

Universidade Federal de Santa Catarina
Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

Michele Cristina Formolo Garcia

Proposta de um processo de extração de poli(3-hidroxi-butirato) produzido por
Cupriavidus necator e seu efeito sobre as características do polímero

Florianópolis

2006

Michele Cristina Formolo Garcia

Proposta de um processo de extração de poli(3-hidroxi-butirato) produzido por
Cupriavidus necator e seu efeito sobre as características do polímero

Trabalho apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Santa Catarina.

Área de concentração: Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Dra. Gláucia M. Falcão de Aragão.

Co-orientadora: Dra. Ana Paula Testa Pezzin.

Florianópolis

2006

Termo de Aprovação

Michele Cristina Formolo Garcia

Título do trabalho: Desenvolvimento de um processo de extração e seu efeito sobre as características do poli(3-hidroxi-butirato) produzido por *Cupriavidus necator*.

Apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Santa Catarina.

Área de concentração: Engenharia de Alimentos.

Data da Aprovação: 30 de outubro de 2006.

Componentes da Banca Examinadora

Co-orientadora: Dra. Ana Paula Testa Pezzin Instituição: Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE Assinatura: _____
Prof ^a Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider Instituição: Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE Assinatura: _____
Prof ^a Dra. Regina Vasconcellos Antonio Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Assinatura: _____

Dedicatória

Andréa L. S. Schneider e Ana Paula T. Pezzin,

Professoras que são da minha vida... Vocês são as grandes responsáveis por este trabalho. Obrigado pelo apoio em todos os momentos, pela amizade e principalmente pelo exemplo de vida.

Gilvan

Meu grande amor. Obrigado pela compreensão e pelo carinho em todos os momentos me dando forças para chegar até aqui.

Vitor e Simone, Erica e Azziz

Perdão pelos momentos que passaram, pela filha ausente que fui neste período...E obrigado pela compreensão e apoio incondicional em todos os momentos.

Agradecimentos

Profa. Gláucia M. F. de Aragão,
Pela orientação e conselhos na construção deste trabalho.

Delne e Vitor,
Obrigado por estarem sempre por perto e não medirem esforços para me ajudar nos momentos mais críticos deste trabalho. Divido com vocês agora a vitória da finalização deste trabalho.

Daniele, Luciana, Karin,
Pela amizade, companheirismo e por também por contribuírem com a execução deste trabalho.

Leslie e Bea,
Pelas tantas vezes que me escutaram e ajudaram a compreender quando eu estava desesperada. Sobretudo pela amizade.

Gianinne P. Apati
Pela amizade e paciência, auxiliando-me com muitos dos programas utilizados neste trabalho.

Katiusca Wessler,
Pela amizade, pelo companheirismo estabelecido por compartilharmos essa mesma fase. E, pelas análises de FTIR e DRX, que tanto contribuíram para enriquecer este trabalho.

Ângelo Adolfo Ruzza,
Pela análise de GPC, de fundamental importância neste trabalho, e pela paciência, me explicando e respondendo sempre a todos os meus questionamentos.

Prof. MSc. Theodoro M. Wagner,
Pela eterna paciência, me auxiliando sempre a encontrar soluções a cada nova dúvida, dividindo a cada conversa um “pouquinho” do seu conhecimento.

Prof^{ta} Dra. Eliana A.R. Duek
Pelas análises de DSC, que tanto contribuíram para a compreensão de muitos dos fenômenos ocorridos com as amostras estudadas.

Prof. Dr. Sérgio H. Pezzin e Prof Dr. César E. da Costa,
Pela análise de TGA, que juntamente com o DSC tanto enriqueceu este trabalho.

Prof^{ta}. Dra. Denise Abati
Pelo apoio e compreensão, permitindo que eu muitas vezes me ausentasse para concluir este trabalho.

À todos que comigo trabalham nos Laboratórios de Biotecnologia e nos demais Laboratórios de Pesquisa,

Pela amizade e compreensão nos momentos em que não pude dar a atenção que esperavam de mim.

Aos membros da banca,

Por aceitarem avaliar este trabalho, contribuindo com suas sugestões.

Resumo

O poli(3-hidroxi butirato), P(3HB), é um poliéster natural da classe dos polihidroxi alcanoatos (PHAs), produzido e acumulado como reserva de energia por muitos microrganismos, com predomínio no uso da bactéria *Cupriavidus necator*. Esse polímero tem atraído muita atenção devido a sua biocompatibilidade, termoplaticidade, piezoeletricidade e também pela vantagem de ser degradado pela ação de microrganismos de ocorrência natural, sofrendo redução da massa molar, transformando-se em CO₂ e H₂O. Contudo, sua aplicação é ainda limitada devido ao custo de produção muito elevado. Para diminuir os custos de produção de P(3HB), faz-se necessário o desenvolvimento de novos processos de produção e extração do polímero a um custo mais baixo e com impacto ambiental reduzido. Atualmente, os métodos utilizados no processo de extração de P(3HB) envolvem o uso de solventes orgânicos, dispersão de hipoclorito de sódio e clorofórmio, digestão enzimática, métodos mecânicos e, recentemente, foi proposto o uso de soluções aquosas de surfactante e quelante. Neste contexto, este trabalho vem propor um método mecânico alternativo para a extração do P(3HB) usando para ruptura celular pérolas de vidro em um moinho de bolas, estudando o efeito das diferentes condições de extração sobre as características e a biodegradação em solo compostado do poli(3-hidroxi butirato). O método proposto foi otimizado por um planejamento fatorial, através do qual foi selecionada a melhor condição do processo. Com a melhor condição selecionada foi testada ainda a estratégia de manutenção da biomassa, utilização de temperatura visando elevar o rendimento da extração e finalmente foi realizada a comparação entre a melhor condição do método mecânico proposto com o método químico utilizando dispersão de hipoclorito de sódio e clorofórmio. Após o processo de extração as amostras foram divididas em dois grupos, sendo um grupo submetido a uma etapa de purificação (n-hexano) e outro grupo sem esta etapa. As amostras foram caracterizados por FT-IR, DRX, DSC, TGA e GPC. As condições ótimas do processo de extração foram 0,7 g de pérolas de vidro com 1,25 mm de diâmetro para 2 mL de suspensão celular e 1 mL de clorofórmio. O método mecânico desenvolvido para extração de P(3HB) de *Cupriavidus necator* apresentou um rendimento de extração 5% superior quando comparado ao método químico, conferindo ainda melhores propriedades térmicas ao polímero. A temperatura de fusão do polímero obtido pelo método mecânico purificado foi 175°C e para o método químico purificado foi de 178°C enquanto a temperatura de início de degradação térmica foi 282°C para o método químico e 281°C para o método mecânico. A etapa de purificação demonstrou clara influência sobre as propriedades finais do polímero, sendo os polímeros não purificados menos estáveis termicamente que os polímeros purificados. Para avaliar a biodegradação, os filmes preparados por evaporação de solvente, foram enterrados no fundo de copos de Becker contendo solo compostado por 7, 14 e 21 dias. A análise visual mostrou que a taxa de biodegradação ocorre na seguinte ordem: Químico não-purif. > Químico purif. > Mecânico não-purif. > Mecânico purif., demonstrando a forte influência da purificação sobre as propriedades e estabilidade final do P(3HB). Apesar da etapa de purificação tornar os polímeros mais cristalinos e causar redução da massa molar, os filmes apresentaram melhores propriedades térmicas e foram mais estáveis quanto à degradação causada tanto por temperatura quanto por microrganismos do solo.

Palavras-chaves: poli(3-hidroxi butirato), extração, caracterização, biodegradação.

Abstract

Poly(3-hydroxybutyrate), P(3HB), is a natural polyester from polyhydroxyalkanoates (PHAs) class. It is produced and accumulated as energy reserve by many microorganisms and the most widely employed bacterium is *Cupriavidus necator*. This polymer has attracted much attention due its biocompatible, thermoplastic and piezoelectric properties and also has the advantage of being degraded by the action of microorganisms of natural occurrence. In environment PHAs suffer reduction molecular mass, and is transformed into CO₂ and H₂O. However, its application has been limited because of the high cost of production. To decrease the production cost of P(3HB), it is very important to develop a new process of production and recovery of polymer with low cost and low environmental impact. Currently, the methods used in the process of recovery of P(3HB) involve the use of organic solvents, dispersion of hypochlorite and chloroform, enzymatic digestion, mechanical methods and recently, the use of surfactant-chelate aqueous solution was proposed. In this context, this work proposes a mechanical method alternative for the recovery of P(3HB) using bead mills disruption for the cell, studying the effect of different conditions of recovery on the characteristics and the biodegradability in soil bureal that poly(3-hydroxybutyrate). The proposed method was optimized with a factorial planning, through with the best process condition was selected. With the better condition selected was still tested a maintenance strategy of biomass, the use of temperature for increase the yield of recovery and finally was realized the comparison between the better condition of mechanical and chemical method using sodium hypochlorite dispersion and chloroform. After the recovery process the samples were divided in two groups: one considered as control and the other group was submitted to a purification with n-hexane. The samples were characterized by FT-IR, DRX, DSC, TGA e GPC. The optimal conditions of the recovery process were 0.7 g of bead mills with 1.25 mm of diameter for 2 mL of cell suspension and 1 mL of chloroform. The mechanical method developed for the recovery of P(3HB) from *Cupriavidus necator* presented a yield 5% higher when compared with the chemical method and better thermal properties for the polymer was achieved. The melting temperature of polymer purified obtained by the mechanical method was 175°C and by the chemical method was 178°C. The temperature of beginning of thermal degradation was 282°C for the polymer treated by chemical method and 281°C by the mechanical method. The purification step showed clear influence under the final properties of polymer, it was confirmed by the less thermal stability observed for the polymers not purified. To evaluate the biodegradation, the films prepared by casting, were buried in Beckers with soil fertile for 7, 14 and 21 days. The visual analysis showed that the rate of biodegradation was: Chemical not-purified > Chemical purified > Mechanical not-purified > Mechanical purified. It showed the strong influence of purification over final properties and stability of P(3HB). Although purification turned the polymers more crystalline and caused decrease in the molecular mass, the films present better thermal properties and were more stable in relation to degradation caused by temperature and soil microorganisms.

Keywords: poly(3-hydroxybutyrate), recovery, characterization, biodegradation.

Lista de Figuras

CAPÍTULO 1	4
Figura 1.1: Esquema demonstrando o ciclo fechado de produção de PHAs.....	9
Figura 1.2: Fórmula estrutural dos polihidroxicanoatos (PHAs).....	10
Figura 1.3: Micrografia eletrônica de transmissão de células de <i>Ralstonia eutropha</i> contendo 90% em massa de grânulos de poli(3-hidroxiacetato) no interior das bactérias.....	12
Figura 1.4: Esquema demonstrando como se dá a produção de PHA pela bactéria.....	15
Figura 1.5: Micrografias eletrônicas de transmissão da bactéria <i>C. necator</i> : (a) na fase de crescimento e (b) na fase de produção.....	17
Figura 1.6: Esquema da via metabólica de síntese e degradação de P(3HB) em bactérias.....	24
Figura 1.7: Análise do custo de operação para uma produção anual de P(3HB) de 2.850 ton/ano, para diferentes microrganismos e métodos de extração, considerando (a) surfactante-hipoclorito e (b) hipoclorito-clorofórmio.....	27
Figura 1.8: Técnicas aplicadas à ruptura celular em larga escala.....	28
Figura 1.9: Representação gráfica do princípio de cromatografia por exclusão.....	35
Figura 1.10: Apresentação de uma curva típica de DSC.....	38
Figura 1.11: Curvas termogravimétricas para os polímeros: poli(cloreto de vinila) (PVC), poli(metacrilato de metila) (PMMA); polietileno de alta densidade (HDPE); politetrafluoretileno (PTFE) e poliiimida PI.....	39
Figura 1.12: Fotos demonstrativas das atuais aplicações do P(3HB).....	44
Figura 1.13: Degradação de frascos de Biopol® em lodo ativado.....	47
CAPÍTULO 2. MATERIAIS E MÉTODOS	49
Figura 2.1: Equipamento utilizado para o cultivo de <i>Cupriavidus necator</i> em frascos agitados.....	52
Figura 2.2: Biorreator utilizado no processo de cultivo de <i>Cupriavidus necator</i>	53
Figura 2.3: Fluxograma do processamento das amostras.....	54
Figura 2.4: Fluxograma do processamento das amostras durante o processo de extração mecânico.....	61
Figura 2.5: Fluxograma demonstrando o processamento das amostras durante o processo de extração mecânico, com etapa de aquecimento antes do rompimento celular.....	62
Figura 2.6: Fluxograma do processamento das amostras durante o processo de extração químico.....	63
Figura 2.7: Cuba de vidro para formação do filme por evaporação lenta de solvente....	64
Figura 2.8: Fluxograma do processo das amostras extraídas.....	65

CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO - SÍNTESE E EXTRAÇÃO DE P(3HB) POR <i>Cupriavidus necator</i>	71
Figura 3.1: Crescimento celular (expresso em ln de abs), consumo de substrato e produção de P(3HB) por <i>Cupriavidus necator</i> a 30°C.....	72
Figura 3.2: Evolução do cultivo de <i>Cupriavidus necator</i> a 30°C expresso em concentração de biomassa total (Xt), biomassa residual (Xr), formação de proteína (P) e produção de P(3HB).....	74
Figura 3.3: Análise estatística demonstrando a influência sobre os parâmetros volume de clorofórmio, volume de suspensão celular, massa de pérola e diâmetro das pérolas..	79
Figura 3.4: Gráfico de superfície demonstrando a interação entre diâmetro das pérolas e de suspensão celular sobre o rendimento de extração de P(3HB).....	81
Figura 3.5: Gráfico de superfície demonstrando a interação entre volume de suspensão celular e massa das pérolas sobre o rendimento de extração de P(3HB).....	81
Figura 3.6: Gráfico de superfície demonstrando a interação entre o volume de clorofórmio e o diâmetro das pérolas sobre o rendimento de extração de P(3HB).....	82
Figura 3.7: Gráfico de superfície demonstrando a interação entre o volume de clorofórmio e o volume de suspensão celular sobre o rendimento de extração de P(3HB).....	83
Figura 3.8: Efeito do tempo de tratamento com temperatura antes do processo de extração no moinho de bolas sobre o rendimento do processo de extração do P(3HB)...	86
Figura 3.9: Efeito do tempo de tratamento com temperatura antes do processo de extração no moinho de bolas sobre o % de pureza do P(3HB).....	87
Figura 3.10: Efeito do tempo de tratamento com temperatura após o processo de extração no moinho de bolas sobre o rendimento do processo de extração do P(3HB).....	88
Figura 3.11: Efeito do tempo de tratamento com temperatura após o processo de extração no moinho de bolas sobre o % de pureza do P(3HB).....	88
CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO - CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE P(3HB) OBTIDOS POR <i>Cupriavidus necator</i>	92
Figura 4.1: Espectros de FTIR para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico e mecânico com e sem a etapa de purificação: a) mecânico purificado; b) químico purificado; c) mecânico não-purificado; d) químico não-purificado.....	93
Figura 4.2: Difractogramas de raios-X para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico e mecânico com e sem a etapa de purificação: a) mecânico purificado; b) químico purificado; c) mecânico não-purificado; d) químico não-purificado.....	95
Figura 4.3: Curvas de DSC (1° e 2°aquecimento) para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico e mecânico com e sem a etapa de purificação: a) mecânico purificado; b) químico purificado; c) químico não-purificado; d) mecânico não-purificado.....	97
Figura 4.4: Curvas termogravimétricas dos filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico e mecânico com e sem a etapa de purificação: a) químico purificado; b) mecânico purificado; c) químico não-purificado; d) mecânico não-purificado.....	100
Figura 4.5: Curvas obtidas pela análise de GPC para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico e mecânico com e sem a etapa de purificação: a) mecânico	

purificado; b) mecânico não-purificado; c) químico purificado; d) químico não-purificado.....	102
---	-----

CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO - BIODEGRADAÇÃO EM SOLO DOS FILMES DE P(3HB) EXTRAÍDOS PELO MÉTODO MECÂNICO E QUÍMICO A PARTIR DE *Cupriavidus necator* 105

Figura 5.1: Análise visual para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico purificado em função do tempo de biodegradação em solo compostado.....	107
---	-----

Figura 5.2: Curvas de DSC (1º e 2º aquecimento) para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método mecânico purificado em função do tempo de biodegradação em solo compostado: a) 0 dias; b) 7 dias; c) 14 dias; d) 21 dias.....	108
---	-----

Figura 5.3: Curvas de DSC (1º e 2º aquecimento) para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método mecânico não purificado em função do tempo de biodegradação em solo compostado: a) 0 dias; b) 7 dias; c) 14 dias; d) 21 dias.....	108
---	-----

Figura 5.4: Curvas de DSC (1º e 2º aquecimento) para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico purificado em função do tempo de biodegradação em solo compostado: a) 0 dias e b) 7 dias.....	111
---	-----

Figura 5.5: Curvas de DSC (1º e 2º aquecimento) para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico não purificado em função do tempo de biodegradação em solo compostado: a) 0 dias e b) 7 dias.....	111
---	-----

Figura 5.6: Curvas termogravimétricas dos filmes de P(3HB) extraídos pelo método mecânico purificado em função do tempo de biodegradação em dias: a) 0; b) 7; c) 14; d) 21.....	113
--	-----

Figura 5.7: Curvas de TGA dos filmes de P(3HB) extraídos pelo método mecânico não purificado em função do tempo de biodegradação em dias: a) 0; b) 7; c) 14; d) 21..	114
---	-----

Figura 5.8: Curvas termogravimétricas dos filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico com etapa de purificação em função do tempo de biodegradação em dias: a) 0; b) 7.....	116
---	-----

Figura 5.9: Curvas de TGA dos filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico sem a etapa de purificação em função do tempo de biodegradação em dias: a) 0; b) 7...	117
---	-----

ANEXO 1 – Curvas de Correlação..... 134

Figura A.1: Curva de correlação abs X peso seco para as células de <i>C. necator</i>	135
---	-----

Figura A.2: Curva padrão típica para determinação da concentração de P(3HB).....	135
---	-----

Figura A.3: Curva padrão para determinação da concentração de substrato.....	135
---	-----

Figura A.4: Curva padrão para determinação da concentração de proteína.....	136
--	-----

Figura A.5: Curva de correlação Log Mw X tempo de retenção para cálculo de massa molar do P(3HB).....	136
--	-----

ANEXO 2 – Curvas de Consumo de O₂ e substrato..... 137

Figura B.1: Evolução do consumo de O ₂ (expresso em pO ₂ %) do cultivo em batelada alimentada de <i>Cupriavidus necator</i>	138
--	-----

Figura B.2: Evolução do consumo de substrato do cultivo em batelada alimentada de <i>Cupriavidus necator</i> a 30°C.....	138
---	-----

Lista de Tabelas

CAPÍTULO 1	4
Tabela 1.1: Alguns representantes da família dos PHAs.....	11
Tabela 1.2: Custo de operação para uma produção anual de PHB de 2.850 ton/ano, para diferentes microrganismos e métodos de extração, considerando (a) surfactante-hipoclorito e (b) hipoclorito-clorofórmio.....	27
Tabela 1.3: Comparação entre as principais características do P(3HB) e do PP.....	40
Tabela 1.4: Possíveis aplicações para o P(3HB).....	43
Tabela 1.5: Fatores que influenciam na degradação dos polímeros biodegradáveis.....	46
Tabela 1.6: Biodegradação de um filme de 1mm de P(3HB-co-3HV) em diferentes ambientes.....	47
CAPÍTULO 2. MATERIAIS E MÉTODOS	49
Tabela 2.1: Composição do meio mineral (MM).....	51
Tabela 2.2: Composição da solução de oligoelementos.....	51
Tabela 2.3 Volumes de água, amostra e reagentes utilizados na dosagem de nitrogênio.....	57
Tabela 2.4: Planejamento fatorial utilizado para a escolha do processo ideal de extração. no experimento em <i>shaker</i>	60
Tabela 2.5: Valores utilizados no planejamento fatorial.....	60
CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO - SÍNTESE E EXTRAÇÃO DE P(3HB) POR <i>Cupriavidus necator</i>	71
Tabela 3.1: Concentração da biomassa total, biomassa residual máxima, P(3HB) máximo e substrato (açúcar invertido) consumido ao longo de 30h de cultivo, parâmetros globais de fator de conversão de substrato em biomassa residual e em P(3HB) e produtividade em biomassa residual e em P(3HB).....	75
Tabela 3.2: Planejamento fatorial completo utilizado para o método mecânico adaptado com moinho de bolas.....	76
Tabela 3.3: Análise de variância (ANOVA) demonstrando a variação significativa (valores em vermelho) sobre os parâmetros: volume de clorofórmio, volume de suspensão celular, massa de pérolas e diâmetro das pérolas.....	78
Tabela 3.4: Efeito das diferentes estratégias de manutenção sobre o rendimento de extração e pureza do P(3HB).....	84
Tabela 3.5: Comparação entre os métodos de extração químico e mecânico.....	89
CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO - CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE P(3HB) OBTIDOS POR <i>Cupriavidus necator</i>	92
Tabela 4.1: Bandas características no espectro de Infravermelho para o P(3HB) obtido pelas diferentes técnicas de extração, comparadas com a literatura.....	94

Tabela 4.2: Grau de cristalinidade dos filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico e mecânico com e sem a etapa de purificação, determinados por difração de raios-X.....	95
Tabela 4.3: Dados de temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (α_c) determinados a partir das curvas de DSC (1° aquec.); temperatura de transição vítrea (T_g), T_m , ΔH_m e grau de cristalinidade (α_c) (2° aquec.) para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico e mecânico com e sem a etapa de purificação.....	98
Tabela 4.4: Dados de temperatura de início de degradação (T_i), temperatura máxima de degradação (T_{pico}) e porcentagem de perda de massa determinados a partir das curvas de TGA dos filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico e mecânico com e sem a etapa de purificação.....	100
Tabela 4.5: Dados de massa molar ponderal média ($\overline{M_w}$), massa molar numérica média ($\overline{M_n}$) e polidispersividade, determinados a partir da análise de GPC dos filmes de P(3HB) extraídos pelos métodos mecânico e químico com e sem a etapa de purificação.....	103
 CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO - BIODEGRADAÇÃO EM SOLO DOS FILMES DE P(3HB) EXTRAÍDOS PELO MÉTODO MECÂNICO E QUÍMICO A PARTIR DE <i>Cupriavidus necator</i>	105
Tabela 5.1: Dados de temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (α_c) determinados a partir das curvas de DSC (1° aquec.); temperatura de transição vítrea (T_g), T_m , ΔH_m e α_c (2° aquec.) para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método mecânico purificado e não purificado em função do tempo de biodegradação em solo compostado.....	109
Tabela 5.2: Dados de temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (α_c) determinados a partir das curvas de DSC (1° aquec.); temperatura de transição vítrea (T_g), T_m , ΔH_m e grau de cristalinidade (α_c) (2° aquec.) para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico purificado e não purificado em função do tempo de biodegradação em solo compostado.....	111
Tabela 5.3: Dados de temperatura de início de degradação (T_i), temperatura máxima de degradação (T_{pico}) e porcentagem de perda de massa, determinados a partir das curvas de TGA dos filmes de P(3HB) extraídos pelo método mecânico purificado em função do tempo de biodegradação.....	113
Tabela 5.4: Dados de temperatura de início de degradação (T_i), temperatura máxima de degradação (T_{pico}) e porcentagem de perda de massa, determinados a partir das curvas de TGA para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método mecânico sem a etapa de purificação em função do tempo de biodegradação.....	114
Tabela 5.5: Dados de temperatura de início de degradação (T_i), temperatura máxima de degradação (T_{pico}) e porcentagem de perda de massa, determinados a partir das curvas de TG e DTG dos filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico com a etapa de purificação em função do tempo de biodegradação.....	116
Tabela 5.6: Dados de temperatura de início de degradação (T_i), temperatura máxima de degradação (T_{pico}) e porcentagem de perda de massa, determinados a partir das curvas de TG e DTG dos filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico sem a	117

etapa de purificação em função do tempo de biodegradação.....

Tabela 5.7: Dados de massa molar ponderal média (\overline{M}_w), massa molar numérica média (\overline{M}_n) e polidispersividade, determinados a partir da análise de GPC dos filmes de P(3HB) extraídos pelos métodos mecânico e químico com e sem a etapa de purificação, em função do tempo de biodegradação.....

