature's Plastic, Markets and Applications. Disponível em: <http://www.metabolix.com/natures%20plastic/markets.html>. Acesso em: março de 2003.

NAWRATH, C.; POIRIER, Y.; SOMERVILLE, C. Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. **PNAS**, v. 91, p. 12760-12764, 1994.

PAGE, W.L. Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* in media containing sugars and complex nitrogen sources. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 38, p. 117-121, 1992.

PARK, S. J.; AHN, W. S.; GREEN, P. R.; LEE, S. Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains **Biomacromolecules**, v. 2, p. 248-254, 2001.

POIRIER, Y.; NAWRATH, C.; SOMERVILLE, C. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. **Bio/ Technology**, v. 13, p. 142-150, 1995.

RAMSAY, B.A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBÉ, B.; BATAILLE, P.; RAMSAY, J.A. Production of poly(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acids. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 2093-2098, 1990.

REDDY, C.S.K.; GHAI, R.; RASHMI, V.; KALIA, C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v.87, p. 137-146, 2003.

REVISTA PHARMANEWS. Consumo de Plástico Anual no Brasil, março de 2003, v. 13, p. 34. Disponível em: <<http://www.revistapharmanews.com.mx/2003/marco/p34/>> Acesso em: 7 de junho de 2004.

SAEGUSA, H.; SHIRAKI, M.; KANAI, C.; SAITO, T. Cloning of intracellular poly[D(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of gene product. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 94-100, 2001.

SAITO, T.; TAKIZAWA, K.; SAEGUSA, H. Intracellular poly-(3-hydroxybutyrate) depolymerase in *Alcaligenes eutrophus*. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p. 187-191, 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, A. A generalized model of plasmid replication. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 33, p. 1135, 1989.

SCHWEIGER, G.; BUCKEL, W. On the dehydration of (R) lactate in the fermentation of alanine to propionate by *Clostridium propionicum*, **FEBS Letters**, v. 171, p. 79-84, 1984.

SILVA, L.; RODRIGUES, M.F.; GOMEZ, J.G. Biodiversidade brasileira é fonte de microorganismos produtores de plásticos e elastômeros biodegradáveis. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/biodiversidade/bio15.htm>,2001.

SQUIO, C.R.; FERREIRA, C.M.; ARAGÃO, G.M. F. Utilização de ácidos linoleico e oleico como suplementos nutricionais aumenta a produção de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha*. Artigo não publicado, 2003.

STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H. G. Physiology and molecular genetics of poly(β -hydroxyalkanoic acid). Synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. **Mol. Microbiol.**, v. 5, p. 535-542, 1991.

STEINBÜCHEL, A.; PIEPER, U. Production of copolyester of 3-hydroxybutiric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon sources by a mutant of *A. eutrophus*. **Applied Microbiol Biotechnol**, v. 37, p. 1-6, 1992.

STENBÜCHEL, A.; AERTS, K.; BABEL, W.; FÖLLNER, M.; LIEBERGESELL, M. H. Considerations of the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p. 94-105, 1995.

STENBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH, B. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends Biotechnol.**, v.16, p. 419-427, 1998.

STENBÜCHEL, A.; EVERSLOH, T. L. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 81-96, 2003.

STRAUSS, G.; FUCHS, G. Enzymes of novel autotrophic CO₂ fixation pathway in the phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, the 3-hydroxypropionate cycle. **Eur. J. Biochem.**, v. 215, p. 853-866, 1993.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Síntesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Prog. Polym. Sci.**, v.25, p. 1503-1555, 2000.

TIMM, A.; STEINBÜCHEL, A. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Eur. J. Biochem.**, v. 209, p. 15-30, 1992.

TSUGE, T. Review: Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 6, p. 579-584, 2002.

VALENTIN, H. E.; MITSKY, T.A.; MAHADEO, D.A.; TRAN, M.; GRUYS, K.J. Application of propionyl coenzyme A synthase for poly(3-hydroxypropionate-co-hydroxybutirate) accumulation in recombinant *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5223-5258, 2000.