118

Lista de Abreviaturas e Siglas

Abs – absorbância

DSC – calorimetria diferencial exploratória

FTIR – espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

3HV – 3-hidroxicaprolato

3HA – 3-hidroxicaprolato

(3HB) – 3-hidroxiadipato

(4HB) – 4-hidroxiadipato

LCL – alcenoatos de cadeia longa

Mw – massa molar ponderal média

MM – meio mineral

MCL – alcenoatos de cadeia média

PHAs – polihidroxicaprolatos

P(3HB) – poli(3-hidroxiadipato)

PCL – poli(ϵ -caprolactona)

PLA – polilactídeo

P(3HB-co-3HV) – poli(3-hidroxiadipato-co-3-hidroxicaprolato)

PVC – poli(cloreto de vinila)

PE – polietileno

PP – polipropileno

$P_{P(3HB)}$ – produtividade em polímero ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

P_{Xr} – produtividade em célula ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

SCL – alcenoatos de cadeia curta

SEM - microscopia eletrônica de varredura

T_c – temperatura de cristalização ($^{\circ}\text{C}$)

T_g – temperatura de transição vítrea ($^{\circ}\text{C}$)

T_m – temperatura de fusão ($^{\circ}\text{C}$)

TGA – análise termogravimétrica

T_{inicial} ou T_i – temperaturas de início da degradação ($^{\circ}\text{C}$)

$T_{\text{máx ou pico}}$ – temperatura máxima de degradação ($^{\circ}\text{C}$)

UV – ultravioleta

X_r – biomassa residual (g/L)

X_t – biomassa total (g/L)

$Y_{P(3HB/S)}$ – fator de conversão de substrato em polímero

$Y_{X_r/S}$ – fator de conversão de substrato em célula

μ_{X_r} – velocidade específica de crescimento (h^{-1})

ΔH_m – entalpia de fusão (J/g)

χ_c – grau de cristalinidade (%)

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
SUMÁRIO	xvii
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1. REVISÃO DA LITERATURA	4
1.1 Histórico.....	4
1.2 Polímeros Biodegradáveis.....	7
1.2.1 Polihidroxicanoatos.....	8
1.2.1.1 O poli(3-hidroxiacetato).....	12
1.2.1.2 O poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato).....	13
1.3 Estratégias de cultivo.....	14
1.3.1 Organismos Produtores.....	16
1.3.1.1 <i>Cupriavidus necator</i>	17
1.3.1.2 <i>Alcaligenes latus</i>	18
1.3.1.3 <i>Azotobacter vinelandii</i>	19
1.3.1.4 Organismos metilotróficos.....	19
1.3.1.5 <i>Pseudomonas oleovorans</i>	20
1.3.1.6 Bactérias do gênero <i>Burkholderia</i>	20
1.3.1.7 <i>Escherichia coli</i>	21
1.3.1.8 Plantas transgênicas.....	22
1.4 Metabolismo em <i>Cupriavidus necator</i>	22
1.4.1 Biossíntese de P(3HB).....	23
1.4.2 Degradação intracelular de P(3HB).....	24
1.5 Fatores que afetam o custo de produção.....	25
1.6 Técnicas de extração.....	28
1.6.1 Técnicas de extração aplicadas na obtenção de P(3HB).....	31
1.7 Técnicas de caracterização de polímeros.....	34
1.7.1 Determinação de massa molar.....	34
1.7.1.1 Cromatografia de permeação em gel (GPC).....	35
1.7.2 Métodos espectroscópicos.....	36

1.7.3 Análise de difração de raios-X (DRX).....	36
1.7.4 Análises térmicas.....	37
1.7.4.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	37
1.7.4.2 Análise termogravimétrica (TGA).....	38
1.8 Propriedades do P(3HB).....	39
1.9 Aplicações dos biopolímeros.....	42
1.10 Biodegradação.....	45
CAPÍTULO 2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
2.1 Microrganismo.....	50
2.2 Meios de cultivo.....	50
2.3 Condições de cultivo.....	51
2.3.1 Ensaio realizado em frascos agitados.....	52
2.3.2 Ensaio realizado em biorreator.....	52
2.4 Técnicas analíticas.....	54
2.4.1 Processamento das amostras.....	54
2.4.2 Biomassa.....	54
2.4.3 Determinação da concentração de P(3HB).....	55
2.4.3.1 Metanólise.....	55
2.4.3.2 Cromatografia Gasosa.....	56
2.4.4 Determinação da concentração de substrato.....	56
2.4.5 Determinação do teor de nitrogênio.....	57
2.4.6 Determinação do teor de proteína.....	58
2.5 Metodologia utilizada nos cálculos.....	58
2.5.1 Fatores de conversão.....	58
2.5.2 Produtividade.....	59
2.6 Extração do polímero produzido pelo método proposto.....	59
2.7 Estratégia de manutenção da biomassa para a utilização do método mecânico de extração.....	61
2.8 Extração pelo método mecânico adaptado utilizando temperatura.....	62
2.9 Extração do polímero pelo método químico.....	63
2.10 Determinação do rendimento e grau de pureza dos métodos.....	64
2.11 Preparação dos filmes poliméricos.....	64
2.11.1 Purificação.....	65
2.12 Caracterização do P(3HB) obtido pelos diferentes métodos de extração.....	65
2.12.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	66

2.12.2 Difractometria de raios-X (DRX).....	66
2.12.3 Calorimetria diferencial exploratória (DSC).....	67
2.12.4 Análise termogravimétrica (TGA).....	68
2.12.5 Cromatografia de permeação em gel (GPC).....	68
2.12.6 Análise visual.....	69
2.13 Ensaio de Biodegradação.....	69
2.13.1 Preparação do solo.....	69
2.13.2 Ensaio de biodegradação.....	70
CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO - SÍNTESE E EXTRAÇÃO DE P(3HB) POR <i>Cupriavidus necator</i>	71
3.1 Cultivo de <i>Cupriavidus necator</i> em frascos agitados visando a produção de P(3HB).....	72
3.2 Cultivo de <i>Cupriavidus necator</i> em biorreator visando a produção de P(3HB).....	73
3.3 Extração do P(3HB) pelo método mecânico – Planejamento fatorial.....	75
3.4 Estratégias para manutenção da biomassa para utilização no método de extração mecânico.....	83
3.5 Extração pelo método mecânico adaptado utilizando temperatura.....	85
3.6 Comparação entre os métodos de extração mecânico e químico.....	89
3.7 Considerações finais.....	91
CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO - CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE P(3HB) OBTIDOS POR <i>Cupriavidus necator</i>	92
4.1 Influência da etapa de purificação sobre as características dos filmes de P(3HB) obtidos pelos métodos mecânico e químico.....	93
4.1.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	93
4.1.2 Difractometria de raios-X (DRX).....	94
4.1.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	96
4.1.4 Análise termogravimétrica (TGA).....	99
4.1.5 Cromatografia de permeação em gel (GPC).....	101
4.2 Considerações finais.....	104
CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO - BIODEGRADAÇÃO EM SOLO DOS FILMES DE P(3HB) EXTRAÍDOS PELO MÉTODO MECÂNICO E QUÍMICO A PARTIR DE <i>Cupriavidus necator</i>	105
5.1 Caracterização dos filmes de P(3HB) submetidos à biodegradação em solo compostado.....	106
5.1.1 Análise visual.....	106
5.1.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	107

5.1.3 Análise termogravimétrica (TGA).....	112
5.1.4 Cromatografia de permeação em gel (GPC).....	117
5.2 Considerações finais.....	119
CONCLUSÕES.....	121
SUGESTÕES E PERSPECTIVAS.....	121
REFERÊNCIAS.....	123
ANEXO 1 – CURVAS DE CORRELAÇÃO.....	134
ANEXO 2 – CURVAS DE CONSUMO DE O₂ E SUBSTRATO.....	137

INTRODUÇÃO

Desde o início do século passado, o uso de polímeros vem se tornando cada vez mais freqüente na sociedade. Basta um olhar ao redor para perceber a quantidade de artefatos produzidos pelo homem e que utilizam polímeros como matéria-prima para suas diferentes aplicações. Das embalagens, passando pelas hastes flexíveis, próteses, componentes eletrônicos, entre outros, os polímeros estão presentes na maioria dos utensílios de uso cotidiano (FILHO *et al.*, 2001).

A busca inicial pelos polímeros sintéticos conhecidos atualmente foi baseada em sua relativa inércia e resistência à biodegradação, ao contrário dos polímeros naturais como amido, celulose e proteínas. Os primeiros estudos relativos à biodegradação foram realizados visando retardar e prevenir o ataque por fungos, bactérias e outros organismos vivos a esses materiais. Em particular, os polímeros formados por hidrocarbonetos são resistentes ao ataque químico e biológico, de tal forma que isso lhes assegura longevidade, mantendo suas propriedades por longo tempo (FILHO *et al.*, 2001).

Segundo Miralles (1999), mais de 30% dos plásticos que são utilizados diariamente duram apenas os segundos que levamos para desembulhar um produto e rapidamente serão descartados nos aterros sanitários, que já estão saturados de resíduos plásticos. Tal acúmulo de lixo dificulta a circulação de líquidos e gases e retarda a estabilização de matéria orgânica, causando danos à natureza. Dados estatísticos mostram que, no Brasil, a produção anual de plásticos é de, aproximadamente, 2,3 milhões de toneladas, dos quais 40% se destinam à indústria de embalagens (SANTOS *et al.*, 2001).

Dentre os maiores problemas ambientais relacionados à utilização de materiais poliméricos, tais como o polipropileno (PP), poliestireno (PS), polietileno e poli(cloreto de vinila) (PVC) podem ser destacados o elevado tempo de degradação e a utilização de recursos não renováveis a curto prazo derivados do petróleo (OTAKE *et al.*, 1995).

A reciclagem e a incineração são métodos atualmente utilizados para a solução deste problema. Entretanto, quando reciclados, os polímeros perdem parte de suas propriedades químicas, físicas e mecânicas havendo ainda consumo de energia térmica, sendo necessário sempre acrescentar uma certa quantidade de material virgem no processamento. Somado a isso,

as aplicações de um material reciclado não são tão nobres quanto as dos polímeros não reciclados. O consumo estimado de embalagens plásticas em 2004 no Brasil foi em torno de 360 toneladas e reciclados 177 toneladas, representando 48% de embalagens pós-consumo recicladas (TONIAZZO, 2005).

A incineração, quando controlada de maneira apropriada, é uma alternativa praticada em muitos países. Porém, a queima de poliolefinas não halogenadas como polietilenos, polipropilenos e poliestirenos, libera principalmente dióxido de carbono na atmosfera ainda em quantidades negligenciáveis quando comparadas aos combustíveis fósseis, mas que em certos casos, produz materiais voláteis e tóxicos, como é o caso do PVC, cuja incineração libera ácido clorídrico (BRAUNEGG *et al.*, 1998).

Uma alternativa a esse problema são os polímeros biodegradáveis que vem despertando interesse de pesquisadores de todas as áreas, devido à diversidade de suas aplicações nos campos da biotecnologia, medicina, farmácia e agricultura.

Os plásticos biodegradáveis são polímeros que se degradam completamente ao ataque microbiano em um curto espaço de tempo, sob condições ambientais apropriadas. Dentre os biopolímeros em desenvolvimento destacam-se os polihidroxialcanoatos (PHAs). Além da vantagem de serem biodegradáveis, os PHAs ainda apresentam outras importantes características como a biocompatibilidade, a produção a partir de recursos renováveis como açúcares e ácidos graxos e propriedades termoplásticas, bem como características físicas e mecânicas semelhantes às do PP, polímero de origem petroquímica (SARTORI, 1998 *apud* SQUIO, 2003).

O poli(3-hidroxiбутирато), P(3HB), é o poliéster mais conhecido da família dos PHAs. Produzido e acumulado como reserva energética na forma de grânulos por inúmeros microrganismos com predomínio no uso da bactéria *Ralstonia eutropha*, quando submetidas a condições limitantes durante o crescimento (REDDY *et al.*, 2003), a partir de diversas fontes de carbono como carboidratos e ácidos carboxílicos (PRADELLA *et al.*, 2003). Eles podem ser completamente degradados a água e dióxido de carbono sob condições aeróbias e metano sob condições anaeróbias pelos microrganismos encontrados no solo, mar, lagos, entre outros (KHANNA *et al.*, 2005).

Contudo, o processo para a extração destes materiais utiliza reagentes fortes e muito impactantes para o ambiente, gerando grande quantidade de resíduos. Atualmente, os métodos utilizados no processo de extração de P(3HB) são: extração por solventes orgânicos, dispersão de

hipoclorito de sódio e clorofórmio, digestão enzimática, métodos mecânicos e, recentemente, foi proposto o uso de soluções aquosas de surfactantes e quelantes. Esses processos em sua maioria geram polímeros com boas propriedades, porém um grande volume de águas residuais é formado. Segundo Chen *et al.*, (2001a), para potencializar a produção de P(3HB), é necessário que se desenvolvam novos processos de síntese e extração deste polímero com custos mais baixos e impacto ambiental reduzido, buscando tornar estes polímeros mais competitivos e, desta forma, com aplicabilidade mais ampla na sociedade.

Neste contexto, o **objetivo** deste trabalho foi estudar o efeito do processo de extração sobre as características do poli(3-hidroxi-butarato) produzido por *Cupriavidus necator*.

Sendo os **objetivos específicos**:

- EXTRAIR o polímero sintetizado a partir da cultura de *Cupriavidus necator* DSM 545, propondo um método alternativo ao método proposto por Hahn *et al.* (1994), considerado como padrão;
- OTIMIZAR o método alternativo de extração proposto, utilizando um planejamento fatorial;
- ESTUDAR a necessidade da etapa de purificação dos filmes poliméricos formados pelos dois métodos de extração.
- CARACTERIZAR os polímeros produzidos por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), difratometria de raios-X (DRX), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TGA) e cromatografia de permeação em gel (GPC), verificando a influência das diferentes técnicas de extração sobre suas propriedades.
- AVALIAR a biodegradação dos filmes de P(3HB) obtidos pelos diferentes métodos de extração, com e sem etapa de purificação.

CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Histórico

O desenvolvimento na segunda metade do século XX foi profundamente caracterizado pelo surgimento dos polímeros, os quais constituem atualmente boa parte dos materiais utilizados pelo homem. Pode-se dizer com segurança que, atualmente, os polímeros representam um dos alicerces para o atual nível de desenvolvimento nos critérios de saúde e sobrevivência das pessoas ao redor do mundo (MEI & MARIANI, 2005).

Porém, o primeiro contato do homem com materiais resinosos e graxas extraídas e/ou refinadas se deu na Antigüidade, com os egípcios e os romanos, que os usaram para carimbar, colar documentos e vedar vasilhames. Somente no século XVI, com o advento dos

descobrimientos, os espanhóis e os portugueses tiveram o primeiro contato com o látex, um produto natural com características borrachosas, extraído de uma árvore das Américas (*Havea brasiliensis*) (CANEVAROLO, 2002).

Já na metade do século XVII, John Tracescant (1608 – 1662), um viajante britânico, trouxe do oriente para o ocidente a *gutta percha*, um material natural que se tornou de substancial importância por ser isolante e moldável em diversas formas. Durante o século XIX, a *gutta percha* foi o único polímero utilizado até 1940 quando foi substituído por materiais sintéticos de origem petroquímica (BYRDSON, 1995).

Em 1850, o britânico Alexander Parkes observou que, após a evaporação do solvente de um colóide fotográfico, produziu-se uma substância dura, flexível e impermeável, patenteada em 1856 como celulose (BYRDSON, 1995).

Um século mais tarde, filmes e materiais têxteis de polímeros sintéticos, tais como *nylon*, poliéster e poliolefinas foram utilizados em diversas aplicações industriais, como, por exemplo, em roupas. Em alguns casos, a excelente durabilidade destes polímeros sintéticos foi tida como sua maior vantagem, mas em outros, esta durabilidade tem gerado efeitos adversos de grande impacto ambiental (MOCHIZUKI, 2002).

Assim, de acordo com Rijk *et al.* (2002), a produção de poliésteres por microrganismos vem atraindo considerável atenção devido às suas potenciais aplicações como bioplásticos. Estes polímeros são denominados de polihidroxiacanoatos (PHAs) e, constituem uma família de diferentes poliésteres devido à variedade de monômeros conhecidos atualmente, tamanho da cadeia carbônica e ainda à presença de diversos grupos funcionais.

Os PHAs são estocados em forma de grânulos no interior dos microrganismos. A primeira determinação da composição de um PHA, foi realizada por Maurice Lemoigne, um microbiologista do Instituto *Pasteur*, em Paris, em 1926, em um bacilo de solo, *Bacillus megaterium* (LEE *et al.*, 1999) a degradação anaeróbia deste material desconhecido levou à excreção do ácido 3-hidroxibutírico. Lemoigne identificou este poliéster como poli(3-hidroxibutirato) (BRAUNEGG *et al.*, 1998).

Em 1958, Macrae & Wildinson, *apud* BRAUNEGG (1998), observaram que o *Bacillus megaterium* estocava o homopolímero especialmente quando a razão glicose/nitrogênio no meio era elevada e que o polímero era degradado rapidamente na ausência de fontes externas de carbono e energia, concluindo que o P(3HB) era uma fonte de carbono e energia.

No final da década de 50, W. R. Grace nos Estados Unidos produziu uma pequena quantidade para aplicação industrial. Tendo sido publicadas muitas patentes como resultado

deste esforço. Porém, o interesse comercial permaneceu dormente até a década seguinte (ASTAR & GRUYS, 2002).

Somente a partir da década de 70, a Imperial Chemical Industries (ICI), uma companhia inglesa, iniciou pesquisas e patentes para a produção de PHAs através de diversos processos (MARANGONI, 2000a). Essa mesma indústria criou um copolímero poli(3-hidroxitirato)-*co*-(3-hidroxiacetoato), (P(3HB-*co*-3HV)), Biopol[®], sintetizado por *Cupriavidus necator* (anteriormente conhecida por *Alcaligenes eutrophus* e mais tarde por *Ralstonia eutropha*) a partir de glicose e ácido propiônico. Desde então, uma variedade de copolímeros tem sido produzida pela *Ralstonia eutropha* e outros microrganismos através de várias fontes de carbono (LEE & CHANG, 1995).

Durante a década de 80, a tendência da pesquisa foi para a identificação e caracterização das várias unidades de hidroxialcanoatos (HAs) que constituíssem os poliésteres bacterianos. Isto resultou na descoberta de aproximadamente 125 diferentes HAs que então foram agrupados na grande família dos PHAs (SUDESH *et al.*, 2000).

Paralelamente, Lafferty & Braunegg (1988 *apud* MARCHESSAULT & YU, 2002), encontraram vantagens utilizando a cepa *Alcaligenes latus* para a produção comercial de P(3HB). Por alguns anos, em meados da década de 80, a Chemie Linz na Áustria comercializou P(3HB) com uma planta piloto de 40 toneladas por ano, utilizando um processo de extração com solvente para isolar e extrair o polímero.

Na década de 80, iniciou-se o estudo de produção de PHAs a partir de microrganismos recombinantes envolvendo a clonagem dos genes responsáveis pela biosíntese de PHAs de microrganismos produtores e, nos anos 90, a produção por plantas transgênicas passou a ser estudada e vista como potencial forma de produção de PHAs para o futuro (SUDESH *et al.*, 2000).

Em 1993, a ICI transferiu sua divisão biológica à Zeneca Ltda, que continuou o desenvolvimento dos PHAs para aplicação em *commodities*, incluindo o Biopol[®]. Contudo, a Zeneca vendeu os direitos do Biopol[®] à Monsanto em meados da década de 90. Em 2001, uma companhia Americana, a Metabolix, adquiriu os direitos do Biopol[®] da Monsanto e continuou a desenvolver pesquisas com transgênicos para manufatura em larga escala de PHAs através de fermentações e agricultura biotecnológica (WILLIAMS & MARTIN, 2002).

No Brasil, o desenvolvimento de tecnologia para obtenção do polímero biodegradável iniciou-se em 1992, por meio de um acordo de cooperação entre o Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) de São Paulo, a Cooperativa dos Produtores de Cana, Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo (Copersúcar), período em que foi registrada a marca BIOCYCLE[®]. Em

1994, foram concluídos os estudos laboratoriais dos quais originaram 5 patentes, e iniciaram-se os estudos para a implantação de uma planta piloto com o intuito de testar a tecnologia desenvolvida em laboratório em equipamentos de escala industrial. Em 1995, a instalação desta planta piloto na Usina da Pedra, em Serrana – S.P., foi completada, quando foram realizados os primeiros testes para a produção do P(3HB) e do copolímero P(3HB-co-3HV), com capacidade nominal da ordem de 5,0 ton./ano. A partir de 1996, os lotes obtidos foram enviados a Institutos de Pesquisa e empresas, no Brasil e no exterior. De posse destes resultados, a planta foi remodelada e adequada, voltando a operar no final de 2000, com capacidade de 50 ton./ano. Com a conclusão da rota de produção através da planta piloto, a próxima etapa é a implantação de uma planta comercial de produção, com capacidade para 2000 ton./ano que deverá entrar em produção ainda no ano de 2006 (www.biocycle.com.br).

1.2 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

Os materiais poliméricos estão presentes na vida cotidiana sob variadas formas, incluindo embalagens, filmes, lubrificantes e agentes de revestimento. A razão para esta diversidade é o fato de possuírem excelentes propriedades como, durabilidade, resistência à degradação e à corrosão por ácidos e bases, e ainda pelo fato de serem de baixo custo. Por outro lado, o acúmulo de resíduos plásticos vem se tornando um sério problema ambiental por não se degradarem após o uso. Procurando resolver este problema, existem várias pesquisas em tecnologias de tratamento destes resíduos. Neste contexto, o desenvolvimento de polímeros biodegradáveis vem surgindo como uma alternativa muito interessante (LEE *et al.*, 2002).

Alguns estudos no desenvolvimento de bioplásticos podem ser citados a exemplo dos realizados nas indústrias Fertec (*Ferruzzi, Ricercae Technology*) da Itália e Warner Lambert dos Estados Unidos, que estão desenvolvendo plásticos baseados em amido, completamente biodegradáveis. Estes plásticos podem ser utilizados para encapsulamento de remédios e embalagens alimentares. Outro plástico biodegradável – “Bioceta” – é baseado em celulose, desenvolvido pela *Rhone Poulenc’s* na Bélgica que combinado com aditivos, acelera a degradação por parte dos microrganismos. Também a empresa *Sekisui Chemistry* desenvolveu um plástico a partir da copolimerização de dois compostos químicos biodegradáveis baseados em derivados de poliésteres alifáticos (MARANGONI, 2000a).

Os polissacarídeos foram provavelmente os primeiros a serem utilizados dentre os polímeros produzidos microbiologicamente. Estes polímeros são produzidos como reserva de energia e como materiais estruturais em paredes celulares e cápsulas extracelulares (HIGGINS *et al.*, 1995). Destacam-se a goma xantana que é comercializada e o ácido hialurônico que é usado em cirurgias oftalmológicas. Outro polissacarídeo também citado é a pululana, muito aplicado na indústria cosmética, em alimentos dietéticos e como plástico biodegradável (LUONG *et al.* 1988).

A celulose é uma macromolécula biológica abundante em todas as plantas, muitos fungos e algumas algas e algumas bactérias como *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Sarcina*. A celulose bacteriana tem grandes aplicações na área médica, como é o caso do BIOFILL[®], BIOPROCESS[®] e GENGIFLEX[®], que já são realidade no setor de cuidado à saúde. Centenas de relatos já foram descritos sobre o sucesso das aplicações do BIOFILL[®] e BIOPROCESS[®], como suturas em casos de queimaduras de segundo e terceiro grau. Já o GENGIFLEX[®] foi desenvolvido para regenerar tecidos periodontais (JONAS & FARAH, 1998).

A poli(ϵ -caprolactona) é um dos poucos poliésteres obtidos unicamente por síntese química a partir de ϵ -caprolactona. Este polímero tem ampla aplicação em implantes ortopédicos, adesivos para liberação de agentes ativos e pigmentos dispersantes. Já o poli(L-ácido láctico), obtido por síntese química ou por fermentação bacteriana vem sendo muito utilizado na área médica para liberação controlada de drogas e enxertos vasculares (LEE *et al.*, 2002).

1.2.1 Polihidroxicanoatos

A família dos poliésteres microbiológicos, classificada como poli(hidroxicanoatos) (PHAs) tem recebido considerável atenção devido ao uso potencial destes polímeros como termoplásticos ambientalmente amigáveis (DOI, 1990). Os PHAs constituem uma classe geral de polímeros produzidos e acumulados como reserva de carbono e energia por inúmeros microrganismos.

A Figura 1.1 demonstra um esquema no qual uma cultura de cana-de-açúcar usa a luz solar para converter CO₂ e H₂O em carboidratos através da fotossíntese e, por sua vez, na forma de açúcares simples, fornecem a matéria-prima necessária para a produção do PHA. Um organismo específico é utilizado para converter os carboidratos em PHAs. O polímero é extraído e processado em produtos plásticos. Embora os PHAs sejam estáveis no uso normal,

quando depositados no meio ambiente, são metabolizados por microrganismos. A biodegradação, sob condições aeróbicas, produz novamente CO_2 e H_2O , concluindo o ciclo de vida sem impacto ao ambiente (www.biocycle.com.br).

De acordo com Marchessault & Yu (2002), é importante observar ainda que os microrganismos capazes de acumular grânulos de P(3HB) possuem as enzimas polimerase e depolimerase, demonstrando que estes grânulos podem ser considerados como subsistemas completos da célula, capazes de responder sinteticamente ou degradativamente ao *stress* fisiológico.

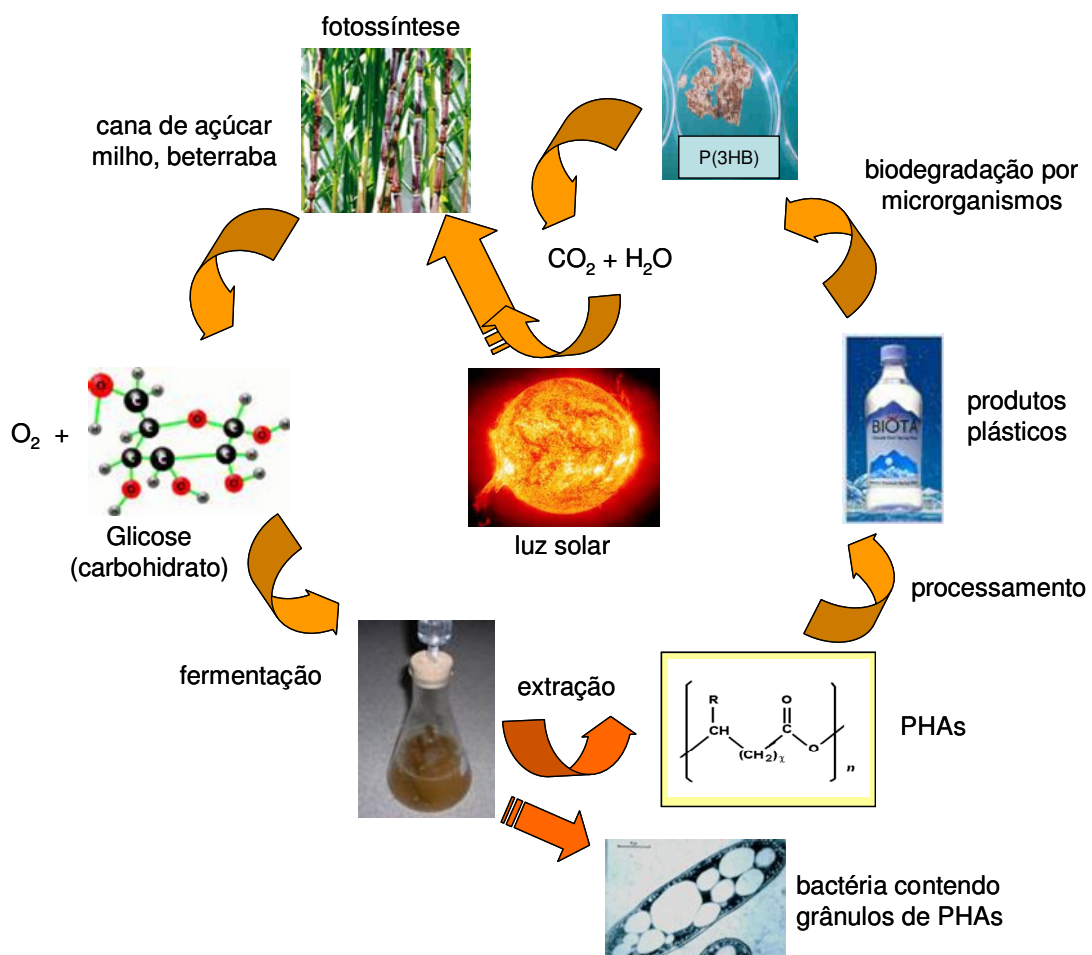


Figura 1.1: Esquema demonstrando o ciclo fechado de produção de PHAs.

A família dos PHAs é formada de poliésteres alifáticos compostos por monômeros de 3-hidroxiácidos, por carbono, oxigênio e hidrogênio, cuja fórmula estrutural está representada na Figura 1.2 (GOMES & BUENO NETTO, 1997). A massa molar é geralmente da ordem de

50.000 a 1.000.000 g/mol. A composição da cadeia lateral ou átomo R e o valor de X determinam a identidade da unidade monomérica. Mais de 90 diferentes unidades monoméricas já foram identificadas como constituintes dos PHAs em várias bactérias, algumas delas podem ser observadas na Tabela 1.1 (LEE, 1996a).

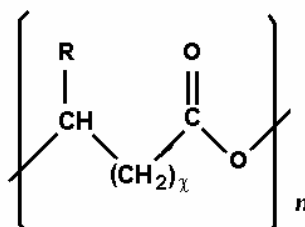


Figura 1.2: Fórmula estrutural dos polihidroxicanoatos (PHAs).

A composição do monômero do PHA determina as propriedades físicas e químicas do polímero, sendo que a alteração da composição do monômero poderia ou não gerar propriedades desejáveis para o polímero dependendo da aplicação. Esta composição depende da fonte de carbono, da rota metabólica e da especificidade da enzima do sistema de síntese (REHM & STEINBÜCHEL, 1999 *apud* WARD & O'CONNOR, 2005). Embora inúmeros PHAs diferentes já tenham sido descritos na literatura, somente alguns são produzidos em quantidades suficientes para caracterização e desenvolvimento de aplicações (STEINBUCHEL & VALENTIN, 1995).

Os PHAs são biodegradáveis tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias e em diferentes ambientes e biocompatíveis com vários tecidos humanos e sangue (MERGAERT *et al.*, 1993). Assim, eles têm sido empregados em aplicações médicas como suportes para o crescimento de tecidos ou “*scaffolds*” (SADER *et al.*, 2001), substituintes de cartilagens (STEVENS *et al.*, 2004), suturas cirúrgicas (YU & MARCHESSAULT, 2002) e substitutos pericárdicos (DUVERNOY *et al.*, 1995 *apud* IADEVAIA & MANTZARIS, 2006).

Tabela 1.1: Alguns representantes da família dos PHAs.

n = 1	R = hidrogênio R= metil R= etil R = propil R = pentil R= nonil	Poli(3-hidroxiopropionato) Poli(3-hidroxi butirato) Poli(3-hidroxi valerato) Poli(3-hidroxi hexanoato) Poli(3-hidroxi octanoato) Poli(3-hidroxi dodecanoato)
n = 2	R = hidrogênio R= metil	Poli(4-hidroxi butirato) Poli(4-hidroxi valerato)
n = 3	R = hidrogênio R= metil	Poli(5-hidroxi valerato) Poli(5-hidroxi hexanoato)
n = 4	R = hexil	Poli(6-hidroxi dodecanoato)

Fonte: LEE, 1996a.

A composição monomérica dos PHAs depende da bactéria produtora e também da fonte de carbono utilizada durante a fase de acumulação. De acordo com o número de átomos de carbono, os PHAs são classificados em polímeros de cadeia curta (3 – 5 átomos de carbono, PHA_{SCL}), polímeros de cadeia média (6 – 15 átomos de carbono, PHA_{MCL}) e polímeros de cadeia longa (com mais de 15 átomos de carbono, PHA_{LCL}) (JENDROSSEK *et al.*, 1996).

Os PHA_{MCL} foram descobertos como produtos de *Pseudomonas oleovorans* alimentadas com hidrocarbonos ou ácidos graxos, estes polímeros possuem propriedades físicas distintas, sendo considerados termoplásticos elastoméricos. (STEINBUCHER & VALENTIN, 1995).

Mais de 300 microrganismos são capazes de sintetizar PHAs. Porém, somente poucas bactérias têm sido empregadas nesta produção, devido à capacidade de serem cultivadas em alta densidade celular com alta produtividade em curto espaço de tempo (LEE & CHANG, 1995a).

Os PHAs são armazenados na forma de grânulos no interior de bactérias, como pode ser observado na Figura 1.3. A observação em microscópio destes grânulos em células bacterianas foi feita por Beijerinck em 1888 (BRAUNEGG *et al.*, 1998).

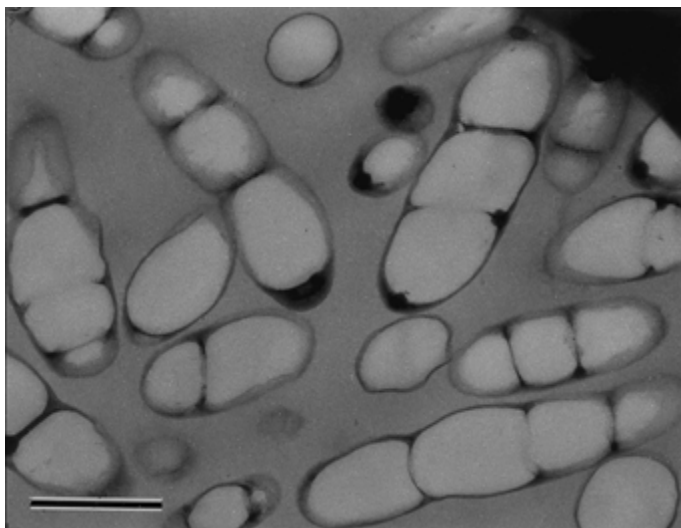


Figura 1.3: Micrografia eletrônica de transmissão de células de *Ralstonia eutropha* contendo 90% em massa de grânulos de poli(3-hidroxiacetato) no interior das bactérias (SUDESH, *et al.*; 2000).

1.2.1.1 O poli(3-hidroxiacetato)

O poli(3-hidroxiacetato), P(3HB), é um poliéster natural e biodegradável da família dos polihidroxiacetatos, sintetizado e acumulado no interior de diversas células microbianas na forma de grânulos intra-celulares com diâmetro de 100 a 800 nm (ANDERSON & DAWES, 1990).

De acordo com SUDESH *et al.* (2000), o P(3HB) é um poliéster com estrutura perfeitamente isotática, com somente a configuração (R).

O interesse industrial na produção do P(3HB) iniciou na década de 60, quando suas propriedades termoplásticas foram primeiramente descritas. Durante a década de 70, este polímero foi considerado como potencial substituto para os plásticos convencionais de origem petroquímica, uma vez que o P(3HB) é produzido através de fontes renováveis (GOMEZ *et al.*, 1997).

Alguns autores afirmam que a degradação térmica do P(3HB) normalmente ocorre a temperaturas logo acima da sua temperatura de fusão (T_m) (190°C), liberando um odor característico de ácido crotonico (ASTAR & GRUYS 2002). Porém, Duarte (2004) ao estudar as condições ótimas de processamento do P(3HB), observou que ao expor este polímero à 200°C por 2 horas não houve degradação térmica, no entanto, este fenômeno pôde ser observado de maneira expressiva e dependente do tempo a temperaturas a partir de 220°C.

O homopolímero é altamente cristalino, rígido e quebradiço, o que reduz a gama de suas aplicações. Contudo, agentes nucleantes, plastificantes e outros aditivos, têm sido utilizados

com o intuito de ampliar o uso de P(3HB) em vários processos como, por exemplo, moldes por injeção (NONATO *et al.*, 2001).

É possível obter polímeros termoplásticos biodegradáveis a um custo mais baixo com propriedades mecânicas melhores através de uma mistura física de polímeros denominada blenda, o que pode ampliar a faixa de aplicações para o P(3HB). A poli(ϵ -caprolactona), PCL, é muito utilizada para formar blendas compatíveis com uma grande variedade de polímeros, atuando como plastificante. De acordo com Vogelsanger (2003), com a adição de 20 a 50 % ocorre uma diminuição de 10°C na T_m do P(3HB), já com a adição de 80 % o decréscimo observado foi de 13 °C, indicando que a adição de PCL interfere no arranjo cristalino do P(3HB), ou seja, a força que existe entre as cadeias é menor.

1.2.1.2 O poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato)

O copolímero P(3HB-co-3HV) consiste de unidades de 3-hidroxi-butirato e 3-hidroxi-valerato que são incorporadas aleatoriamente ao longo da cadeia (BRYDSON, 1995). A bactéria *C. necator* modificada é capaz de produzir o copolímero a partir de glicose e propionato. Holmes *et al.* (1984 *apud* ASTAR & GRUYS, 2002), descreveram o uso da *C. necator* mutante NCIB 11599 em condições de cultivo aeróbias para produção do copolímero quando alimentada com glicose e/ou quantidades de ácido propiônico e outros ácidos orgânicos.

Enquanto o P(3HB) homopolímero apresenta uma temperatura de fusão (T_m) em torno de 173 – 180°C e uma temperatura de transição vítrea (T_g) em torno de -5 a 5 °C, com a adição de 3-HV à cadeia, reduz-se a temperatura de fusão dos cristais, o módulo e resistência à tensão e ao mesmo tempo aumenta-se a flexibilidade, a resistência ao impacto e a ductilidade (BRYDSON, 1995). O P(3HB-co-3HV) apresenta um isodimorfismo, com unidades de 3HB e 3HV co-cristalizadas. Com o aumento do 3HV, a temperatura de fusão diminui variando de 75 a 170°C dependendo do percentual de HV no copolímero. Isto é particularmente benéfico pois, diminuindo a temperatura de fusão, o copolímero pode ser processado a temperaturas mais baixas, reduzindo de forma substancial a degradação térmica. A cristalinidade do P(3HB-co-3HV) é em torno de 39 a 69% dependendo do percentual dos respectivos monômeros. O alto percentual de 3HV diminuí a cristalinidade, tornando o polímero mais flexível (ASTAR & GRUYS, 2002).

O P(3HB-*co*-3HV) foi comercializado pela *ZENECA Bio Products* e mais tarde pela Monsanto com o nome de Biopol[®], sendo mais flexível e mais fácil de processar que o P(3HB). Este polímero pode ser utilizado na confecção de vários produtos, incluindo filmes, revestimento de papel e madeira, saco de adubo, embalagens descartáveis de alimentos, aplicações biomédicas e moldado em produtos como garrafas e outros. (LEE, 1996a). Sua primeira aplicação foi em garrafas de *shampoo* em 1990 e, mais tarde foi utilizado em embalagens de cosméticos e artigos de higiene (BRYDSON, 1995).

A produção comercial do Biopol[®] foi realizada em escala relativamente pequena por não ser economicamente competitivo com os polímeros petroquímicos como polietileno e polipropileno. Contudo, a produção de PHAs com plantas transgênicas surgiu como alternativa potencial para tornar os PHAs competitivos com os plásticos convencionais, pois, em tese, requer somente água e CO₂ para se desenvolver. Porém, isto seria uma simplificação, pois sabe-se que a agricultura possui necessidades mais complexas para produção em grande escala (ASTAR & GRUYS, 2002).

1.3 ESTRATÉGIAS DE CULTIVO

A seleção do microrganismo e do substrato para a produção industrial de polímero exerce influência crítica sobre os custos de produção (BYROM, 1987) e devem ser baseados em alguns fatores como a habilidade das células em utilizar fontes de carbono de baixo custo além de alta velocidade de crescimento e de síntese de polímero, bem como da elevada porcentagem de acúmulo de PHA em relação à massa seca total (LEE, 1996a). Para que o processo de extração do polímero não seja tão dispendioso, é necessário que a cepa seja capaz de acumular pelo menos 60% de sua massa celular em polímero. Dessa forma, são eliminadas, todas as bactérias Gram-positivas e aquelas que não acumulam alta quantidade do polímero necessária para a produção industrial (RAMSAY *et al.*, 1990).

Segundo Lee *et al.* (1999), numerosas bactérias são capazes de produzir P(3HB), porém somente algumas são empregadas neste processo, tais como *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, alguns organismos metilotróficos e ainda a recombinante *E. coli*. Estas bactérias podem ser cultivadas eficientemente em alta densidade celular com alto conteúdo de P(3HB) e em curto espaço de tempo, quando utilizada a estratégia de síntese adequada.

O acúmulo de PHA geralmente ocorre quando existe excesso de fonte de carbono e limitação de algum nutriente essencial à multiplicação das bactérias. No caso da bactéria *Cupriavidus necator*, a síntese ocorre em duas etapas, sendo que na primeira procura-se favorecer ao máximo o crescimento celular e assegurar, ao mesmo tempo, que a síntese do polímero seja a menor possível. Inversamente, na segunda etapa, interrompe-se o crescimento celular e estimula-se ao máximo o acúmulo de polímero nas células (GOMEZ & BUENO NETTO,1997) (Figura 1.4).

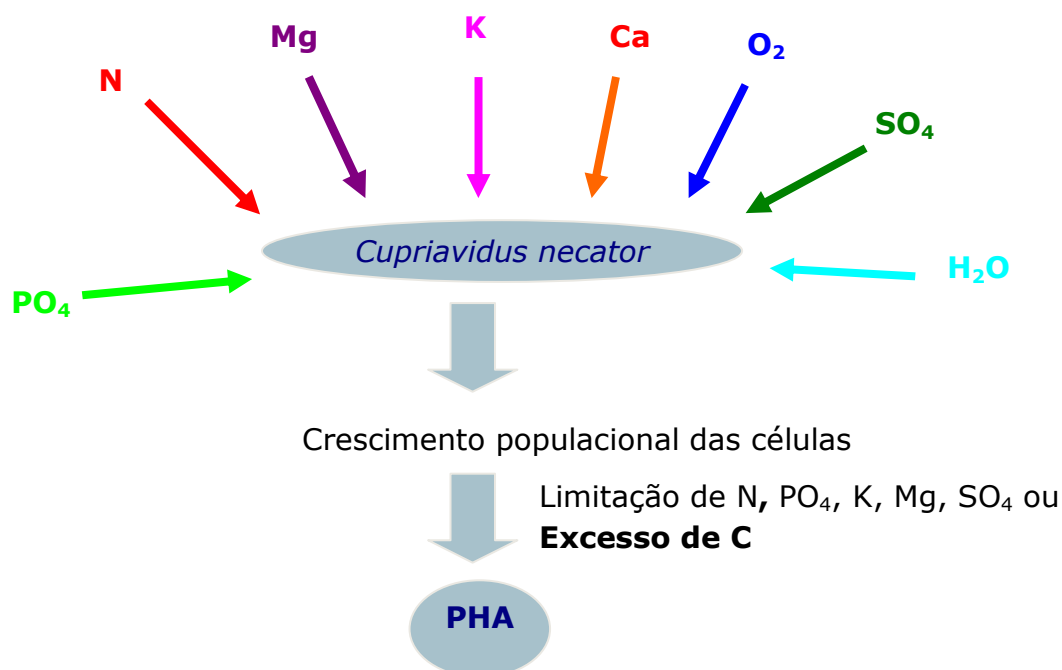


Figura 1.4: Esquema demonstrando como se dá a produção de PHA pela bactéria (FORMOLO, 2003).

Após estudar o efeito da limitação em nitrogênio, fósforo, magnésio e enxofre, a limitação em nitrogênio foi selecionada como a melhor estratégia para otimizar a produção de P(3HB) (LEE *et al.*, 1999).

O maior problema para a aplicação comercial do P(3HB) é seu alto custo de produção, sendo o substrato um dos fatores que contribui significativamente com este custo. Muitas bactérias são capazes de utilizar resíduos de sistemas produtivos como fonte de carbono, combinando as vantagens da redução do custo da disposição final dos resíduos com a produção de produtos com valor agregado (LEE *et al.*, 1999).

Um exemplo muito interessante é a produção de P(3HB) a partir do uso de soro de leite utilizando a bactéria *E. coli* recombinante. O soro de leite é o maior subproduto da indústria de queijo, representando cerca de 80 a 90% do volume de leite transformado. A lactose é o

maior componente do soro e a *E. coli* é capaz de utilizá-la para seu crescimento (LEE *et al.*, 1999). Marangoni *et al.* (2002) utilizaram soro como principal fonte de carbono combinado com açúcar invertido para síntese de P(3HB-co-3HV) em *Cupriavidus necator* e observaram um incremento na porção de HV que sugere a possibilidade de haverem precursores de HV no soro de leite.

Muitos óleos vegetais e ácidos graxos de origem animal também foram utilizados como única fonte de carbono em cultivos em batelada de *Alcaligenes ssp*, demonstrando ser bons substratos tanto para o crescimento celular quanto para a produção de alcanos de cadeia longa (AKIYAMA *et al.*, 1992; FUKUI & DOI, 1998). Marangoni *et al.* (2000b), estudaram o cultivo de *Cupriavidus necator* em meio mineral, tendo como fonte de carbono glicose + frutose (30 g/L), acrescido de ácido oléico como suplemento nutricional na fase de produção do copolímero P(3HB-co-3HV), obtendo um incremento da produção do polímero com aumento da fração mássica de 3HB.

De acordo com Taguchi *et al.*, (2002), algumas bactérias são capazes de produzir PHAs de cadeia média (PHA_{mcl}) quando cultivadas utilizando ácidos graxos como fonte de carbono. As vias metabólicas que envolvem os ácidos graxos nos diversos microrganismos podem gerar vários monômeros de PHAs, tais como, o hidroxihexanoato, hidroxi octanoato e hidroxidodecanoato.

A produção de PHAs em batelada é um processo simples, porém, devido à limitação pelo substrato, não se consegue atingir densidade celular elevada o suficiente para a produção comercial do polímero nestas culturas. O processo mais adequado para obtenção de altas densidades celulares é a batelada alimentada (KOYAMA & DOI, 1995). A produção em sistema contínuo pode oferecer maior produtividade, porém somente quando a cultura puder ser mantida estável, sem contaminações (LEE & CHANG, 1995b).

1.3.1 Organismos Produtores

São conhecidos mais de 300 microrganismos capazes de sintetizar PHAs, mas somente poucas bactérias são efetivamente empregadas na sua produção, incluindo *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, vários isolados de metilotrofos, *Pseudomonas oleovorans* e, recentemente, as versões recombinantes de *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli* e *Klebsiella aerogenes*. Estas bactérias foram selecionadas principalmente porque podem ser eficientemente cultivadas com alta densidade celular, acumulando alta

concentração de PHA em um período relativamente curto de tempo, resultando em alta produtividade (definida como grama de PHA produzido por litro, por hora). A alta produtividade é um fator indispensável para que se consiga diminuir os custos de produção dos polímeros biodegradáveis (LEE, 1996a).

As bactérias utilizadas na produção de PHA podem ser divididas em dois grupos baseados nas condições de culturas, requeridas para a síntese. O primeiro grupo necessita de limitação em algum nutriente essencial como N, P, Mg, K, O ou S e excesso de fonte de carbono para uma eficiente síntese, enquanto o segundo não requer limitação de nutriente para a síntese de PHA, sendo capaz de acumular o polímero durante a fase de crescimento. *C. necator*, *P. oleovorans* e muitas outras bactérias pertencem ao primeiro grupo, enquanto *A. latus*, *A. vinelandii*, e a recombinante *E. coli* fazem parte do segundo grupo (LEE, 1996a).

1.3.1.1 *Cupriavidus necator*

Inicialmente foi classificada como *Alcaligenes eutrophos*, mais tarde como *Rashtonia eutropha* e atualmente como *Cupriavidus necator*, como será tratada em todo o trabalho. É um microrganismo procariótico, do tipo gram-negativo, quimiolitotrófico facultativo encontrado naturalmente no solo e água. Possui células na forma de bastonete com dimensões de 0,5 por 1,8 a 2,6 μm . É móvel, possuindo de 1 a 4 flagelos peritríquios. Na fase de acúmulo de polímero, as células podem se tornar esféricas (MARANGONI, 2000). A Figura 1.5 apresenta a bactéria em fase de crescimento (a) e em fase de acúmulo de polímero (b) (SQUIO, 2003).

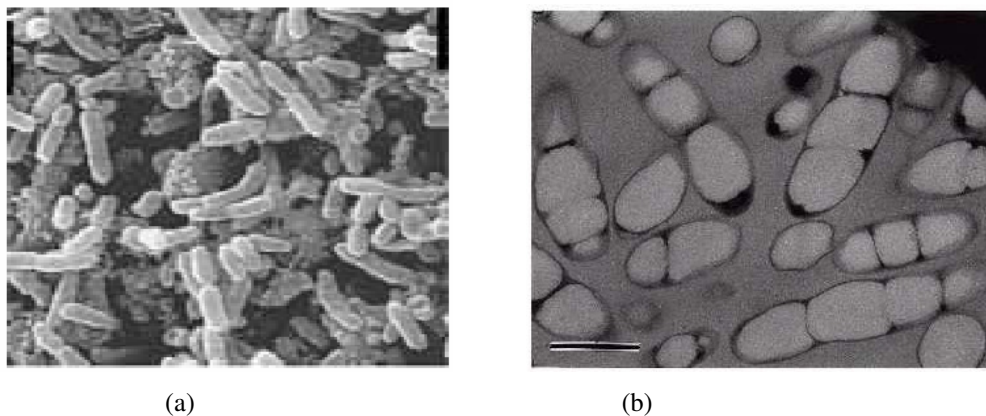


Figura 1.5: Micrografias eletrônicas de transmissão da bactéria *C. necator*: (a) na fase de crescimento (AMPE, 1995) e (b) na fase de produção (SUDESC *et al.*, 2000).

O PHA é acumulado nas células na forma de grânulos discretos, sendo que o tamanho e o número por célula podem variar dependendo da espécie. Em *C. necator* foram observados de 8 a 13 grânulos por célula, com diâmetro de 0,2 a 0,5 μm (LEE, 1996a *apud* SQUIO, 2003).

C. necator é capaz de crescer em condições de quimiolitotrofia ou heterotrofia (REUTZ *et al.*, 1982). A quimiolitotrofia é a capacidade dos microrganismos utilizarem os compostos inorgânicos como doadores de elétrons e o dióxido de carbono como fonte de carbono, enquanto a heterotrofia é a capacidade de utilizar compostos orgânicos como fonte de carbono e energia (DOELLE, 1975). A *C. necator* também pode crescer autotroficamente em atmosfera de gases H_2 , O_2 e CO_2 (TANAKA *et al.*, 1994).

Os PHAs sintetizados pela *R. eutropha* incluem monômeros de 3-hidroxicaproato (3HV), 3-hidroxiisovalerato (3HB), 4-hidroxiisovalerato (4HB), 5-hidroxicaproato (5HV) quando ácido valérico ou propiônico são fornecidos (REE *et al.*, 1992).