VARGAS, R.S.S; ALVAREZ, D. P.; RIO, A. L. D. Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cell. PNAS, v. 33, p. 5325-5330, 2002.

WANG, J.G.; BAKKEN, L.R. Screening of soil bacteria for poly-beta-hydroxybutiric acid production and its role in the survival of starvation, **Microb. Ecol.**, v. 35, p. 94-104, 1998.

WILLIAMS, J.O.; ROCHE, T.E.; MCHADDEN, B.A. Mechanism of action of isocitrate lyase from *Pseudomonas indigofera*. **Biochemistry**, v. 10, p. 1384-1390, 1971.

YIM, K.S.; LEE, S.Y.; CHANG, H.N. Effect of acetic acid on poly(3-hydroxybutirate-co-3-hydroxyvalerate) synthesis in recombinant *Escherichia coli*. **Korean J. of Chem. Eng.**, v. 12 (2), p. 264-268, 1995.

ANEXOS

Anexo 1

Cromatograma do padrão de Poli [3-Hidroxibutirato-co-3-Hidroxivalerato] – Sigma-Aldrich

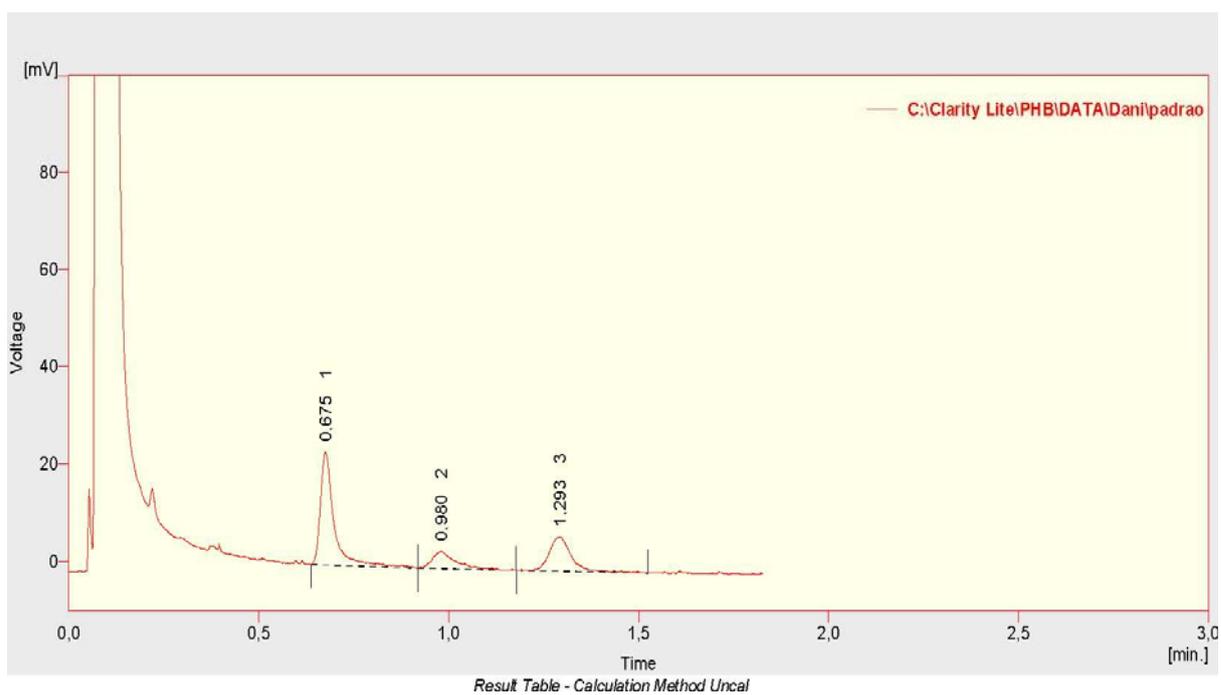


Figura A1 - Cromatograma do padrão de Poli [3-Hidroxibutirato-co-3-Hidroxivalerato] – Sigma-Aldrich