É o microrganismo mais atraente para a produção industrial por acumular mais de 80% de sua massa celular em P(3HB) com alta massa molar e utilizando diferentes tipos de substratos (BYROM, 1987) como a glicose ou a frutose (espécie mutante), formiato, acetato, propionato, lactato, glutamato, succinato, fenobenzoato (TANAKA *et al.*, 1994), soro de leite fermentado e açúcares invertidos de cana-de-açúcar (RAMSAY, 1990), podendo ainda utilizar outras fontes como etanol, ácido oleico e até mesmo dióxido de carbono (LEE, 1996a).

1.3.1.2 *Alcaligenes latus*

É um bom candidato à produção de P(3HB), uma vez que é capaz de utilizar diferentes substratos com uma velocidade específica de crescimento elevada, acumulando grandes quantidades de polímero já na fase de crescimento. Também é capaz de utilizar sacarose com eficiência e o melaço de cana como recurso para abaixar o custo de produção (LEE, 1996a). Contudo, o acúmulo de PHA por este microrganismo é muito baixo, sendo que YAMANE *et al.* (1996) obtiveram menos de 50% de polímero em biomassa em condições não limitantes. Ao contrário Wang & Lee (1997), trabalhando sob limitação de nitrogênio, conseguiram um conteúdo de P(3HB) em biomassa de 88%.

A desvantagem desta cepa é a sua sensibilidade aos precursores utilizados para a produção do copolímero P(3HB-co-3HV), ou seja, o crescimento da *A. latus* é completamente

inibido em presença de ácido propiônico na concentração de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ (BRAUNEGG *et al.*, 1998; RAMSAY *et al.*, 1990).

1.3.1.3 *Azotobacter vinelandii*

É capaz de acumular P(3HB) durante a fase de crescimento, tendo glicose como fonte de carbono, em culturas de batelada alimentada. A concentração de P(3HB) é de 32 g/L podendo ser obtida em 47 horas, com um rendimento relativamente bom de $0,34 \text{ g}$ de P(3HB) por grama de glicose utilizando-se peptona de peixe como suplemento. Contudo, a produtividade de $0,34 \text{ g/L.h}$ é considerada baixa, tornando necessário o desenvolvimento de melhores estratégias de fermentação (LEE, 1996a).

Este microrganismo é capaz de produzir polímero eficientemente a partir de melaço de beterraba, reduzindo o custo de produção com relação ao substrato. Entretanto, o uso de melaço de beterraba pode incrementar os gastos com o tratamento de resíduos da fermentação (PAGE & CORNISH, 1993).

Um aspecto negativo é o fato deste microrganismo produzir paralelamente ao P(3HB), um polissacarídeo, tornando o processo de difícil controle (BYROM, 1987).

1.3.1.4 Organismos metilotróficos

Os organismos metilotróficos foram estudados por BOURQUE *et al.* (1992), considerando o metanol um substrato interessante por ser de baixo custo e fácil manuseio.

O P(3HB) pode ser produzido por batelada alimentada através da *P. extorquens*. Contudo, a produtividade num cultivo longo de 170 horas, mostrou-se muito baixa ($0,88 \text{ g/L.h}^{-1}$). Culturas em batelada alimentada de *Methylobacterium organophilum* com limitação em potássio, atingiram maior produtividade ($1,86 \text{ g/L.h}^{-1}$). Entretanto, o conteúdo celular de PHA no interior das células foi de cerca de 52 % da massa celular, resultando em um rendimento de $0,19 \text{ g}$ de P(3HB) por grama de metanol. Esta é a maior desvantagem do emprego de organismos metilotróficos, tornando necessário o desenvolvimento de novas técnicas para aumentar o conteúdo intracelular de PHAs (LEE, 1996a).

1.3.1.5 *Pseudomonas oleovorans*

É a única bactéria que pode ser empregada para produzir PHAs com cadeia média de carbono ($C_6 - C_{14}$) e com concentração de polímero relativamente alta. (*Idem ibidem*)

DE SMET *et al.* (1983 *apud* ANDERSON & DAWES 1990) observaram a presença de grânulos intracelulares de P(3HB) em *P. oleovorans*. Subseqüentemente, observou-se que ao alimentar *P. oleovorans* com n-octano, ocorreu a produção de um polímero contendo 3-hidroxi octanoato e 3-hidroxi hexanoato em maior e menor quantidade, respectivamente, demonstrando que a *P. oleovorans* não sintetiza somente P(3HB) (LAGEVEEN, 1988).

HAYWOOD *et al.* (1988 *apud* ANDERSON & DAWES, 1990) examinaram várias espécies de *Pseudomonas*. O acúmulo de polímero foi demonstrado em *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens* e *P. testosteroni* em extensa variedade de substratos.

Apesar de *P. oleovorans* não ser capaz de utilizar glicose e outros açúcares para acumular PHAs, outras pseudomonas como *P. putida* e *P. aeruginosa* o fazem. Os PHAs, formados de gluconato e outros açúcares, apresentam composição diferente dos formados a partir de ácidos graxos, prevalecendo nos primeiros o 3-hidroxidecanoato e pequenas parcelas de monômeros insaturados, enquanto que nos últimos, predomina a formação de 3-hidroxi octanoato (HAYWOOD *et al.*, 1990; HUIJBERTS *et al.*, 1992; TIM & STEINBÜCHEL, 1990 *apud* SQUIO, 2003).

1.3.1.6 Bactérias do gênero *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* vem sendo pesquisado para produção de PHAs. Este microrganismo foi isolado do solo e é capaz de acumular PHAs contendo unidades 3HB e 3HB-4-ácido pentenóico (3HPE), a partir de fontes simples de carbono como sacarose ou gluconato (ANDRADE RODRIGUES *et al.*, 2000). Uma das linhagens isoladas, a *Burkholderia sacchari* IPT 101 apresenta boa produção do copolímero P(3HB-co-3HV). Entretanto, assim como a maioria dos microrganismos produtores de PHAs, tem baixa conversão de ácido propiônico em unidades 3HV (GOMEZ *et al.*, 1997). Com o intuito de aumentar a eficiência de conversão e utilização do ácido propiônico, SILVA *et al.* (2000) desenvolveram mutantes da *Burkholderia* sp. IPT 101 incapazes de crescer em ácido propiônico, porém ainda capazes de acumular unidades 3HV a partir do ácido. Há também

linhagens de *B. Sacchari* capazes de acumular P(3HB) a partir de hidrolisado de bagaço de cana, resíduo da indústria sucroalcooleira (VASCONCELOS, 2002; VIVEIROS, 2002).

1.3.1.7 *Escherichia coli*

A *E. coli* normalmente não sintetiza PHA, porém quando mutada com os genes codificadores da PHAsintase da *R. eutropha* é capaz de acumular aproximadamente 80% de sua massa seca em polímero (ASTAR & GRUYS, 2002). Altas concentrações são possíveis com alta produtividade em cultivo por batelada alimentada. Outra vantagem é o fato de a *E. coli* ser capaz de utilizar várias fontes de carbono incluindo sacarose, lactose e xilose, permitindo a produção de P(3HB) com sub-produtos de baixo custo da agricultura como melão, soro de queijo e hidrolisado de hemicelulose. (CHOI & LEE, 1999).

A grande vantagem da utilização da *E. coli* é a otimização da produção do P(3HB) ou outros PHAs. Polímeros de alta massa molar podem ser produzidos pela *E. coli* porque este organismo não possui a enzima PHAdepolimerase intracelular que degrada o polímero acumulado, além de facilidade da extração e purificação do produto, que pode ser extraído por tratamento térmico, ou por métodos químicos, uma vez que a *E. coli* não possui parede celular (ASTAR & GRUYS, 2002).

LEE (1996b) enumera algumas vantagens do emprego de *E. coli* na produção de PHA: (1) rápido crescimento e alta densidade celular que resultam em alta produtividade, (2) acúmulo de grandes quantidades de polímero, (3) habilidade em utilizar grande variedade de fontes de carbono de baixo custo e (4) carência de sistema ativo de depolimerase que atue contra a síntese de polímeros.

Porém, uma desvantagem, é que a *E. coli* não utiliza eficientemente ácido propiônico, impossibilitando a produção do P(3HB-co-3HV). No entanto, técnicas de DNA recombinante também podem ser usadas para modificar ou introduzir uma nova via metabólica, ampliando a escala de utilização dos substratos e a capacidade de síntese de PHA e produção de novos PHAs (LEE, 1996a).

Vários trabalhos foram relatados na literatura de culturas com alta densidade celular de *E. coli* recombinante e não recombinante. O maior problema do emprego de *E. coli* recombinante em culturas de alta densidade celular é a necessidade de oxigênio purificado, elevando os custos de produção do polímero (LEE & CHANG, 1995a).

1.3.1.8 Plantas transgênicas

Para diminuir os custos de produção de PHAs, muitas pesquisas foram realizadas investigando a possibilidade de produzir P(3HB) em plantas transgênicas. Uma vez que a β -cetotiolase, a primeira enzima da síntese de PHA, está presente no citoplasma de muitas plantas, somente a redutase e a PHA sintase seriam requeridas para a síntese de PHA nas células das plantas (LEE, 1996b).

A manipulação genética de plantas também pode ser interessante, pois estas podem produzir PHAs diretamente através de CO_2 e energia solar e, teoricamente, os custos de produção podem ser comparados aos de outros polímeros produzidos pelas plantas como os polifenóis. Em 1992, foi reportada a biossíntese de P(3HB) em *Arabidopsis thaliana*, uma pequena planta oleaginosa. Mais tarde, estes genes da biossíntese de P(3HB) também foram expressos em cultivares agrícolas, tais como *Brassica napus*, *Gossypium hirsutum*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum* e *Zea mays* (STEINBÜCHEL & DOI, 2002).

Estas plantas acumulam grânulos de P(3HB) com 0,2 a 0,5 μm de diâmetro no núcleo, vacúolos e citoplasma. Contudo, a quantidade de P(3HB) acumulada foi de apenas 100 $\mu\text{g/g}$ peso úmido (LEE, 1996b).

1.4 METABOLISMO EM *Cupriavidus necator*

Em condições de crescimento balanceado, a *C.necator* cataboliza carboidratos a piruvato, pela via Entner-Doudoroff, que pode então ser convertido, através de descarboxilação, a acetil-CoA. Durante o crescimento reprodutivo, a acetil-CoA entra no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), liberando a Coenzima A (CoASH), sendo terminalmente oxidado a CO_2 e gerando energia na forma de ATP, equivalentes redutores (NADH, NADPH e FADH_2) e precursores biossintéticos (2-oxoglutarato, oxaloacetato). A aminação ou transaminação direta do oxaloacetato leva à síntese de aminoácidos, que são incorporados nas cadeias polipeptídicas das proteínas em formação. A taxa de admissão do acetil-CoA no TCA é dependente da disponibilidade das fontes de nitrogênio, fósforo e outros elementos, além do potencial oxidativo do ambiente (BRAUNEGG *et al.*, 1998 *apud* SQUIO, 2000).

1.4.1 Biossíntese de P(3HB)

A produção de PHA em *C. necator* acontece em duas fases: a fase sem limitação de nutrientes com o objetivo de geração de biomassa e, outra fase com limitação de nutrientes (nitrogênio, fosfato, oxigênio, etc), favorecendo a acumulação de polímero de acordo com a fonte de carbono oferecida em excesso (DOI, 1990 *apud* MARANGONI *et al.*, 2001).

A mais estudada via sintética do P(3HB) é a da *C. necator*. Esta via envolve a condensação de duas moléculas de acetil-CoA pela β -cetotilase (Pha A) para formar a acetoacetil-CoA, que é subsequente reduzida pela NADPHdependente acetoacetyl-CoA redutase (Pha B) a R(-) 3-hidroxiutiril-CoA (3HB). O monômero (3HB) é então polimerizado para formar o poli(3-hidroxiutirato) pela PHB sintase (Pha C) (Figura 1.6). Quando são utilizados ácidos graxos como fonte de carbono, estes entram pela via da β -oxidação em que a β -cetotilase e acetoacetil-CoA redutase catalisam a conversão da acetil-CoA a (S)-3-hidroxiutiril-CoA que é o precursor direto do poli(3-hidroxiutirato). fornecendo pequenas quantidades de (R)-3-hidroxiutiril-CoA diretamente a via de produção do poli(3-hidroxiutirato). Como o percentual de P(3HB) na célula bacteriana normalmente é baixo, de 1 a 30%, faz-se necessário controlar as condições de cultivo (ASTAR & GRUYS, 2002).

A glicose é a fonte de carbono mais comum para a *C. necator* produzir o P(3HB). Existem também outros substratos, tais como, sacarose, metanol, etanol e ácido acético (ASTAR & GRUYS, 2002), além de ácidos graxos de cadeia curta. Sabe-se ainda que o fluxo metabólico do carbono no interior das células tem significativo efeito sobre o rendimento, composição e propriedades termomecânicas dos PHAs (YU & SI, 2004).

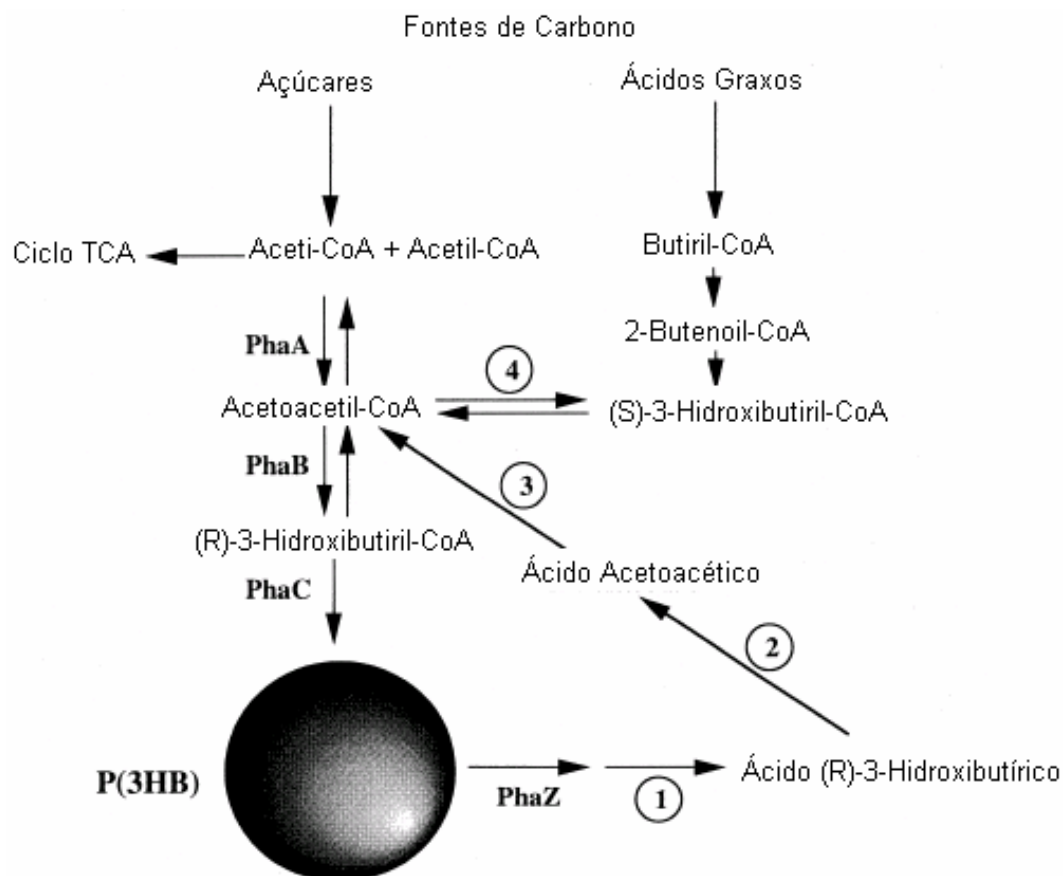


Figura 1.6: Esquema da via metabólica de síntese e degradação de P(3HB) em bactérias. PhaA, β -cetotiolase; PhaB, NADPH dependente acetoacetil-CoA redutase; PhaC, PHA sintase; PhaZ, PHA depolimerase; (1) dímero hidrolase; (2) (R)-3-hidroxi-butirato desidrogenase; (3) acetoacetil-CoA sintetase; (4) NADH-dependente acetoacetil-CoA redutase (SUDESH, *et al.*, 2000).

1.4.2 Degradação intracelular de P(3HB)

Sendo o P(3HB) um composto de reserva, é natural que os microrganismos sejam equipados com um sistema de depolimerização, para recuperação do material armazenado quando necessário. A Figura 4 demonstra um esquema geral do metabolismo cíclico do P(3HB). É importante mencionar ainda, que alguns organismos também produzem uma PHAdepolimerase extracelular que é secretada para degradar os PHAs no ambiente (SUDESH *et al.*, 2000).

A degradação intracelular de P(3HB) é afetada pela ação sequencial das enzimas: PHAdepolimerase, dímero hidrolase, (R)-3-hidroxi-butirato desidrogenase e acetoacetil-CoA sintetase (SUDESH *et al.*, 2000).

Inicialmente, a enzima PHAdepolimerase e a dímero hidrolase hidrolisam o polímero P(3HB) a ácido (R)-3-hidroxi-butírico e pequenas quantidades de 3HB-oligômeros. A seguir,

este produto é oxidado a ácido acetoacético pela enzima 3-hidroxiacetil-CoA desidrogenase NAD⁺ específica, que é convertido a acetoacetyl-CoA pela acetoacetyl-CoA sintase. Em condições balanceadas de cultivo, os altos níveis de NADH, bem como o acetoacetato, podem inibir a ação da enzima 3-hidroxiacetil-CoA desidrogenase, interrompendo, portanto a depolimerização do P(3HB), até que os níveis de CoASH sejam novamente reduzidos (SAITO & KOBAYASHI, 2002).

Em condições de excesso de energia, o nível de NADH inibe a depolimerização de PHA e o ciclo do ácido tricarbóxico. A diminuição da concentração de CoA permite que a β -cetotiolase inicie a síntese de P(3HB). Em deficiência de carbono, o ciclo move-se no outro sentido, sendo que a degradação do polímero é controlada pela inibição da enzima 3-hidroxiacetil-CoA desidrogenase pelo acetoacetato e NADH (BYROM, 1987 *apud* SQUIO, 2003).

Assim, os microrganismos capazes de utilizar este recurso podem sustentar seu metabolismo por mais tempo, na ausência de fonte de carbono, podendo inclusive sintetizar proteínas desde que em presença de fonte de nitrogênio (SAITO & KOBAYASHI, 2002).

1.5 FATORES QUE AFETAM O CUSTO DE PRODUÇÃO

Com o objetivo de tornar os PHAs comercializáveis, muitas pesquisas vem sendo realizadas procurando reduzir os custos de produção, através do uso de melhores cepas, processos de cultivo, técnicas de extração mais eficientes, entre outros. Porém, de acordo com Lee (1996 *apud* CHOI & LEE 1999), a otimização de cada passo separadamente não é economicamente viável e, compromete o resultado final, sendo que a minimização do custo de produção somente poderá ser encontrada quando se analisar o processo como um todo.

A utilização de substratos de baixo custo foi reportada na literatura como uma das alternativas para redução dos custos de produção. Foram realizados estudos com o uso de dióxido de carbono e metanol (SCHLEGEL *et al.*, 1961; BRAUNEGG *et al.*, 1978 *apud* KHANNA & SRIVASTAVA 2005). Outros estudos ainda demonstraram o uso de alguns substratos brutos como melaços de cana e beterraba, soro de leite, óleos vegetais, hidrolisados de amido que podem ser excelentes substratos para a produção de PHAs, mas, resultaram em conteúdo de polímero e produtividade menores do que em substratos de carbono purificados.

Entretanto, desenvolvimentos na área podem tornar os processos economicamente viáveis (LEE, 1996b *apud* SQUIO, 2003).

O uso de aminoácidos também foi apontado como estimulante da produção de P(3HB) (FUJITA *et al.* (1993). Produtividades superiores a 1g/L.h foram reportadas em *Azotobacter beijerinckii* em meios de cultivo contendo 20g/L de peptona de caseína (BORMANN *et al.*, 1998). Cultivos em batelada utilizando amido e lactose como fonte de carbono também foram utilizados com *Azotobacter chroococcum* (KIM, 2000) e *Pseudomonas cepacia* (YOUNG *et al.*, 1994), respectivamente. O crescimento de *Alcaligenes latus* utilizando uréia também foi reportado como satisfatório (GROTHER *et al.*, 1999). (KHANNA & SRIVASTAVA, 2005).

Na comparação de dois processos de produção de P(3HB) por *E. coli*, CHOI & LEE (1999b) exemplificaram bem a influência da produtividade sobre os custos de produção. Segundo os autores, quando a produtividade aumentou de 1,98 g/L.h para 3,2 g/L h, os custos de produção decresceram de US\$ 5,37 para \$ 4,91 / Kg P(3HB). Além disso, para a alta produtividade de 4,94 g/L.h de um processo de produção de polímero por *A. latus*, foi obtido o menor custo de produção, de US\$ 2,6 /Kg P(3HB), sendo que o alto conteúdo total de P(3HB) obtido (88%) também auxiliou no baixo custo.

CHOI & LEE (1997) realizaram um estudo comparativo para o levantamento do custo anual de produção de P(3HB) utilizando quatro diferentes microrganismos e dois diferentes métodos de extração (Tabela 1.2). Os custos de operação foram mais altos quando se utilizou o método de dispersão de hipoclorito e clorofórmio. O custo de produção mais baixo foi de US\$ 5,58/Kg de P(3HB), obtido empregando-se a bactéria *Cupriavidus necator* e o método de digestão com surfactante e hipoclorito para a extração, embora o custo da fonte de carbono tenha sido o mais alto (US\$ 0,5/Kg glicose). Este fato foi atribuído aos efeitos combinados de alta produtividade, alto conteúdo de P(3HB) e alto rendimento de P(3HB) pela fonte de carbono.

Tabela 1.2: Custo de operação para uma produção anual de PHB de 2.850 ton/ano, para diferentes microrganismos e métodos de extração, considerando (a) surfactante-hipoclorito e (b) hipoclorito-clorofórmio.

FATORES ANALISADOS	<i>C. necator</i>		<i>A. latus</i>		<i>M. organophilum</i>		<i>E. coli recombinante</i>	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Capital fixo dos itens dependentes.	4.299	6.056	5.320	6.966	5.821	8.195	4.968	6.330
Itens de laboratório	1.386	1.746	1.737	2.131	1.747	2.184	1.707	1.984
Administração	652	825	817	1.004	823	1.035	800	934
Matéria bruta	6.628	10.214	10.278	13.249	7.626	1.0521	6.907	10.128
Material de consumo	0	1.844	0	2.874	0	2.762	0	1.736
Utilidades	1.334	4.722	1.843	6.823	1.744	5.519	1.505	5.239
Tratamento e disposição de resíduos	1.599	699	3.290	1.043	3.153	999	1.601	641
Total	15.898	26.106	23.285	34.090	20.944	31.215	17.488	26.992
Custo de produção (US\$/Kg PHB)	5,58	9,16	8,16	11,96	7,34	10,95	6,14	9,45

Fonte: CHOI & LEE, 1997.

A Figura 1.7 destaca o item custo total de produção em função do microrganismo e processo de extração.

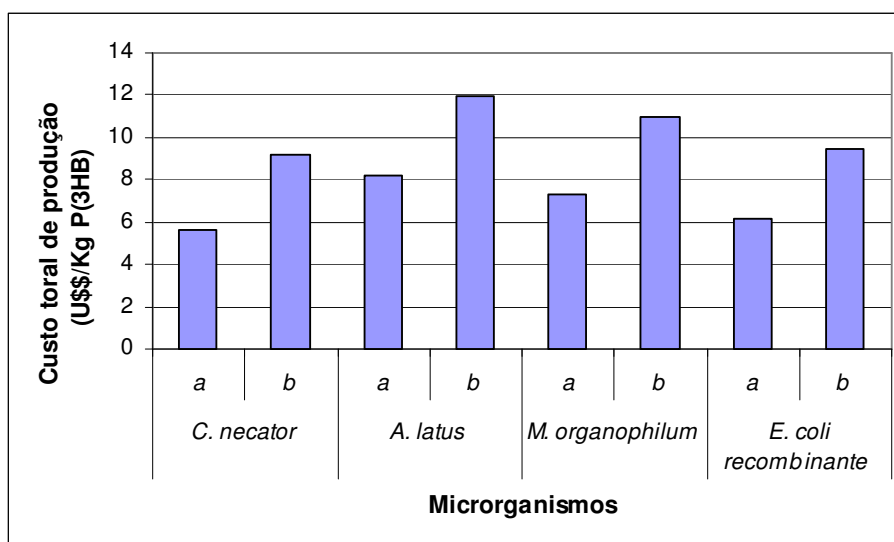


Figura 1.7: Análise do custo de operação para uma produção anual de P(3HB) de 2.850 ton/ano, para diferentes microrganismos e métodos de extração, considerando (a) surfactante-hipoclorito e (b) hipoclorito-clorofórmio, baseado nos dados de CHOI & LEE (1997).

Vários processos de extração de PHAs são utilizados, porém o desenvolvimento de métodos eficientes, diferentes para cada microrganismo empregado, é importante para a diminuição do custo total da produção de PHAs (CHOI e LEE, 1999b).

1.6 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

Atualmente, os produtos biologicamente ativos produzidos por microrganismos vêm atraindo muito interesse. Muitos produtos são extracelulares, possuindo técnicas de separação relativamente simples com boa aplicação em larga escala. Porém, há outros, que não excretam seus produtos de interesse, como é o caso da *C. necator*. Conseqüentemente, métodos para a liberação de seu produto após o cultivo são requeridos, sendo necessário o rompimento da parede celular ou seus componentes (MIDDELBERG, 1995).

Como mostra a Figura 1.8, os métodos de extração em larga escala são divididos em não-mecânicos e mecânicos.



Figura 1.8: Técnicas aplicadas à ruptura celular em larga escala (MEDDELBERG, 1995).

Os métodos não-mecânicos podem ser classificados em físicos, químicos e enzimáticos.

De acordo com Middelberg (1995), os métodos físicos dividem-se em: A **descompressão**, que é baseada na alteração da pressão no interior da célula, causada normalmente por um gás supercrítico que expande causando o rompimento celular. No **choque osmótico**, as células são primeiramente equilibradas em um meio de alta pressão osmótica (por exemplo, sacarose 1M), que é diluído de forma repentina. A água entra rapidamente na célula, aumentando a pressão interna e causando a lise. Porém, esta técnica só é indicada para células enfraquecidas, pois é incapaz de romper os componentes da parede celular. A **termólise** é baseada na elevação da temperatura para induzir o rompimento celular. Porém, os resultados dependem do tipo do microrganismo, da fase de crescimento e ainda, da temperatura de armazenamento, que se for muito baixa (0 a -5°C) pode aumentar a resistência térmica.

Os métodos químicos podem ser divididos em agentes quelantes, detergentes e solventes. O tratamento com **agentes quelantes**, que ocorre pela alteração dos cátions divalentes Mg^{+2} e Ca^{+2} à membrana externa liberando os lipolissacarídeos, sendo o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) o mais utilizado. A liberação dos lipopolissacarídeos é rápida e independente da temperatura, porém a quantidade de EDTA depende da cepa utilizada. Já os **agentes caotrópicos** como a uréia ou a guanidina, desorganizam a estrutura da água, diminuindo sua hidrofiliçidade, enfraquecendo as interações soluto-soluto. Normalmente, espécies hidrofóbicas como as proteínas da membrana podem ser solubilizadas em concentração suficiente, tornando efetivo este método. O etanol é muitas vezes classificado como solvente orgânico, porém também é efetivo como solvente caotrópico rompendo as bandas de hidrogênio na água (Middelberg 1995).

Os tratamentos com **detergentes** que rompem interações hidrofóbicas e **solventes orgânicos** permitem maior permeabilidade da membrana e muitas vezes é utilizado em escala laboratorial. O tolueno é freqüentemente utilizado, atua dissolvendo os fosfolipídeos e criando poros na membrana celular. A liberação seletiva de enzimas do espaço periplasmático é possível pelo tratamento com solventes miscíveis em água (polares), como metanol, etanol, isopropanol e terbutanol (RATTEDGE & KRISTIANSEN, 2001).

Segundo Middelberg (1995), a lise alcalina pelo uso de hidróxidos e hipoclorito também é amplamente utilizada, sendo uma técnica mais efetiva se o produto de interesse for resistente à degradação em pH elevado. Outro fator que deve ser observado é que a recuperação do solvente incrementa o custo de produção.

De acordo com Middelberg (1995) existe uma gama de detergentes capazes de solubilizar membranas celulares. Estes podem ser agrupados em aniônicos (por exemplo,

dodecil sulfato de sódio - SDS) e sais de ácidos graxos, catiônicos (por exemplo, sais de tetra alquilamônio) e não-iônicos (por exemplo, Triton X). Uma consideração importante é que a seleção do detergente está diretamente ligada ao produto. Muitas proteínas são desnaturadas por SDS, mas não por Triton X-100, enquanto os detergentes não-iônicos geralmente solubilizam a membrana integral e proteínas sem a perda da atividade.

Em contrapartida, a vantagem da utilização de enzimas para a lise celular baseia-se na seletividade durante a liberação do produto. A **enzima lítica** mais amplamente utilizada, incluindo operações em larga escala, é a lizosima. Esta enzima ataca a camada de peptidoglicano, resultando na alteração da pressão osmótica interna e rompimento celular. As bactérias gram-positivas são mais sensíveis ao ataque da lizosima do que as gram-negativas que requerem a passagem da lizosima através da outra membrana, o que é possível com o uso de EDTA. Glucanases e mannanases combinadas com proteases são utilizadas para a degradação da parede de leveduras. Porém, o custo de produção e a necessidade de passos adicionais de purificação são fatores que limitam a aplicação de enzimas líticas (RATTEDGE & KRISTIANSEN, 2001).

Segundo Middelberg (1995), a **autólise** é um método para liberação de proteínas muito pouco compreendido. O processo baseia-se na produção de enzimas líticas que degradam a parede celular aumentando sua porosidade e eventualmente causando a lise. Esta classificação como enzima lítica é arbitrária por ser muitas vezes induzida por tratamentos químicos ou físicos, tais como choque por solvente, pH ou térmico e é afetado por uma série de variáveis, dificultando o estabelecimento do processo. Já a lise de *E. coli* por **fago lítico** é um processo bem conhecido, por exemplo, a adição do bacteriófago T4. Porém, a ruptura por fago não é atrativa em escala industrial, devido a possibilidade de restarem fagos residuais que podem iniciar uma lise prematura em bateladas subsequentes.

Os métodos mecânicos para ruptura celular são frequentemente utilizados para liberação de produtos intracelulares tanto em escala laboratorial quanto industrial. Métodos como **alta pressão de homogenização** e **vigorosa agitação com abrasivos** tem larga aplicação em grande escala. No primeiro caso a suspensão celular é forçada por alta pressão através de um pequeno orifício a emergir a pressão atmosférica. A súbita mudança de pressão é capaz de causar o rompimento celular. A agitação com pérolas de vidro rompe a célula por uma combinação de impacto e atrito das células (RATTEDGE & KRISTIANSEN, 2001). A eficiência deste método foi demonstrada por Zetelaki (1969) *apud* Prave *et al.* (1987) em comparação com outros métodos para mensurar a glicose oxidase liberada por *Aspergillus niger*. De acordo com Ratledge & Kristiansen, (2001), recentemente a **microfluidização** foi

introduzida como técnica para o rompimento celular. Neste caso, a suspensão celular passa sobre alta pressão através de uma câmara onde é lançada dentro de dois canais seguindo em alta velocidade antes de emergir à pressão atmosférica.

1.6.1 Técnicas de extração aplicadas na obtenção de P(3HB)

Após o cultivo, as células contendo PHAs são separadas por processos convencionais como centrifugação, filtração ou floculação-centrifugação. Em seguida, as células precisam ser rompidas para a extração do polímero. Há vários métodos desenvolvidos para esse fim, a maior parte aplicados à produção por *C. necator*. A maioria dos processos utiliza solventes orgânicos, tais como clorofórmio, carbonato de propileno e dicloroetano (KESSLER *et al.*, 2001). Devido à alta viscosidade de soluções contendo PHAs, é necessário utilizar volumes elevados de solvente tóxico e/ou volátil (aproximadamente 20 partes de solvente para 1 parte de polímero), aumentando os custos de produção e causando danos ao meio ambiente (LEE, 1996a *apud* SQUIO, 2003).

Outro fator muito importante é que o processo de extração pode alterar significativamente as propriedades finais do produto (LING *et al.*, 1997), sendo imperativo o desenvolvimento de novos métodos de extração de baixo custo e com bases nas tecnologias limpas (CHEN *et al.*, 2001a,b).

São descritos na literatura uma vasta gama de métodos para extração de PHAs: extração por solventes orgânicos, digestão em hipoclorito, dispersão de hipoclorito em clorofórmio, tratamento térmico da biomassa seguido de digestão enzimática.

De acordo com Hejazi *et al.* (2003), o primeiro método mais utilizado envolveu a extração dos PHAs da biomassa com solventes. Os solventes utilizados foram o clorofórmio, cloreto de metileno, carbonato de propileno e dicloroetano, que resultaram em PHAs de alta pureza (RAMSAY *et al.*, 1994; BAPTIST, 1962). O percentual de P(3HB) extraído usando clorofórmio a 61°C com um pré-tratamento com acetona foi de 70%. Contudo, a solução polimérica extraída apresentou-se muito viscosa, contendo mais de 5% (m/V), tornando-se muito difícil remover os *debris* celulares. A utilização de grandes volumes de solventes voláteis e tóxicos, não somente aumenta o custo total de produção, quanto gera consequências ambientais graves. Não foi encontrado na literatura as características do P(3HB) obtido por esta técnica de extração, porém há vários relatos (HAHN *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 1999) que

confirmam o fato de que a extração utilizando somente o clorofórmio causa pequena degradação sobre o P(3HB).

O método baseado na digestão com hipoclorito de sódio reportado por BERGER *et al.* (1998) é simples, porém causa severa degradação do material, resultando em polímero de baixa massa molar e conseqüentemente perda de suas propriedades, trazendo ainda o problema da dificuldade de eliminação completa de traços de hipoclorito do polímero (HEJAZI *et al.*, 2003).

Por outro lado, Hahn *et al.* (1995) desenvolveram um método que utilizava uma dispersão de hipoclorito e clorofórmio o qual foi comparado com a extração por clorofórmio. Os autores observaram ainda, que os grânulos de P(3HB) intracelulares apresentaram-se predominantemente no estado amorfo o que parecia permitir facilmente o acesso das depolimerases. Operações realizadas no processo de extração como armazenamento por congelamento a baixas temperaturas, tratamento com acetona ou solução de hipoclorito ou ainda o uso de fortes centrifugações das células contendo PHA tendem a elevar a cristalinidade do PHA.

Hahn *et al.* (1995) compararam a cristalinidade, estabilidade térmica e massa molar do polímero antes e depois do processo de extração, concluindo que a técnica apresentava a vantagem de reduzir a degradação polimérica, porém, continuava promovendo diminuição da massa molar com o aumento da concentração do hipoclorito. A cristalinidade foi extremamente incrementada após o processo passando de 16% no estado amorfo no interior da célula para 65% após a extração. Quanto à estabilidade térmica, após o processo de extração, o P(3HB) apresentou-se mais estável. Um fato observado por Hejazi *et al.* (2003) é que esta técnica utilizava um volume elevado de solvente organoclorado.

A Imperial Chemical Industries (ICI) desenvolveu um método diferenciado que consistia no tratamento térmico da biomassa contendo P(3HB), seguido de digestão enzimática, dissolvendo o material celular (exceto P(3HB)) com surfactantes aniônicos (HOLMES & LIM, 1990). O método atingiu cerca de 90% de eficiência, porém, resultou em alto custo, devido ao tratamento enzimático e à etapa de digestão adicional para obter alta pureza.

Chen *et al.* (2001b) reportaram outra técnica usando uma solução aquosa de surfactante e quelante com o objetivo de melhorar a pureza, sendo o rendimento de extração e a massa molar viscosimétrica também foram investigados. Porém, os autores concluíram que o aumento do pH, embora elevasse o grau de pureza do polímero obtido, causava redução da massa molar viscosimétrica, gerando ainda, um grande volume de águas residuais durante o

processo. Fuller *et al.* (1992 *apud* ASTAR & GRUYS, 2002) avaliaram um método de extração usando surfactante como alternativa para estabilizar a micronização dos grânulos obtendo um produto menos cristalino.

Recentemente, Hejazi *et al.* (2003) e Khosravi-Darani *et al.* (2004) aplicaram a técnica de extração supercrítica à recuperação de P(3HB). Ótimas condições de extração foram encontradas, porém para aumentar a eficiência eram necessários passos adicionais de pré-tratamento com bases, bem como um cuidado adicional para que não ocorresse hidrólise alcalina quando o P(3HB) fosse extraído da célula. Somado a isso, o aumento da temperatura diminuiu a eficiência da extração (HEJAZI *et al.*, 2003).

Diante dos argumentos expostos acima, métodos de ruptura mecânicos surgem como uma alternativa interessante, por serem econômicos e de acordo com (MIDDELBERG, 1995) amplamente aplicáveis para técnicas de extração em larga escala. Porém, poucos relatos sobre sua aplicação para extração de biopolímeros foram encontrados na literatura.

O processo reportado por Harrison *et al.* (1990 *apud* LING *et al.*, 1997) de homogeneização por alta pressão, foi baseado na solubilização dos componentes não-P(3HB) usando detergentes e enzimas acopladas com múltiplas centrifugações. A técnica apresentou-se eficiente na ruptura celular, contudo o processo para remoção dos *debris* celulares recebeu pouca atenção, pois o processo elevava o custo de produção total e produzia um polímero de qualidade inferior, o que era inaceitável para a indústria.

Yoshida *et al.* (1995) *apud* Chen *et al.* (1999) também adotaram um processo de homogeneização por alta pressão, porém muitos inconvenientes foram relatados, como, por exemplo, a micronização (processo de moagem ultra-fina de produtos) de *debris* celulares, que dificultava a separação subsequente sólido-líquido por processos convencionais como a centrifugação ou a filtração.

Tratamentos químicos para purificação podem ser considerados se um produto de alta pureza for requerido (LING *et al.*, 1997).

De acordo com Kim *et al.* (2003), a maioria das técnicas acima mencionadas para extração de P(3HB) requerem passos adicionais e pré-tratamentos, métodos considerados ambientalmente não-amigáveis, devido à excessiva geração de resíduos, sendo ainda dispendiosos. Desta forma, faz-se necessário o desenvolvimento de novos métodos de extração que dispenssem passos de pré-tratamento.

1.7 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE POLÍMEROS

De acordo com Campbell & White (1989), há muitos motivos para se caracterizar um material polimérico, como identificação de um material, *design* a nível molecular, microestrutural e de processo e controle de análises.

1.7.1 Determinação de massa molar

Os materiais poliméricos diferenciam-se dos demais por possuir em uma cadeia longa, identificada por sua massa molar. Esta característica exerce grande influência sobre suas propriedades físico-químicas de tal modo que seu conhecimento e controle é de fundamental importância (CANEVAROLO, 2002).

Na literatura são comumente referenciados três tipos de massa molar: massa molar numérica média (\overline{Mn}), massa molar ponderal média (\overline{Mw}) e massa molar viscosimétrica média (\overline{Mv}). Em todos os casos, sua determinação exige que o polímero seja solúvel. A \overline{Mn} depende do número de moléculas de polímero presentes na solução, a \overline{Mw} depende do número e da massa das moléculas em solução e a \overline{Mv} depende do número, da massa e também da forma das moléculas presentes na solução. Verifica-se que o valor ponderal médio é mais elevado que o valor numérico médio, e que é mais expressivo no campo dos polímeros, pois valoriza a característica dominante dos polímeros que é o tamanho da molécula. Assim, o quociente, Mw/Mn , denominado de polidispersão, será tanto maior quanto mais heterogêneas forem as massas molares, ou seja, quanto maior for a distribuição de massa molar (MANO & MENDES, 1999).

Na determinação da massa molar numérica média, utilizam-se os processos que medem propriedades coligativas, dentre os quais destacam-se: a crioscopia, ebulioscopia, osmometria e, em casos especiais, a determinação dos grupos funcionais. Pode ainda ser empregado o processo de cromatografia de permeação em gel (GPC). Já no caso da massa molar ponderal média, são empregados métodos absolutos como espalhamento de luz, a ultracentrifugação e também o GPC. A massa molar viscosimétrica média, é usualmente determinada por viscosimetria, que é um método simples e amplamente empregado, porém não é um método

absoluto, pois exige o conhecimento de constantes obtidas da literatura ou determinadas empregando polímeros padrão (*Idem ibidem*).

Cada método permite a determinação de apenas um único e característico tipo de massa molar à exceção da técnica de GPC (CANEVAROLO, 2002).

1.7.1.1 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A cromatografia de permeação em gel, também conhecida como cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) é um dos métodos mais populares de separação e análise de materiais poliméricos. Este método promove uma distribuição seletiva e dinâmica das moléculas do soluto entre duas fases líquidas separadas, dependentes de uma estrutura estacionária contendo poros de tamanho controlado (SPIER, 2005).

Neste caso, uma solução com o polímero a ser analisado é bombeada através de uma coluna recheada com um gel poroso. Ao penetrarem nos poros, as cadeias menores percorrem um caminho maior que as cadeias maiores, sendo atrasadas em relação a estas. Ao final da coluna de separação, cadeias de massa molar maior serão eluídas primeiro, sendo seguidas pelas menores (CANEVAROLO, 2002) (Figura 1.9).

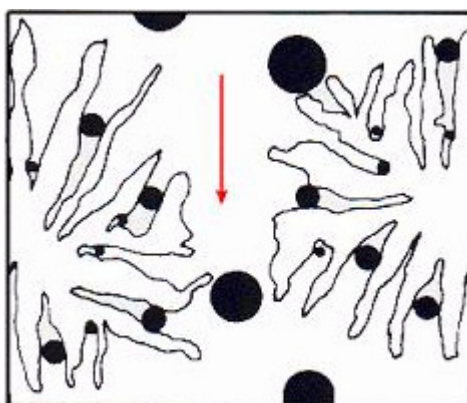


Figura 1.9: Representação gráfica do princípio de cromatografia por exclusão (SPIER, 2005).

As substâncias presentes na amostras passam através da coluna, onde são separadas e chegam ao sistema de detecção. Existem vários tipos de detectores, entre eles o de absorção no ultravioleta, visível e infravermelho, fluorescência e índice de refração (SPIER, 2005).

1.7.2 Métodos espectroscópicos

O termo “espectroscopia” especifica a medida da intensidade de absorção ou emissão de radiação eletromagnética, por uma amostra polimérica a ser analisada. Como por exemplo, a absorção do ultravioleta visível (UV visível) que atravessa um polímero: diferentes porções do espectro de radiação eletromagnética são absorvidos em diferentes graus dependendo da estrutura molecular da amostra. As medidas de absorção de comprimento de onda podem ser interpretados em termos de estrutura molecular (CAMPBELL & WHITE, 1989).

Na espectroscopia na região do infravermelho, a emissão ou absorção do espectro inicia quando as moléculas são submetidas a transições entre estados quânticos que correspondem a dois diferentes estados de energia interna. A diferença ΔE entre estes estados está relacionada com a frequência da radiação emitida ou absorvida por um quantum. Os comprimentos de onda da frequência de infravermelho são de 1 – 50 μm e são associados à vibração molecular e espectro de vibração de rotação (BILLMEYER, 1984).

O espectro de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é hoje um dos métodos mais rápidos para caracterizar os grupamentos funcionais de um composto químico. O método se aplica tanto à análise qualitativa quanto à quantitativa, de sólidos, líquidos ou gases. As quantidades de analito usadas são muito pequenas (da ordem de miligramas ou fração); a amostra não é destruída no ensaio e pode, portanto, ser recuperada após a medida do espectro (COSTA NETO, 2004 *apud* SPIER, 2005).

A absorção do espectro de infravermelho em polímeros é diferente para a fase cristalina e a fase amorfa, isto pode ser devido ao fato de existirem conformações específicas em cada fase (BILLMEYER, 1984).

As características mais importantes de um espectro no infravermelho são os valores das frequências de absorção da molécula (bandas), parâmetro fundamental para sua identificação ou para a interpretação do espectro, visando a caracterização de grupamentos funcionais nele presentes. O espectro de uma mistura será como uma mistura dos espectros dos compostos em separados (COSTA NETO, 2004 *apud* SPIER, 2005).

1.7.3 Análise de difração de raios-X (DRX)

O método de difração de raios-X é amplamente utilizado como ferramenta para investigar o arranjo ordenado de átomos ou moléculas através da interação da radiação

eletromagnética que fornece efeitos de interferência com estruturas compatíveis em tamanho com o comprimento de onda da radiação (BILLMEYER, 1984).

A difração de raios-X é um método tradicional para determinação da estrutura cristalográfica em polímeros cristalinos. É o método mais simples para determinação das porções cristalinas, mas também pode fornecer dados a respeito da estrutura completa do polímero, incluindo a posição de grupos ou átomos pendentes (como por exemplo, átomos de hidrogênio nos cristais de polietileno). Outras informações que podem ainda ser obtidas por esta técnica incluem o tamanho e perfeição dos cristais (CAMPBELL & WHITE, 1989).

1.7.4 Análises térmicas

As análises térmicas envolvem todos os métodos em que as propriedades medidas são obtidas a partir de mudanças na temperatura. A calorimetria diferencial exploratória (DSC) é especificamente designado para medidas das propriedades térmicas do material a ser examinado (por exemplo, mudanças de entropia ou entalpia, etc.). Outras técnicas como a análise termogravimétrica (TGA), como o próprio nome diz, simplesmente monitoram a perda de massa com o aumento da temperatura (CAMPBELL & WHITE, 1989).

A utilização de técnicas de análise térmica, como DSC e TGA, auxiliam na observação das alterações nas propriedades do material antes e depois da degradação. A determinação das propriedades térmicas, tais como, o grau de cristalinidade obtido através da entalpia de fusão (ΔH_m), a temperatura de fusão (T_m) e a temperatura de transição vítrea (T_g) dos polímeros, são obtidas por DSC. A análise termogravimétrica (TGA) fornece as temperaturas de início de degradação (T_i) e temperatura máxima de degradação (T_{pico}), tornando possível avaliar a degradação térmica e a porcentagem de perda de massa dos polímeros (SPIER, 2005).

1.7.4.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica utilizada para determinar as entalpias dos processos de fusão e cristalização (endo e exotérmicos) por comparação com uma referência inerte. O equipamento geralmente varre linearmente uma faixa de temperatura a uma determinada taxa de aquecimento. No DSC do tipo fluxo de calor, a amostra e a referência são aquecidas pela mesma fonte de calor e a diferença de temperatura entre ambas

é monitorada em função da temperatura ou do tempo (WENDLANDT & GALLAGHER; 1981).

A cada momento em que a amostra passa por uma transição de estado térmico, um sinal é produzido como demonstra o gráfico da Figura 1.10 (BILLMEYER, 1984).

O DSC pode ser empregado na medição de temperaturas de transição vítrea, fusão e cristalização; na determinação da cristalinidade, da presença de moléculas de água ligadas, da influência de aditivos sobre as propriedades dos materiais resultantes (cargas, plastificantes, entre outros), na medição de calor específico, no estudo de reações de polimerização e de cura e, ainda, na avaliação da degradação térmica e oxidativa (LUCAS, 2001 *apud* SPIER, 2005).

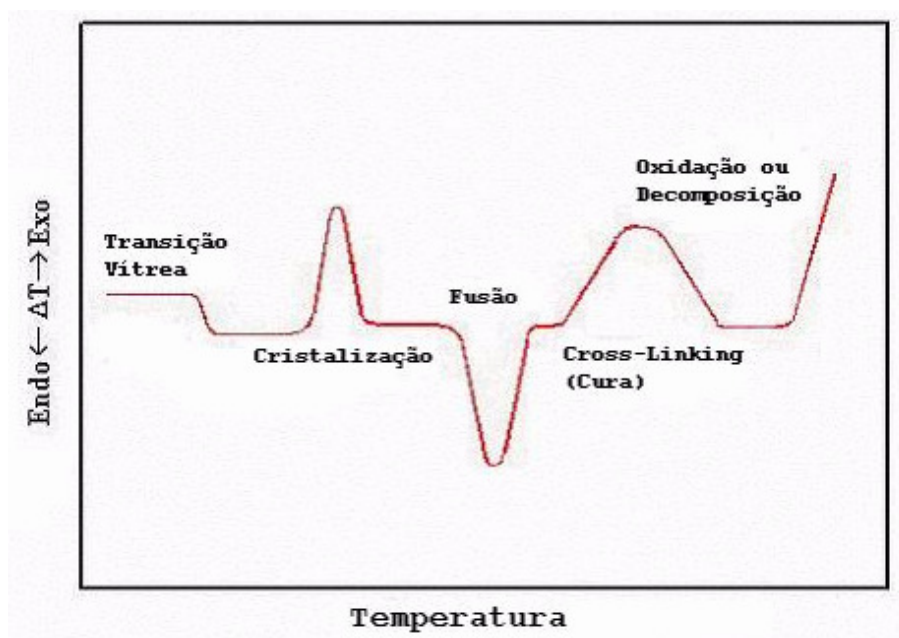


Figura 1.10: Apresentação de uma curva típica de DSC (SPIER, 2005).

1.7.4.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A termogravimetria é uma técnica muito utilizada na caracterização do perfil de degradação de polímeros e outros materiais. A exposição à temperatura elevada pode, algumas vezes, alterar a estrutura química e, por consequência, as propriedades físicas dos materiais. Portanto, a curva de degradação térmica, em condições não isotérmicas, mostra o perfil da resistência ou estabilidade térmica que o material apresenta quando submetido a uma varredura de temperatura (SPIER, 2005).

Como pode ser observado na Figura 1.11, o PVC apresenta uma estabilidade térmica muito baixa quando comparado com outros polímeros, enquanto a PI é o polímero com maior estabilidade térmica, apresentando temperatura de início de degradação em cerca de 550 °C. Ainda de acordo com Spier (2005), a estabilidade térmica é definida como a capacidade da substância em manter suas propriedades o mais próximo possível de suas características iniciais, considerando o ambiente imposto ao material e as funções que ele deve executar.

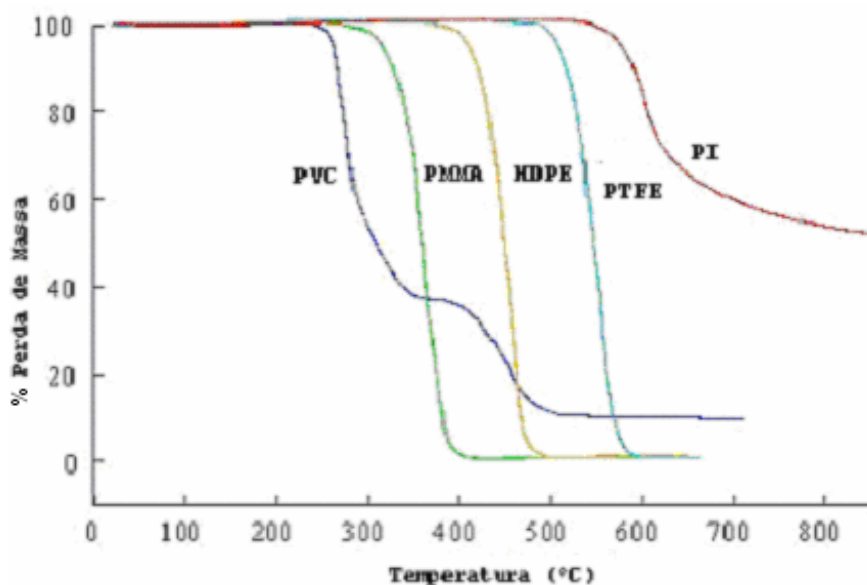


Figura 1.11: Curvas termogravimétricas para os polímeros: poli(cloreto de vinila) (PVC), poli(metacrilato de metila) (PMMA); polietileno de alta densidade (HDPE); politetrafluoretileno (PTFE) e poliimida PI (BILLMEYER, 1984).

1.8 PROPRIEDADES DO P(3HB)

A estrutura química dos PHAs depende do substrato específico da biosíntese do PHA e da fonte de carbono utilizada na síntese. A síntese de PHA por bactérias é amplamente classificada em duas grandes categorias de acordo com seus substratos específicos. A PHAsintase da *C. necator* incorpora HA de cadeia curta (PHA_{SCL}), formando três a cinco átomos de carbono dentro do PHA (YOSHIE & INOUE, 2002).

O P(3HB) é uma resina termoplástica que pode se apresentar altamente viscosa e moldável a temperaturas pouco superiores à sua temperatura de fusão (T_m), apresentando propriedades próximas ao polipropileno (PP) (Tabela 1.3). A massa molar do P(3HB) produzido pela *C. necator* é, usualmente em torno de $1 \cdot 10^4$ a $3 \cdot 10^6$ g.mol⁻¹ com um índice de polidispersividade em torno de 2 (SUDESH *et al.*, 2000). Contudo, o P(3HB) é rígido e

quebradiço devido à presença de vários domínios cristalinos em forma de esferulitos que, uma vez resfriados a partir da fusão em condições adequadas de processamento, podem reduzir o caráter quebradiço produzindo filmes dúcteis (MARCHESSAULT & YU, 2002).

A Tabela 1.3 compara as principais características do P(3HB) e do PP. Ambos os polímeros fundem a temperaturas muito próximas, 180°C para o P(3HB) e 174°C para o PP. A temperatura de transição vítrea (T_g) é característica de cada polímero na qual ocorre a passagem do estado vítreo para o borrachoso, adquirindo um certo grau de flexibilidade, devido à maior movimentação entre as cadeias macromoleculares. Os valores de T_g dos dois polímeros indicam que o PP, por possuir $T_g = -17^\circ\text{C}$ é mais flexível que o P(3HB) ($T_g = 5^\circ\text{C}$). A maior flexibilidade do PP em relação ao P(3HB) é confirmada através do módulo de elasticidade (ou módulo de Yong) do PP (1700 MPa), que é bem inferior ao do P(3HB) (3500 MPa). O módulo de elasticidade de um polímero está diretamente relacionado com a sua rigidez ou flexibilidade de forma que, quanto mais alto, maior a rigidez do polímero. No entanto, ambos os polímeros apresentam alto grau de cristalinidade (FORMOLO *et al.*, 2003)

Tabela 1.3: Comparação entre as principais características do P(3HB) e do PP.

Características	P(3HB)	PP
Ponto de fusão (T_m)	180°C	174°C
Temperatura de transição vítrea (T_g)	5°C	-17°C
Densidade	1.18 – 1.25 g/cm ³	0,91 g/cm ³
Grau de cristalinidade	70%	68%
Permeabilidade de oxigênio	45(cm ³ /m ² /at/dia)	1700 (cm ³ /m ² /at/dia)
Módulo de elasticidade (Módulo de Young)	3500 MPa	1700 MPa
Resistência à ruptura	5%	400%
Massa molar	1 – 8 . 10 ⁵	2,2 – 7 . 10 ⁵

Fonte: GOMEZ & BUENO NETTO, 1997.

A determinação da relação entre a fase cristalina/amorfa fornece informações acerca da densidade, rigidez, resistência mecânica e térmica, bem como sobre a elasticidade, maciez e flexibilidade do polímero (ROSA *et al.*, 1999).

A cristalinidade de um polímero pode ser considerada como um “arranjo ordenado”, uma repetição regular de estruturas atômicas moleculares. O P(3HB) apresenta todos os seus átomos de carbono ligados assimetricamente, possuindo, portanto alta cristalinidade (LEE, 1996b). Estes cristais possuem um centro de simetria, ou seja, se forem deformados numa determinada direção, causarão uma mudança na direção do momento dipolo, (FUKADA & ANDO, 1986 *apud* MARCHESSAULT & YU, 2002). Isto produz uma polarização, como uma mudança na superfície gerada em resposta a esta deformação. O material é torcido ou deformado quando uma voltagem é aplicada. Esta propriedade é conhecida como piezoeletricidade e é típica para muitos sistemas biológicos, mas não usualmente de plásticos (MARCHESSAULT & YU, 2002).

As propriedades do P(3HB) foram consideradas satisfatórias, mas não espetaculares. Como filme para embalagens, possui excelentes propriedades de barreira a gases, sendo cinco vezes menos permeável ao CO₂ que o poli(tereftalato de etila) (PET), além de formar um filme tão forte quanto o PP, mas não tão forte quanto o PET. O P(3HB) pode ser reforçado com fibras de vidro (KING, 1982 *apud* MARCHESSAULT & YU, 2002)

O grau de cristalinidade e a T_m podem ser reduzidos através da incorporação de outros hidroxialcanoatos dentro da cadeia do P(3HB), como o 3-hidroxivalerato (3HV), para formar o copolímero P(3HB-*co*-3HV), via cultivo de bactéria (ORTS *et al.*, 1991). BLOEMBERGEN *et al.* (1986) observaram um decréscimo do grau de cristalização com aumento da quantidade de 3HV. A variação do conteúdo de 3HV permite obter uma grande variedade de propriedades termomecânicas. O módulo de Young do P(3-HB) decresce consideravelmente com o aumento do teor de 3HV, indicando que a adição de 3HV aumenta de forma significativa flexibilidade do copolímero.

Além dos copolímeros, muitos estudos estão em andamento com o intuito de otimizar as propriedades físicas do P(3HB), como obtenção de blendas com outros polímeros biodegradáveis, tais como, poli(*ε*-caprolactona) (PCL) (VOGELSANGER *et al.*, 2003) e amido (ABE & DOI, 1999). O propósito das blendas não é somente para melhorar propriedades inferiores do P(3HB), mas também para controlar o perfil da biodegradação (KUMAGAI & DOI, 1992).

1.9 APLICAÇÕES DOS BIOPOLÍMEROS

As aplicações do P(3HB) e dos PHAs em geral, estão diretamente ligadas às propriedades específicas destes polímeros, tais como: mecânicas, físicas, térmicas, biocompatibilidade, biodegradação, entre outras (REHM & REED, 1988). Estas diferentes propriedades dependem da estrutura química dos PHAs, como o comprimento de grupos pendentes como extensões da cadeia principal ou a distância das ligações ésteres. Tipicamente, os PHAs com grupos pendentes curtos são altamente cristalinos, enquanto os PHAs com grupos pendentes mais longos são elastoméricos (WILLIAMS *et al.*, 1999).

Os PHAs têm atraído considerável interesse industrial, por serem biodegradáveis e biocompatíveis. Particularmente significativa é o fato de ter sido encontrado produtos da degradação do P(3HB), como intermediário metabólico presente em grande número de animais. Foram encontrados em organismos procarióticos e eucarióticos, P(3HB) com baixa massa molar, parecendo funcionar como componentes de um canal iônico da membrana celular (LEE, 1996b). Desde que o ácido R-(-)-3-hidroxi-butírico foi encontrado no sangue humano, os PHAs são sempre referidos com propriedades biocompatíveis. Assim, o desenvolvimento de suturas sintéticas absorvíveis baseadas em copolímeros de ácido láctico e glicólico, encorajou o desenvolvimento de trabalhos com P(3HB) com potenciais aplicações em próteses e outros usos biomédicos em que a lenta absorção é desejável (MARCHESSAULT & YU, 2002)

Microcápsulas de P(HB-*co*-14%HV) para sistema de liberação controlada de antígenos para imunização contra toxoplasmose foram testadas *in vitro* por ELIGIO *et al.* (2005), que concluíram ser um método efetivo para liberação de vacinas. Microesferas de PCL e P(3HB) também foram estudadas por SUAVE *et al.* (2005) para a liberação controlada de pesticidas, sendo que a modificação na composição das blendas afeta sua morfologia e conseqüentemente o perfil de liberação do pesticida.

Devido a suas características, o P(3HB) foi inicialmente utilizado na manufatura de garrafas, filmes e fibras para embalagens biodegradáveis e sacos de proteção para plantas. Além dessas utilizações, podem ser aplicados em papel ou papelão formando uma película impermeável e produzir um material composto completamente biodegradável (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998 *apud* SQUIO, 2003). Os filmes de P(3HB) também têm tido potencial interesse para o uso em embalagens de alimentos com baixa difusão de oxigênio (REHM & REED, 1988).

Os bioplásticos têm sido produzidos em escala industrial por culturas de microrganismos desde a década de 70. O custo de produção do P(3HB) ainda é muito alto comparado aos plásticos convencionais, limitando suas aplicações em certos mercados (BYROM, 1987). Porém, algumas das possíveis aplicações são destacadas na Tabela 1.4 e na Figura 1.12.

Tabela 1.4: Possíveis aplicações para o P(3HB).

PROCESSOS	INDÚSTRIA	PRODUTOS
Extrusão de chapas	Cartões/ Informações	Telefones/ Débito/ Crédito
	Embalagens	Berços termoformados Bandejas termoformadas Chapas separadoras Pratos/ Copos descartáveis
	Automobilística	Revestimentos Peças termoformadas em geral
Injeção	Veterinária	DHL (Dispositivo de liberação hormonal) Marcadores (brincos de boi/local)
	Civil	Conexões
	Agrícola	Tubeletes Vasos Embalagens de defensivos agrícolas Bandejas de contenção de tubeletes
	Higiene pessoal	Barbeadores Escovas dentais
	Embalagens	Tampas de frascos Potes em geral Suportes Caixas de fio dental
	Brinquedos	De montar
	Escolar/Escritório	Canetas Lápis Réguas
	Brindes	Com apelo ecológico
	Automobilística	Peças moldadas em geral
	Ferramentas	Cabos para pincéis
	Esporte	Suportes para bolas de golf.
	Utilidades domésticas	Talheres descartáveis Potes para alimentos

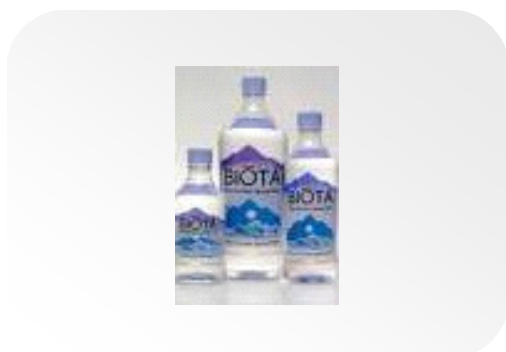
	Médica	Utensílios Embalagens hospitalares Cápsulas
	Armas/Munição	Cartuchos Projéteis plásticos
	Alimentos	Palitos de sorvetes/ canudos
Extrusão de perfis	Civil	Perfis em geral
	Escolar/Escritório	Lápis
	Higiene pessoal	Hastes para cotonetes
Extrusão de tubos	Civil	Tubos em geral
Extrusão de fios	Fiação	Tecidos Não tecidos
	Automobilística	Carpets
	Higiene pessoal	Fio dental
	Cigarros	Filtros
Injeção por sopro	Embalagens	Frascos em geral Defensivos agrícolas
Revestimentos de papéis (Coating papers)	Papéis	Papéis plásticos (impermeáveis) Envelopes Folders
	Embalagens	Longa Vida (tetrapack)



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 1.12: Fotos demonstrativas das atuais aplicações de polímeros biodegradáveis obtidas de sites da Internet. Fontes: [www.biocycle.com.br.](http://www.biocycle.com.br;); [www.ouraycolorado.com.](http://www.ouraycolorado.com;); www.plasticsnews.com

1.10 BIODEGRADAÇÃO

Em muitos países industrializados, a redução do volume de lixo tem sido um tema de intenso debate. Eles estão utilizando os plásticos biodegradáveis para auxiliar na redução do percentual de lixo plástico. Esses materiais têm ainda a vantagem de serem produzidos através de fontes renováveis e contribuir para a ciclagem de materiais de modo análogo aos ciclos biogeoquímicos da natureza (BRANDL *et al.*, 1995), além das características dos plásticos petroquímicos, que os tornam indispensáveis à sociedade moderna (GOMES & BUENO NETTO, 1997).

Segundo estabelecido pela Norma ASTM D883, citada por FILHO *et al* (2001), os polímeros são degradáveis quando a degradação resulta primariamente da ação de microrganismos tais como, bactérias, fungos e algas de ocorrência natural. Em geral, derivam desse processo CO₂, CH₄, componentes celulares e outros produtos.

A biodegradação ocorre pela colonização da superfície do PHA por uma bactéria ou fungo, que secreta uma depolimerase extracelular degradando o polímero em unidades monoméricas primárias nas proximidades da célula. Os produtos da degradação solúveis são absorvidos através da parede celular e metabolizados. (ASTAR & GRUYS, 2002).

Na natureza, os polímeros são degradados preferencialmente por reações hidrolíticas. A presença de éster, éter ou ligações amida facilitam a degradação biológica. A degradação é influenciada por diferentes séries de parâmetros ambientais (Tabela 4), físico-químicos e microbiológicos do ambiente, as propriedades primárias dos materiais e seu processamento, também tem efeito sobre o grau de biodegradação (BRANDL *et al.*, 1995).

Um grande número de microrganismos aeróbios e anaeróbios têm sido isolado em diversos ambientes, tais como *Acidovorax facilis*, *Aspergillus fumigatus*, *Comamonas* sp, *Pseudomonas lemoignei* e *Variovorax paradoxus* do solo, *Alcaligenes faecalis* e *Pseudomonas fluorescens* de lodo ativado, *Comamonas testosteroni* da água do mar, *Pseudomonas stutzeri* em lagos de água doce e, *Ilyobacter delafieldii* de lodo anaeróbico. Estes microrganismos excretam uma PHAdepolimerase que degrada PHAs em monômeros solúveis em água e oligômeros, utilizando-os como fonte de carbono. Os produtos finais da degradação aeróbia do P(3HB) são água e dióxido de carbono, enquanto na degradação anaeróbia o metano também é produzido (LEE, 1996b).

Tabela 1.5: Fatores que influenciam na degradação dos polímeros biodegradáveis.

Parâmetro	Fator
Parâmetros físico-químicos de um ecossistema	Temperatura
	pH
	Quantidade de água
	Quantidade de oxigênio
	Potencial redox
	Suplemento nutricional
Parâmetros microbiológicos de um ecossistema	Presença de inibidores
	Densidade populacional
	Diversidade microbiológica
	Atividade microbiológica
Propriedades primárias do material	Distribuição espacial de microrganismos
	Habilidade de adaptação
	Composição polimérica
	Massa molar
	Distribuição da massa molar
	Grau de cristalinidade
Processamento do material	Temperatura de transição vítrea
	Porosidade
	Hidrofobidade
	Tipo de ligações entre os monômeros
	Tipo de processamento
	Características da superfície
	Espessura do material
Aditivos	
Revestimento	

Fonte: BRANDL *et al.*, 1995.

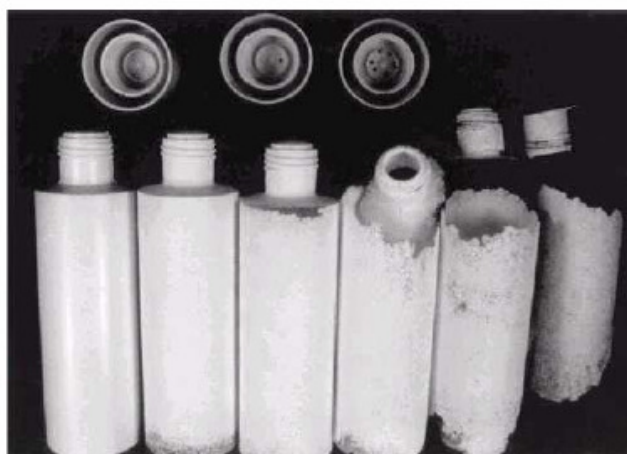
Durante o processo de degradação, não há produção de intermediários nocivos (LUZIER, 1992 *apud* SQUIO, 2003). Para exemplificar a Tabela 1.6 apresenta a degradação de um filme de 1 mm P(3HB-*co*-3HV) em diferentes ambientes.

Tabela 1.6: Biodegradação de um filme de 1mm de P(3HB-*co*-3HV) em diferentes ambientes.

Ambiente	100% em perda de massa (semanas)
Ambiente anaeróbio	6
Sedimentos estuarinos	40
Ambiente aeróbio	60
Solo	75
Água do mar	350

Fonte: LUZIER, 1992 *apud* SQUIO (2003)

A Figura 1.13 apresenta a degradação de frascos de Biopol® (P(3HB-*co*-3HV)) em sistema aeróbio de lodo ativado, incubados por 0, 2, 4, 6 e 8 semanas ((JENDROSSEK, 2002).

**Figura 1.13:** Degradação de frascos de Biopol® em lodo ativado (JENDROSSEK, 2002).

Há alguns métodos para o acompanhamento da biodegradação de polímeros propostos pela ASTM. Entre eles destacam-se a Determinação da Biodegradação Aeróbia dos Plásticos e Exposição dos Plásticos em Ambiente Simulado de Solo através do Teste de Sturm utilizado por Filho *et al.* (2001). O teste opera sob condições aeróbias e a substância a ser testada fornece a única fonte de carbono e energia. Esta substância é adicionada a uma solução nutriente mineral quimicamente definida, livre de carbono orgânico. A solução é inoculada com microrganismos oriundos do esgoto. O sistema é incubado a temperatura ambiente com agitação por 28 dias. Pela ação dos organismos, esta fonte de carbono é totalmente consumida, transformando-se em água e gás carbônico. O CO₂ produzido é coletado em Ba(OH)₂ e medido como carbonato através de retrotitulação com HCL. Após a análise, avalia-se a porcentagem de CO₂ liberado comparando-se com os valores teóricos previstos (VOGELSANGER, 2003).

Outro teste também muito utilizado é o “*soil burial*” (ASTM G160 – 98) no qual o material é enterrado no fundo de recipientes contendo solo fértil preparado em laboratório. Este sistema conta com os microrganismos naturais do solo, areia e adubo utilizados na composição do solo fértil, tendo como única fonte de carbono a amostra polimérica a ser consumida pelos microrganismos. As amostras enterradas neste solo são incubadas a temperatura de 30°C entre 28 dias e 12 meses, sendo o teor de umidade mantido entre 85-95%. Após um período estipulado, as amostras são removidas, lavadas com água destilada, secas em estufa à vácuo e submetidas às análises de caracterização.

CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS

Ao longo deste capítulo faz-se uma abordagem sintética sobre as técnicas analíticas utilizadas para a obtenção dos dados experimentais apresentados nesta dissertação de mestrado. A metodologia utilizada nos cálculos também é apresentada para o entendimento dos valores calculados.

2.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a bactéria mutante *Cupriavidus necator* – DSM 545, conforme definição recente proposta pela Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Coleção de Microrganismos e Cultura de Células da Alemanha) (www.dsmz.de), cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Para sua manutenção, foi empregado o cultivo em tubos de ensaio contendo meio sólido (ágar nutriente), com repiques mensais. Essa cultura foi mantida a 30°C durante 48 horas, e a seguir armazenada em refrigerador a 4°C. A composição do meio ágar nutriente utilizado é de 5,0g/L de peptona de carne, 3,0g/L de extrato de carne e 1,5g/L de ágar.

2.2 Meios de cultivo

A ativação das células foi realizada em caldo nutriente (NB), constituído de 5,0 g/L de peptona de carne e 3,0 g/L de extrato de carne, sendo este considerado pré-inóculo para as culturas e utilizado a uma taxa de 10% (V/V).

O meio de cultivo utilizado para as culturas foi o mesmo utilizado por ARAGÃO (1996), denominado meio mineral (MM), sendo sua composição demonstrada nas Tabelas 2.1 e 2.2. Cada uma das substâncias da Tabela 2.1 foi pesada separadamente, preparando-se frascos contendo a solução estoque, coluna A, sendo depois acondicionado em refrigerador a 4°C. Para a preparação do meio de cultivo utilizaram-se os dados da coluna B. Foram preparadas 3 soluções separadamente. O pH da solução 1 foi ajustado a 7,0 com NaOH 7,5M e HCl 11M. As soluções 1, 2 e 3 foram autoclavadas separadamente, a 121°C por 20 min.

Tabela 2.1: Composição do meio mineral (MM)

	ELEMENTO	A CONCENTRAÇÃO DA SOL. ESTOQUE (g.L ⁻¹)	B VOLUME (mL.L ⁻¹) ^A	C CONCENTRAÇÃO FINAL (g.L ⁻¹)
SOLUÇÃO 1	ác. nitriloacético (NTA)	19,1	10	0,19
	citrato férrico de amônia	10	6	0,06
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	50	10	0,5
	CaCl ₂ . 2H ₂ O	5	2	0,01
	NH ₄ SO ₄	200	25	5 ^e
	solução de oligoelementos ^b		1	(1ml/L)
	água destilada ^c			
SOLUÇÃO 2	Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	223,8	40	8,95
	KH ₂ PO ₄	37,5	40	1,5
SOLUÇÃO 3	fonte de carbono ^d			30

^a Volume retirado da solução estoque para o meio de cultivo.

^b A composição da solução de oligoelementos é demonstrada na tabela 2.

^c O volume de água é calculado em função das concentrações das soluções da coluna B.

^d A fonte de carbono é adicionada diretamente ao meio, não sendo armazenada solução estoque.

^e A concentração da fonte de nitrogênio citada neste caso é para ensaios sem limitação de nitrogênio.

Tabela 2.2: Composição da solução de oligoelementos.

ELEMENTO	CONCENTRAÇÃO	ELEMENTO	CONCENTRAÇÃO
H ₃ BO ₃	0,3	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,03
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,2	NiCl ₂ . 6H ₂ O	0,02
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,1	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,01
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,03		

Fonte: ARAGÃO (1996).

2.3 Condições de cultivo

As células foram ativadas em frasco de Erlenmeyer aletado (500 mL) contendo 100 mL de meio NB, sendo incubadas em *shaker* em movimento rotatório a 30°C, 150min⁻¹, *overnight* (pré-inóculo). Após este período, o pré-inóculo foi transferido para o meio MM, a uma taxa de 10% (V/V), sendo este meio ainda sem limitação em nenhum nutriente, considerado como pré-cultura. Esta etapa também foi conduzida também em frascos de Erlenmeyer aletados de 1000 mL com 300 mL de meio MM, utilizando a mesma rotação e temperatura durante 24 horas.

2.3.1 Ensaios realizados em frascos agitados

As células de *Cupriavidus necator* foram cultivadas em frascos de Erlenmeyer (1.000mL) aletados, contendo 300mL de meio mineral, tendo como fonte de carbono açúcar invertido (glicose e frutose) (30g/L) e como fonte de nitrogênio sulfato de amônio utilizado como nutriente limitante na concentração de 2,3g/L. Para o cultivo foi utilizado um *shaker* CERTOMAT U (Figura 2.1). As células foram cultivadas sob agitação de 150min^{-1} , na temperatura de 30°C , durante 24 horas.



Figura 2.1: Equipamento utilizado para o cultivo de *Cupriavidus necator* em frascos agitados.

2.3.2 Ensaios realizados em biorreator

As células de *Cupriavidus necator* foram cultivadas em biorreator (Figura 2.2) utilizando a composição do MM conforme descrito na Tabela 2.1.

O biorreator utilizado (MD – Braun) com cuba 5L (volume útil igual a 4L) foi autoclavado por 20min a 121°C , contendo a solução 1 (Tabela 2.1). Após o processo de esterilização, foram adicionadas as soluções 2 e 3, previamente esterilizadas, de forma a atender às concentrações previstas na Tabela 2.1, exceto para a substância sulfato de amônio, cuja concentração foi de 2,3g/L para condições com limitação em nitrogênio.

O inóculo foi adicionado observando a taxa de 10% (V/V) ao meio do biorreator. Os parâmetros para condução do processo foram: 30°C, pH 7,0 (controlado com NaOH 7,5M, ou HCl 11M).

As condições de agitação e aeração variaram de 400min⁻¹ a 780min⁻¹ e 0,12vvm a 1vvm, respectivamente, de forma que a pressão parcial de oxigênio dissolvido (pO₂) não ficasse abaixo de 20 %. Como antiespumante foi utilizado polipropilenoglicol 2000 (Fluka).

Foi utilizada a estratégia de alimentação em açúcar. Sempre que a concentração de substrato se aproximava de 10g/L, era realizado um pulso a partir de uma solução a 600g/L, de forma a permitir que a concentração de açúcar no meio retornasse ao valor inicial, próximo a 30g/L. O consumo de substrato foi monitorado por meio do método de DNS (item 2.4.4).

A limitação do nitrogênio ocorre naturalmente nas culturas em decorrência do crescimento celular. Assim, a determinação da fase de crescimento foi feita com base na dosagem do nitrogênio (item 2.4.5). O final da fase de crescimento e, portanto, início da fase de produção do polímero, foi definido no momento em que houve exaustão de nitrogênio.



Figura 2.2: Biorreator utilizado no processo de cultivo de *Cupriavidus necator*.

2.4 Técnicas analíticas

2.4.1 Processamento das amostras

Durante o cultivo foram retiradas alíquotas de 2mL para os frascos agitados e 20mL para o experimento em biorreator, em intervalos de 2 horas para acompanhar a cinética de crescimento (Figura 2.3). Para os ensaios em frascos agitados não foram realizadas as análises de gravimetria e proteína devido à limitação de retirada de volume (o volume de meio de cultivo retirado não deve ser superior a 10% do volume total).

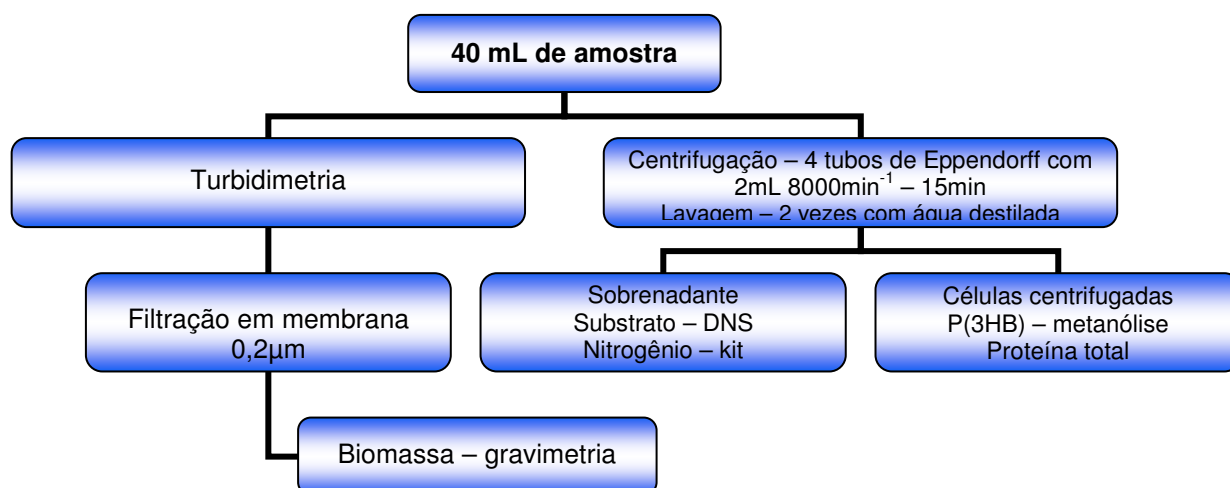


Figura 2.3: Fluxograma do processamento das amostras.

2.4.2 Biomassa

Durante o cultivo, o crescimento celular foi monitorado pela técnica de turbidimetria (DO) (ensaios conduzidos em frascos de Erlenmeyer), em espectrofotômetro (LKB Biochrom - Novaspec II), com comprimento de onda de 600 nm. E por gravimetria (ensaios conduzidos em biorreator), para a qual foram retiradas alíquotas de 10 a 5 mL da suspensão de células proveniente do meio de cultivo (de acordo com a densidade celular ao longo do processo) foram filtradas a vácuo, utilizando-se membranas de poliamida (0,2 µm) previamente secas e pesadas (24h a 90°C). Após a filtração, as membranas foram novamente secas até peso constante (mesmo tempo e temperatura).

Para os ensaios conduzidos em frascos agitados, foi utilizada uma curva de correlação de outro experimento com *C. necator*, considerado controle (anexo 1 – Figura A.1).

2.4.3 Determinação da concentração de P(3HB)

Um volume de 2 mL de meio de cultivo foi centrifugado a 19000 g e as células foram lavadas duas vezes com água destilada sendo após congeladas para posteriormente serem submetidas à metanólise, método proposto por BRAUNEGG *et al.*, (1978). Em seguida, o P(3HB) foi dosado por Cromatografia Gasosa (CG).

Para elaboração da curva de correlação, o polímero puro (Aldrich) foi pesado de forma a se obter massas entre 0,001 e 0,04g, a curva típica pode ser visualizada no anexo 1 – Figura A.2. Os padrões também foram submetidos à metanólise, bem como as amostras.

2.4.3.1 Metanólise

As células foram transferidas para tubos de ensaio, aos quais acrescentou-se 2 mL de metanol acidificado e 2 mL de clorofórmio. Para compor o metanol acidificado adiciona-se 15 % de ácido sulfúrico e ácido benzóico na concentração de 0,4 g/L, este utilizado como padrão interno.

Os tubos de ensaio foram muito bem fechados (utilizando-se fita crepe), e em seguida levados ao banho termostático, com tampa, a 100°C, durante 1 hora. Decorrido este tempo, os tubos de ensaio foram retirados e agitados no vórtex, voltando ao banho por mais 1h 20min. Finalmente, os tubos foram retirados do banho quente e levados a um banho de gelo para interromper a reação.

Após, acrescentou-se 1 mL de água milli-Q, agitando-se novamente no vórtex durante 30 segundos para a formação de duas fases. Com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, retirou-se a fase inferior (clorofórmio + polímero) passando-a aos *viels* previamente identificados para a análise em CG.

2.4.3.2 Cromatografica Gasosa

Após a metanólise, a concentração de polímero contida nas células foi analisada por cromatografia gasosa. Para tanto, utilizou-se um cromatógrafo CG-System 6890 da Agilent, equipado com detector de ionização de chama (FID – hidrogênio e oxigênio). O gás de arraste utilizado foi o He a 3,5 mL/min a fluxo constante e a temperatura de injeção e detecção foi de 250°C e para a coluna utilizou-se rampa de temperatura de 80 a 200°C (20°C/min). Utilizou-se uma coluna de sílica fundida (Ø 0,53 mm/30m) modelo Supercowax 10.

2.4.4 Determinação da concentração de substrato

A determinação da concentração de substrato foi realizada com base no método do ácido 3-5-dinitrossalicílico DNS (MILLER, 1959). As amostras coletadas foram centrifugadas a 19000 g e o sobrenadante foi diluído adequadamente de forma que a concentração de substrato se situasse entre os valores da curva de correlação o, cujas concentrações variaram de 0 a 2g/L de glicose e frutose (anexo 1 – Figura A.3). Um volume de 0,5 mL dessa suspensão foi acrescentado a 0,5 mL de reagente de DNS sendo submetida a um tratamento térmico em banho de água a 100°C por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados em banho de gelo e acrescidos de 5 mL de água destilada. A absorbância foi lida a 540nm em espectrofotômetro LKB Biochron – Novaspec II.

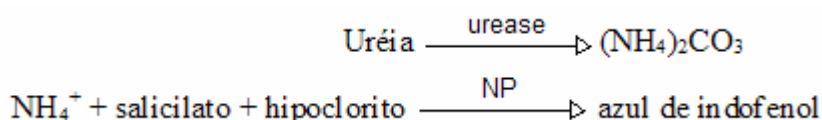
O reativo foi preparado da seguinte forma:

- 150 g de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado (P.A) ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
- 08 g de hidróxido de sódio (NaOH) foram dissolvidos em água destilada;
- 05 g de ácido dinitro 3,5-salicílico (P.A) ($\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$) foram adicionados muito lentamente;
- O volume foi completado para 500 mL com água destilada.

2.4.5 Determinação do teor de nitrogênio

Para verificação do consumo de nitrogênio foi utilizado o *kit* Uréia ES, baseado no método enzimático-colorimétrico Berthlot, utilizado rotineiramente para determinar a uréia no soro, no plasma e na urina.

Nesse método, a uréia é transformada em carbonato de amônia na presença de urease. O íon amônio, na presença de salicilato, hipoclorito e nitroprussiato (NP), forma azul de indofenol, conforme esquema a seguir, produto cuja intensidade da cor formada é diretamente proporcional à concentração de uréia na amostra.



Reativos do kit

- Reativo 1: 100mL de solução-tampão fosfato 0,1M, salicilato 0,3M, nitroprussiato de sódio 17mM e EDTA 7mM

- Reativo 2: 17mL de hipoclorito de sódio 0,32M em NaOH 4,0M

- Reativo 3: 20mL de solução de urease em tampão fosfato

- Reativo 4: solução padrão – 5mL de solução aquosa de uréia 60mg/dL

Reativo 1 A: mistura de 5 partes do reativo 1 com 0,2 parte de reativo 3

O preparo das amostras (devidamente diluídas), assim como das soluções padrão e branco, foi realizado de acordo com a Tabela 2.3.

Tabela 2.3 Volumes de água, amostra e reagentes utilizados na dosagem de nitrogênio.

	Branco	Padrão	Amostra
Padrão	---	10µL	---
Amostra	---	---	10µL
Reativo 1A	1mL	1mL	1mL
Misturar. Incubar exatamente 5 min a 37°C. Adicionar:			
Reativo 2	1mL	1mL	1mL
Misturar. Incubar exatamente 5 min a 37°C.			

A leitura da absorbância foi realizada a 600nm em espectrofotômetro LKB Biochron – Novaspec II, zerando-se o aparelho com o branco. A reação é estável por até duas horas e a concentração de uréia foi calculada da seguinte forma:

$$Uréia(mg / dL) = \frac{amostra}{padrão} \times 60 \quad (\text{equação 2.1})$$

2.4.6 Determinação do teor de proteína

As células previamente centrifugadas foram ressuspensas em 5,5mL de água destilada, adicionou-se ainda 1 mL de NaOH 20% (m/V) ou 5M, o qual proporcionou a lise celular e, incubadas em banho-maria a 100°C por 5min. Em seguida, foram adicionados 170µL de CuSO₄.5H₂O 25% (m/V) à suspensão, que foi homogeneizada em vórtex e deixada em repouso por 5 min. A solução foi centrifugada a 2432 g por 10 min e o sobrenadante formado foi analisado por espectrofotometria a 560nm. Para a curva de correlação (anexo 1 – Figura A.4) utilizou albumina bovina (BSA) entre 0 e 3g/L.

2.5 Metodologia utilizada nos cálculos

Considerando-se que o acúmulo de P(3HB) é intracelular, é importante a definição dos termos a seguir, para melhor entendimento da metodologia adotada para os cálculos:

$$X_t (\text{biomassa total}) = \text{biomassa contendo P(3HB) intracelular}$$

$$X_r (\text{biomassa residual}) = X_t - \text{P(3HB) intracelular}$$

2.5.1 Fatores de conversão

- Fator de conversão de substrato em produto

$$Y_{P(3HB)/S} = \frac{(P(3HB)_k - P(3HB)_0)}{(S_{Consumido})} \quad (\text{equação 2.2})$$

- Fator de conversão de substrato em células

$$Y_{Xr/S} = \frac{(Xr_k - Xr_0)}{(S_{consumido})} \quad (\text{equação 2.3})$$

Onde:

X_{rk} , $P(3HB)_k$: valores de concentração celular (g/L) e concentração em P(3HB) (g/L), respectivamente, no tempo K.

X_0 e $P(3HB)_0$: valores iniciais (em relação à fase considerada) de concentração celular (g/L) e concentração de P(3HB) (g/L), respectivamente.

$S_{consumido}$: quantidade de substrato consumido no período considerado (g/L).

2.5.2 Produtividade

- Produtividade em P(3HB) ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

$$P_{P(3HB)} = \frac{(P(3HB)_k - P(3HB)_0)}{(t_k - t_0)} \quad (\text{equação 2.4})$$

- Produtividade em células ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

$$P_{Xr} = \frac{(Xr_k - Xr_0)}{(t_k - t_0)} \quad (\text{equação 2.5})$$

Onde:

t_k = tempo de fermentação (h) correspondente a $P(3HB)_k$ ou a X_{rk}

t_0 = tempo inicial (h) do período considerado

2.6 Extração do polímero produzido pelo método mecânico proposto

Para a recuperação do P(3HB) utilizou-se um novo método adaptado de Schneider *et al.*, (2001). Ao término de um cultivo, o meio contendo suspensão de células foi congelado, para posterior etapa de extração. O meio de cultivo foi descongelado, centrifugado e as células foram lavadas 2 vezes com água destilada e centrifugadas a 19.000 g. (Figura 2.4).

Buscando encontrar a melhor condição do método, utilizou-se um planejamento fatorial completo 4^2 (Tabelas 2.4 e 2.5), Os ensaios foram realizados em triplicada e posteriormente analisados pelo Programa Estatística (Versão 6.0). Foram adicionadas pérolas de vidro com diferentes diâmetros e massas variando-se ainda o volume de células e de clorofórmio. Os tubos de *Eppendorf* contendo as células foram selados e submetidos à agitação em moinho de bolas, marca Retsch, por 20 minutos a 100 rpm. Em seguida, foram novamente centrifugados a mesma rotação durante 6 minutos. Formaram-se 3 fases distintas: sendo a fase inferior composta pelas pérolas de vidro, a fase intermediária contendo clorofórmio mais polímero e a fase superior formada pelos *debris* celulares. Utilizando uma pipeta automática retirou-se a fase intermediária a qual foi vertida em tubos de ensaio para posterior metanólise e, em placas de Petri para análises de caracterização e deixadas evaporar.

Tabela 2.4: Planejamento fatorial utilizado para a otimização do processo de extração.

Ensaio	Massa Pérolas (g)	Diâmetro Pérolas (mm)	Vol. CHCl ₃ (mL)	Vol. Células (mL)
1	+1	+1	+1	- 1
2	+1	+1	- 1	+1
3	+1	- 1	+1	+1
4	- 1	+1	+1	+1
5	- 1	- 1	- 1	- 1
6	+1	+1	+1	+1
7	- 1	- 1	+1	+1
8	+1	+1	- 1	- 1
9	- 1	+1	- 1	+1
10	+1	- 1	+1	- 1
11	+1	- 1	- 1	+1
12	- 1	+1	+1	-1
13	+1	- 1	-1	-1
14	- 1	+1	-1	-1
15	-1	-1	+1	- 1
16	-1	-1	- 1	+1
17	0	0	0	0

Tabela 2.5: Valores utilizados no planejamento fatorial

Nível	Massa Pérolas (g)	Diâmetro Pérolas (mm)	Vol. CHCl ₃ (mL)	Vol. Células (mL)
+1	1,25	0,75	1	4
-1	0,7	0,5	0,5	2
0	0,975	0,5	0,75	3

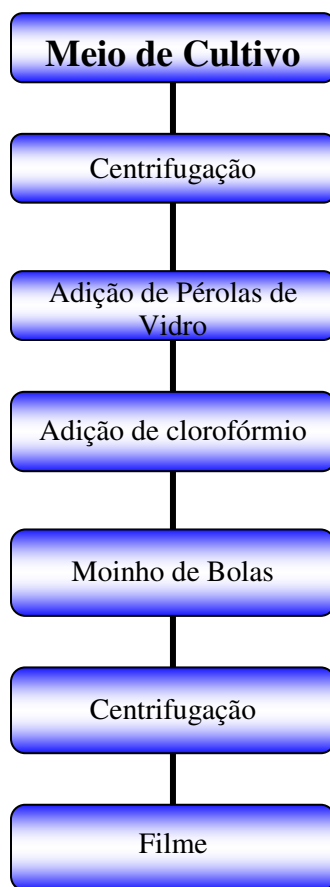


Figura 2.4: Fluxograma do processamento das amostras durante o processo de extração mecânica.

2.7 Estratégia de manutenção da biomassa para a utilização do método mecânico de extração

Após um cultivo em frascos agitados, a biomassa foi concentrada por centrifugação, lavada duas vezes com água destilada sendo após, dividida em três pequenos grupos: uma pequena quantidade foi congelada, outra liofilizada para posterior extração do P(3HB) e uma outra porção foi diretamente submetida à extração logo após a centrifugação e lavagem das células, sem nenhum processo de manutenção.

Os polímeros obtidos dos três grupos foram submetidos à metanólise (item 2.4.3.1) e posteriormente injetados em cromatógrafo gasoso, para a avaliação do rendimento de extração e grau de pureza das amostras (item 2.8).

2.8 Extração pelo método mecânico adaptado utilizando temperatura

A biomassa obtida após o cultivo em biorreator foi já lavada, concentrada por centrifugação, congelada e posteriormente descongelada. À biomassa assim tratada, adicionou-se as pérolas de vidro e clorofórmio, nas proporções definidas pelo planejamento fatorial, e levada à aquecimento em um bloco de aquecimento e agitação (Termomixer) à 40, 50 e 60 °C por 15, 30 e 60 minutos com agitação de 19.000 rpm (Figura 2.5). Após esta etapa as células foram submetidas ao rompimento celular em moinho de bolas e todo o processo de extração mecânico anteriormente citado.

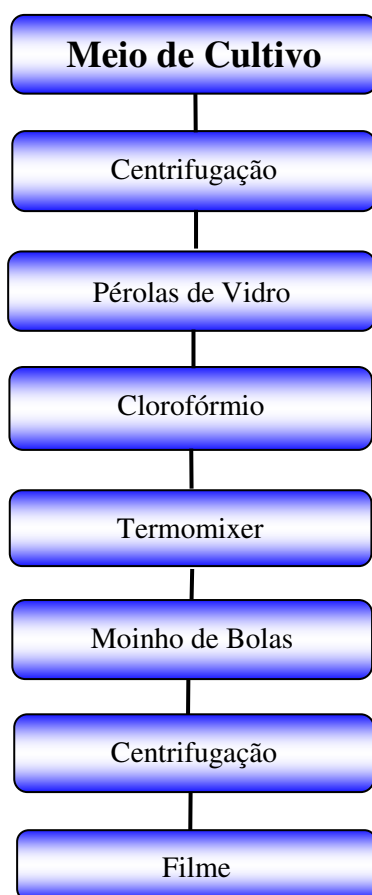


Figura 2.5: Fluxograma demonstrando o processamento das amostras durante o processo de extração mecânica, com etapa de aquecimento antes do rompimento celular.

A exemplo deste, outro ensaio foi conduzido, porém, a etapa de aquecimento foi realizada após o rompimento celular. Os polímeros obtidos dos dois ensaios foram

submetidos à metanólise (item 2.4.3.1) e posteriormente injetados em cromatógrafo gasoso, para a avaliação do rendimento e grau de pureza das amostras (item 2.8).

2.9 Extração do polímero pelo método químico

Para efeito de comparação utilizou-se também o método de extração de Hanh *et al.*, (1994), o qual utiliza uma dispersão de hipoclorito de sódio e clorofórmio. O meio de cultivo foi centrifugado a 19.000 g por 10 min. As células foram ressuspensas em uma dispersão contendo 100 mL de hipoclorito de sódio e 100 mL de clorofórmio (30% V/V). Esta suspensão foi agitada durante 90min a 30°C. Após este tratamento uma nova etapa de centrifugação foi realizada na qual são obtidas três fases: a fase superior é composta pelo hipoclorito de sódio, na fase intermediária ficam os *debris* celulares (também chamados de NPCM, ou materiais celulares não-PHB) e no fundo a solução de clorofórmio e P(3HB). Removendo-se as fases superior e intermediária e, vertendo-se a última fase em uma placa de Petri, posteriormente submetida a evaporação obtém-se um filme polimérico (Figura 2.5).

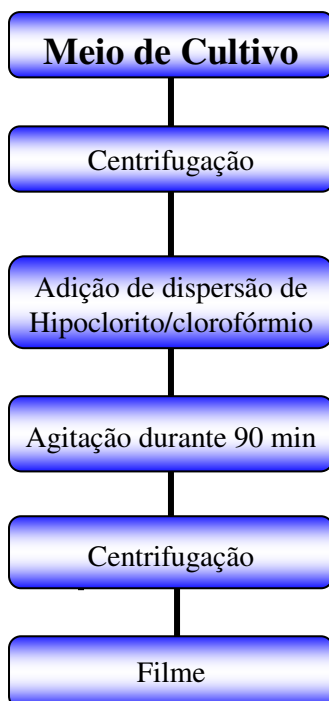


Figura 2.6: Fluxograma do processamento das amostras durante o processo de extração química.

2.10 Determinação do rendimento e grau de pureza dos métodos

Os filmes formados após os diferentes métodos de extração foram submetidos à metanólise, anteriormente citada, e analisados por cromatografia gasosa (CG). O rendimento dos métodos foi dado pela comparação dos resultados obtidos por Cromatografia Gasosa em função da concentração de polímero formado antes do processo de extração e a obtido após os diferentes processos de extração, calculado pela equação 2.6. Enquanto o grau de pureza foi calculado pelo método de normalização da área (KHOSRAVI-DARANI *et al.*, 2004), baseado nos picos detectados por cromatografia gasosa.

% de P(3HB) extraído (g/g)

$$\frac{P(3HB)_{extraído}}{P(3HB)_{biomassa}} * 100 \quad (\text{equação 2.6})$$

2.11 Preparação dos filmes poliméricos

Após o processo de extração, os polímeros foram preparados na forma de filmes finos através do processo de *casting* (evaporação lenta do solvente). Os biopolímeros foram solubilizados em clorofórmio P.A, na concentração de 1% (m/V), sob agitação constante durante 2 horas. Após esse processo, as amostras foram vertidas em placas de Petri e acondicionadas em cuba de vidro saturada em clorofórmio (Figura 2.6). Após cerca de 48 horas, os filmes foram removidos e secos em estufa a vácuo a 40°C por 24 horas.

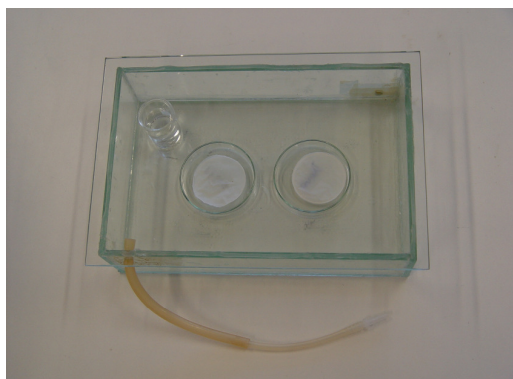


Figura 2.7: Cuba de vidro para formação do filme por evaporação lenta de solvente.

Alguns autores como Schneider (2006) comenta sobre a necessidade de uma etapa de purificação. Neste trabalho, propôs-se a não utilização desta etapa, buscando com isso evitar o uso de mais solventes, que tornam o processo muito poluente. Com o objetivo de eliminar esta etapa, foram comparadas as propriedades finais dos filmes formados logo após o processo de extração com as propriedades dos filmes obtidos após a etapa de purificação (Figura 2.7).

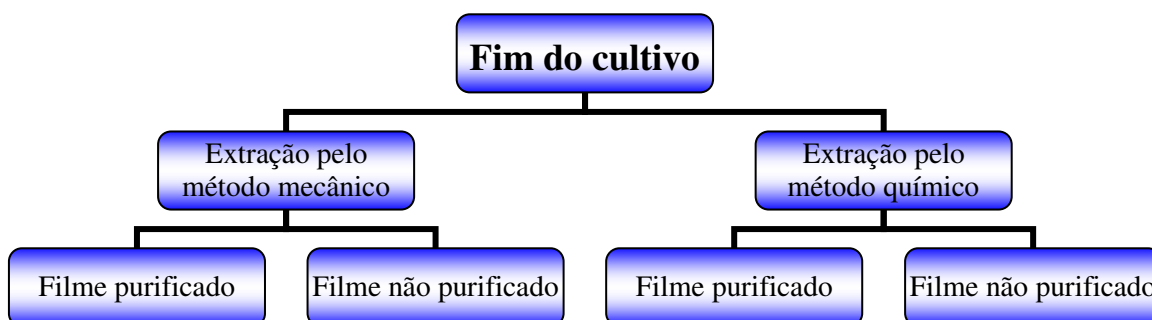


Figura 2.8: Fluxograma do processo das amostras extraídas.

2.11.1 Purificação

O polímero foi solubilizado em clorofórmio P.A. sob agitação constante até aproximadamente 60°C. Após, a solução foi precipitada adicionando-se n-hexano na proporção 1:1 (V/V), sendo os cristais poliméricos filtrados à vácuo e vertidos em placa de Petri, para posterior evaporação do solvente e mais tarde preparação do filme polimérico (item 2.11).

2.12 Caracterização do P(3HB) obtido pelos diferentes métodos de extração.

O polímero obtido a partir do cultivo de *C. necator* foi comparado de acordo com a técnica de extração utilizada e ainda o fato de serem submetidos ou não a etapa de purificação. Foram utilizadas como técnicas de caracterização, espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR), difratometria de raios-X (DRX), calorimetria diferencial exploratória

(DSC), análise termogravimétrica (TGA) e cromatografia de permeação em gel (GPC). Para as amostras submetidas a degradação em solo, foi feita a análise visual, DSC, TGA e GPC.

2.12.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A caracterização dos grupamentos funcionais dos polímeros foi feita por espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR), em equipamento da Perkin Elmer Spectrum One, no intervalo de 4.000 a 450 cm^{-1} pela técnica de reflectância difusa.

2.12.2 Difratometria de raios-X (DRX)

Os difratogramas de raios-X das amostras foram obtidos em um difratômetro de raios-X da marca SHIMATZU, modelo XRD 6000, com fonte de radiação $\text{CuK}\alpha$, com ângulo 2θ e varredura de 10 a 70°.

A análise de DRX foi utilizada para identificação de picos de difração em 2θ , utilizada juntamente com a análise de FT-IR para identificação do material em estudo. A técnica permite ainda o cálculo do grau de cristalinidade

De acordo com Oliveira *et al.* (2006), a partir dos difratogramas pode ser determinado o ângulo de difração para cada plano cristalográfico (hkl). Utilizando a lei de Bragg (equação 2.7) foi possível estabelecer a relação entre o ângulo do raio difratado (obtido a partir do difratograma) e a distância interplanar (d):

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (\text{equação 2.7})$$

Onde:

% C = fração cristalina

n = é a ordem de reflexão (qualquer número inteiro)

λ = é o comprimento de onda em Cu

A magnitude da distância entre dois planos adjacentes e paralelos é uma função de ambos os índices de Miller e dos parâmetros de rede (a, b, c).

Dessa foram para uma estrutura ortorrômbica, como é o caso do P(3HB), a relação entre d e os parâmetros de rede é dada pela equação 2.8.

$$d = \left(\frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2} \right)^{-\left(\frac{1}{2}\right)} \quad (\text{equação 2.8})$$

A partir das equações 2.7 e 2.8, os parâmetros de rede são estabelecidos. Os parâmetros a , b e c das células unitárias podem ser calculados a partir dos planos cristalinos.

Com auxílio de um *software* aplicativo, pelo método estabelecido por Ruland (1974 *apud* Oliveira *et al.* 2006) que subtrai o halo amorfo da parte cristalina (equação 2.9), foi determinado ainda, o grau de cristalinidade do P(3HB). O grau de cristalinidade dos filmes de P(3HB) obtidos pelos métodos mecânico e químico, com e sem a etapa de purificação, podem ser observados na Tabela 4.2.

$$\%C = \left[\frac{Ic}{(Ic + KIa)} \right] * 100 \quad (\text{equação 2.9})$$

Onde:

$\% C$ = fração cristalina

Ic = é o resultado da integração da difração dos picos

Ia = área sob o halo amorfo

K = constante de proporcionalidade de cada polímero

2.12.3 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

A análise de DSC foi utilizada com o objetivo de identificar a temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e grau de cristalinidade (χ_c). Para tanto, foi utilizado um equipamento TA Instruments para caracterizar o polímero quanto à temperatura de fusão (T_m), temperatura de transição vítrea (T_g) e grau de cristalinidade pela determinação da entalpia de fusão. As amostras pesando de 7,2 a 7,8mg foram seladas em painéis de alumínio sob atmosfera inerte (argônio), aquecidas de 25 a 190°C com taxa de aquecimento de 10°C min^{-1} e mantidas nessa temperatura por 2 minutos. Em seguida, foram resfriadas com taxa de 15°C min^{-1} de 190 a -100°C e mantidas nessa temperatura por 2 minutos. Um

segundo aquecimento foi realizado no intervalo de temperatura de -100 a 190°C com taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

O grau de cristalinidade, por esta técnica, foi calculado por meio da equação 2.10.

$$\chi_c = \frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{\Delta H_m^0} \times 100\% \quad (\text{equação 2.10})$$

Onde:

ΔH_m = entalpia de fusão da amostra (J/g)

ΔH_c = entalpia de cristalização da amostra (J/g)

ΔH_m^0 = entalpia de fusão considerando polímero 100% (J/g)

Para P(3HB) $\Delta H_m^0 = 142$ (J/g) (TSUJI & IKADA, 1996)

2.12.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise de TGA foi efetuada com o objetivo de se verificar a estabilidade térmica dos polímeros extraídos pelas diferentes técnicas se determinar a estabilidade térmica dos polímeros (temperatura do início de degradação (T_i) e temperatura máxima de degradação (T_{pico}). Sendo também considerada como uma análise complementar com a qual pode-se observar o grau de pureza das amostras. E ainda, para as amostras submetidas à degradação em solo, (item 2.13) visando determinar a degradação térmica e perda de massa.

Estas análises foram realizadas em um equipamento da Netzsch – Gerätebau GmbH Thermal Analysis Proteus. As amostras foram aquecidas de 25 a 600°C a uma taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, sob atmosfera de argônio. A determinação das temperaturas foi feita com base na 1ª derivada.

2.12.5 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Foram utilizadas análises de GPC para caracterizar propriedades físicas como a faixa de distribuição de massa molar das amostras obtidas pelos diferentes processos de extração e

ainda, observar o nível de degradação das amostras de P(3HB) antes e depois da degradação em solo.

O primeiro passo nas análises de cromatografia de permeação em gel é a calibração do sistema. Foram utilizados padrões de poliestireno (PS) de faixa estreita de massa molar, a faixa de distribuição de massa molar estava compreendida entre $2,5 \cdot 10^3$ a $9,0 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹. O anexo 1 – Figura 5 demonstra a curva de correlação obtida nos sistemas da Shimadzu usando clorofórmio como fase móvel.

Foi utilizada uma coluna Supelcogel TSK 4000 mantida a 35°C, com volume de injeção foi de 10 µL tanto para os padrões como para as amostras, a vazão da fase móvel foi de 0,8mL.min⁻¹.

As análises foram feitas em um HPLC LC10AD da Shimadzu 2695, com detector RID 10AD (índice de refração).

As amostras foram dissolvidas em clorofórmio à 40°C por 30 min.

2.12.6 Análise Visual

A análise visual consiste em uma técnica de observação macroscópica das alterações sofridas pelo polímero submetido à degradação em solo.

2.13 Ensaio de Biodegradação

O preparo do solo e os ensaios de biodegradação realizados neste trabalho seguiram a metodologia do teste *soil burial* e foram executados com base na norma ASTM G160 – 98.

2.13.1 Preparação do solo

O solo foi preparado com partes iguais de solo fértil (com baixo teor de argila), esterco de cavalo e areia de praia (42 mesh). A massa total da terra seca foi de 15 Kg. Após a mistura, a terra foi peneirada com uma peneira de 4mesh. A terra foi envelhecida por três meses e reexaminada duas vezes por mês monitorando-se o pH (6,5 a 7,5) e a umidade (20 a 30%). O

pH do solo foi monitorado nesse período e mantido entre 6,5 e 7,5 mediante adição de calcário ou enxofre, respectivamente para aumentar ou abaixar o pH.

Após os três meses, foi realizado um controle de viabilidade que consistiu em enterrar um pano de algodão (400 a 475g/m^3) e medir a resistência à tração após cinco dias. Havendo perda de 50% dessa propriedade, a terra é considerada própria para uso. Após obtenção de resultado positivo nesse teste, a terra foi acondicionada em copos de Becker de 1L com cerca de 17cm de altura, que foram utilizados nos testes de biodegradação.

2.13.2 Ensaio de biodegradação

Os filmes obtidos a partir dos cultivos de *C. necator* e submetidos aos diferentes processos de extração foram submetidos aos ensaios de biodegradação em solo. Para tanto, foram utilizados copos de Becker contendo a amostra cortada no tamanho 5×5 cm.

A umidade do solo foi mantida entre 20 e 30%, com base na massa seca do solo. A água perdida durante o experimento devido à evaporação foi recolocada sem deformar o solo. Os copos de Becker foram alocados em uma sala climatizada capaz de manter a temperatura em $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e a umidade entre 85 e 95%.

As amostras foram removidas após 7, 14, 21 e 28 dias, cuidadosamente lavadas com água destilada, e secas em estufa a vácuo a 40°C por 24 horas. Foram avaliadas mudanças nas propriedades visuais, térmicas (DSC e TGA), quanto à variação do grau de cristalinidade (DSC) e ainda à variação da massa molar (GPC).

CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

SÍNTESE E EXTRAÇÃO DE P(3HB) POR *Cupriavidus necator*

Um dos obstáculos para produção e aplicação em larga escala do P(3HB) é seu elevado custo em relação aos polímeros petroquímicos, sendo comum a pesquisa por alternativas que diminuam o custo de sua produção (CHEN *et al.*, 2001a,b), buscando tornar estes materiais mais competitivos e, desta forma, com aplicabilidade mais ampla na sociedade.

Tendo em vista que mais da metade deste custo é atribuída aos processos de extração e purificação utilizados para a obtenção do P(3HB) (LING *et al.*, 1997), o objetivo principal deste capítulo foi propor um método mecânico de extração, o qual foi comparado com o método químico proposto por Hanh *et al.* (1994). Para tanto, foram realizados cultivos com a bactéria *Cupriavidus necator* em biorreator, bem como um planejamento fatorial para definição das melhores condições de extração do polímero.

3.1 Cultivo de *Cupriavidus necator* em frascos agitados visando a produção de P(3HB)

Foram realizados ensaios para a síntese de P(3HB) por *C. necator* em frascos agitados a 30°C, visando à execução de um planejamento fatorial, a fim de obter as melhores condições para o método mecânico de extração proposto e, ainda, verificar qual a melhor forma de manutenção das células antes de serem submetidas ao processo de extração. Durante o cultivo de 24 horas foram feitas amostragens a cada 2 horas, com as quais pode-se observar a cinética de crescimento (absorbância - abs), consumo de substrato (S) e síntese de polímero P(3HB). Considerando que a retirada de amostra é limitada a 10% do volume de meio de cultura para não alterar a transferência de oxigênio, os ensaios realizados em frascos agitados não permitiram a obtenção de todos os parâmetros cinéticos. Na figura 3.1 observa-se a evolução do crescimento em função do tempo (expresso em ln de abs), o consumo de substrato e a produção de P(3HB).

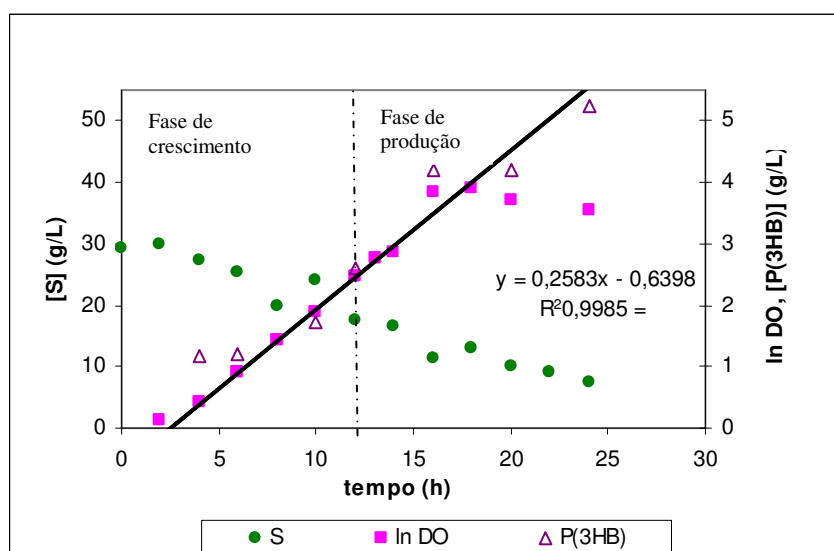


Figura 3.1: Crescimento celular (expresso em ln de abs), consumo de substrato e produção de P(3HB) por *Cupriavidus necator* a 30°C.

Como pode ser verificado, o cultivo iniciou com uma pequena fase lag, seguida de uma fase de crescimento exponencial de 3h a 12h, apresentando uma velocidade específica de crescimento de $0,25h^{-1}$. A duração da fase exponencial foi confirmada pelo término do nitrogênio (representado pela linha pontilhada) em 12 horas de cultivo. Embora já tenha sido

observada a presença de P(3HB) nas primeiras horas, a produção foi mais acentuada após cerca de 10h de cultivo, quando as células já iniciavam a fase estacionária de crescimento. A presença de baixas concentrações de P(3HB) no início da fase de crescimento celular também foi verificada por Schneider (2006), quando estudava o efeito da suplementação com ácido oléico sobre o crescimento celular e a produção de polímero em *Cupriavidus necator*.

Ao final da fase de produção, a biomassa total aproximada foi de 12 g/L, a concentração de P(3HB) no interior da célula foi de 5,25 g/L o que representou um acúmulo total de P(3HB) de 44%. Observou-se ainda, que o substrato não foi totalmente consumido, restando cerca de 7 g/L no meio de cultura.

3.2 Cultivo de *Cupriavidus necator* em biorreator visando a produção de P(3HB)

Neste trabalho, também foram exploradas outras propostas como o uso de temperatura sobre o rendimento e pureza do polímero e comparação entre o método mecânico e o químico de extração. Assim, um ensaio em biorreator foi conduzido visando a produção de células com P(3HB) para a realização destes ensaios.

A síntese de P(3HB) por *C. necator* foi realizada em biorreator MD B.BRAUN, em cuba de 5 L, contendo 4 L de volume útil, a 30°C. As células foram cultivadas por 30 horas, tendo como fonte de carbono, glicose e frutose, e como nutriente limitante o nitrogênio, na forma de sulfato de amônio.

As curvas de concentração de oxigênio dissolvido ($pO_2\%$) e de consumo de substrato podem ser observadas no anexo 2 – Figuras B.1 e B.2, respectivamente. A curva de $pO_2\%$ auxilia a determinar o momento em que houve exaustão do nitrogênio, considerando que, neste ponto a concentração de oxigênio dissolvido volta a se elevar, devido ao menor consumo de O_2 nesta fase. A curva de consumo de substrato mostra os pontos em que foram realizadas as alimentações em açúcar invertido (solução 600 g/L), de forma que a concentração de açúcar no biorreator se situasse entre 10 g/L e 40 g/L.

Na figura 3.2, pode-se observar a cinética de crescimento (biomassa total (X_t), biomassa residual (X_r), proteína (P)) e síntese de polímero P(3HB). Nota-se duas fases bem características, a fase de crescimento celular e a de produção de polímero. Durante a fase de crescimento, na qual havia nitrogênio disponível, o aumento da massa celular resultou quase

que totalmente no aumento da biomassa residual, e um acúmulo de P(3HB) no interior da célula de cerca de 28% no final desta fase, indicando que baixas concentrações de nitrogênio já são limitantes para permitir o acúmulo intracelular de polímero. Como discutido por Ramsay *et al.* (1990) *apud* Schneider (2006), concentrações abaixo de 0,2 g/L de nitrogênio já permitem o acúmulo de P(3HB) durante a fase de crescimento não limitado.

Na segunda fase, que ocorreu após a exaustão de nitrogênio (representada pela linha pontilhada), a produção de P(3HB) foi acentuada, alcançando um acúmulo total de 66 % de P(3HB) no interior das células após 30 h, enquanto o aumento da biomassa residual tornou-se quase inexistente.

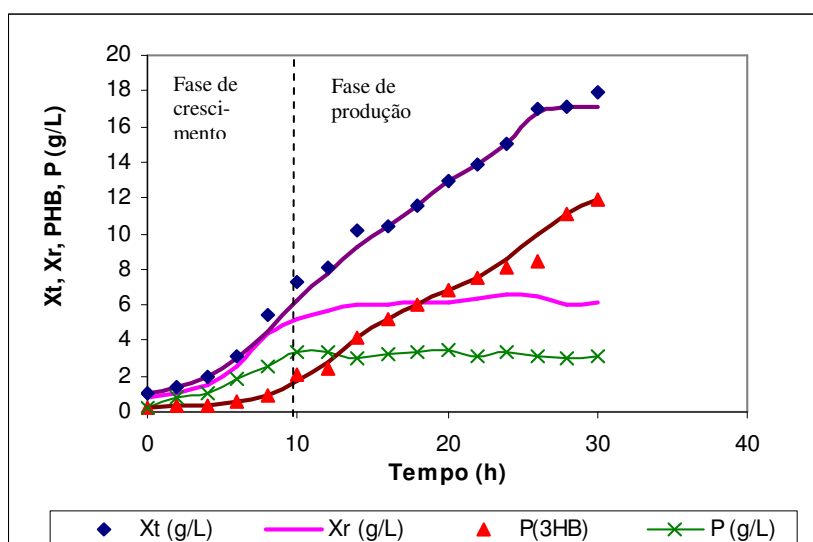


Figura 3.2: Evolução do cultivo de *Cupriavidus necator* a 30°C expresso em concentração de biomassa total (Xt), biomassa residual (Xr), formação de proteína (P) e produção de P(3HB).

Este ensaio permitiu alcançar os valores globais de $0,39 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $0,18 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para produtividade em P(3HB) e em biomassa residual, respectivamente. Na tabela 3.1 podem ser observados os dados e parâmetros cinéticos deste cultivo.

Rodrigues (2005), testando amido hidrolisado como fonte de carbono em cultivo de *C. necator*, obteve $0,22 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para a produtividade de P(3HB). De acordo com Kim *et al.* (1994) em condições otimizadas e em alta densidade celular, a produtividade de P(3HB) pode alcançar $2,24 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Já o fator de conversão de substrato em produto obtido neste trabalho foi igual a $0,32 \text{ g.g}^{-1}$. Kim *et al.* (1994), também encontrou um fator de conversão de substrato

em produto de $0,3 \text{ g.g}^{-1}$, quando cultivou *C. necator* tendo somente glicose como fonte de carbono e nitrogênio como nutriente limitante.

Tabela 3.1: Concentração da biomassa total (X_t), biomassa residual máxima (X_r), P(3HB) máximo ($P(3HB)_{\text{máx}}$) e substrato (açúcar invertido) consumido ao longo de 30h de cultivo ($S_{\text{cons.global(30h)}}$), parâmetros globais de fator de conversão de substrato em biomassa residual ($Y_{Xr/S}$) e em P(3HB) ($Y_{P(3HB)/S}$) e produtividade em biomassa residual (P_{Xr} ($\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$)) e em P(3HB) ($P_{P(3HB)}$ ($\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$)).

X_t (g/L)	X_r (g/L)	$P(3HB)_{\text{máx}}$ (g/L)	$S_{\text{cons.global(30h)}}$ (g/L)	$Y_{Xr/S}$ (g/g)	$Y_{P(3HB)/S}$ (g/g)	P_{Xr} ($\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$)	$P_{P(3HB)}$ ($\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$)
17,96	6,09	11,14	36,42	0,15	0,32	0,18	0,39

Após o cultivo de 30h, a produção de P(3HB) alcançou $11,14 \text{ g/L}$ e a suspensão contendo $17,96 \text{ g/L}$ de células foi concentrada por centrifugação e lavada duas vezes com água destilada. A biomassa concentrada foi congelada a -20°C para posterior uso nos testes de extração de P(3HB).

3.3 Extração do P(3HB) pelo método mecânico – Planejamento fatorial

Como alternativa à extração com solvente, foi proposto neste trabalho um método mecânico (que promove o rompimento celular por força mecânica), buscando menor custo, mais eficiência e menor geração de poluentes.

O objetivo do planejamento fatorial realizado foi de otimizar o rendimento de extração de P(3HB) da bactéria *C. necator*, verificar a interação entre as variáveis sobre o processo e selecionar as melhores condições do método mecânico proposto.

O planejamento fatorial consiste na seleção de um número fixo de níveis para cada um dos fatores ou variáveis e na execução de experimentos com todas as combinações possíveis. Para investigações preliminares e quando o objetivo é determinar se dois fatores exercem ou não influência sobre a resposta, utiliza-se um planejamento fatorial de dois níveis (nível -1 e nível +1) para cada variável. Assim, para “n” variáveis envolvidas no estudo, o número de experimentos que deve ser realizado para investigar todas as combinações possíveis é igual a 2^n (BRUNS *et al.*, 1995).

Para estes ensaios, foi aplicado um planejamento fatorial completo (2^4) baseado nos dados utilizados por Schneider *et al.* (2001). Os ensaios foram realizados em ordem aleatória

e em triplicata, para estimar o erro experimental, e conseqüentemente, avaliar a significância estatística dos efeitos.

Foram utilizadas as células previamente concentradas e lavadas do cultivo em frascos agitados. O rendimento da extração foi definido como sendo o percentual da concentração de P(3HB) extraído em relação à concentração de P(3HB) no interior das células ao final do cultivo (CHOI & LEE, 1999; CHEN *et al.*, 2001a). O resultado foi posteriormente submetido a uma análise estatística pelo programa Statística (versão 6.0).

As combinações específicas dos fatores testados em 16 experimentos, em triplicata, sobre o rendimento do P(3HB) estão demonstradas na tabela 3.2. Foi realizado ainda, um experimento adicional (E17), denominado ponto central, com valores intermediários entre os extremos máximo e mínimo. Os fatores avaliados foram a massa de pérolas (g), o diâmetro das pérolas (mm), o volume de clorofórmio (mL) e o volume de suspensão celular (mL) em um nível máximo e mínimo.

Tabela 3.2: Planejamento fatorial completo utilizado para o método mecânico adaptado com moinho de bolas.

Ensaio	Massa Pérolas (g)	Diâmetro Pérolas (mm)	Vol. CHCl ₃ (mL)	Vol. Células (mL)	Rend.* P(3HB) %	Erro Padrão
1	(+)1,25	(+) 0,75	(+) 1	(-) 2	81,73	8,24
2	(+)1,25	(+) 0,75	(-)0,5	(+) 4	11,78	0,30
3	(+)1,25	(-) 0,5	(+) 1	(+) 4	60,81	10,18
4	(-) 0,7	(+) 0,75	(+) 1	(+) 4	68,33	16,45
5	(-) 0,7	(-) 0,5	(-)0,5	(-) 2	27,23	3,76
6	(+)1,25	(+) 0,75	(+) 1	(+) 4	54,21	4,28
7	(-) 0,7	(-) 0,5	(+) 1	(+) 4	64,22	6,59
8	(+)1,25	(+) 0,75	(-)0,5	(-) 2	21,65	5,64
9	(-) 0,7	(+) 0,75	(-)0,5	(+) 4	10,48	3,20
10	(+)1,25	(-) 0,5	(+) 1	(-) 2	58,30	10,07
11	(+)1,25	(-) 0,5	(-)0,5	(+) 4	nd	nd
12	(-) 0,7	(+) 0,75	(+) 1	(-) 2	82,89	0,97
13	(+)1,25	(-) 0,5	(-)0,5	(-) 2	8,34	0
14	(-) 0,7	(+) 0,75	(-)0,5	(-) 2	35,71	0,71
15	(-) 0,7	(-) 0,5	(+) 1	(-) 2	83,79	1,75
16	(-) 0,7	(-) 0,5	(-)0,5	(+) 4	8,67	1,86
17	0,975	0,5	0,75	3	43,04	3,80

* Média entre as triplicatas; nd = Não determinado.

De acordo com os resultados obtidos por meio das médias entre as triplicatas, pode ser verificado na tabela 3.2 que duas condições testadas para extração do P(3HB) se destacaram:

o experimento E12, no qual foi utilizada a combinação de 0,7 g de pérolas com diâmetro de 0,75 mm, volume de clorofórmio de 1 mL e volume de células de 2 mL e o experimento E15, o qual variou apenas o diâmetro das pérolas para o nível inferior em relação ao E12. Ambas atingiram 82,89 e 83,79% em rendimento de extração respectivamente.

Os ensaios E1 e E4 também forneceram bons resultados, especialmente quando o erro padrão é considerado. No entanto, o elevado percentual de erro padrão pode ser atribuído às condições avaliadas em cada caso: no ensaio E1 foi utilizada a massa de pérolas no nível (+) e, como poderá ser observado comparando os demais ensaios não é uma condição adequada para extração, pois há pouco espaço disponível para a agitação. Em outras palavras, a energia cinética é menor, implicando em um menor atrito pérola-célula.

No ensaio E4, foi utilizada a quantidade de células correspondente a um volume de 4 mL de suspensão celular. Desta forma, a quantidade de pérolas foi insuficiente para causar atrito e conseqüentemente lisar o conteúdo existente de células.

No ensaio E11 ocorreu um problema experimental, não sendo possível retirar a solução polimérica do tubo devido à sua alta concentração, atribuída ao baixo volume de solvente utilizado (0,5 mL) a alta massa de pérolas (1,25 g) e quantidade de células correspondente ao volume de suspensão celular (4 mL). O baixo volume de clorofórmio e a elevada concentração celular também afetaram os ensaios E2, E9 e E16, que por conseqüência, atingiram baixos valores de rendimento de extração de P(3HB).

Nos demais ensaios, os valores de rendimento de extração de P(3HB) variaram entre 8,34 e 64,22 %. Embora a concentração de células correspondesse ao volume inferior (2 mL), o volume de clorofórmio nos ensaios E5 (27,23%), E8 (21,65%), E13 (8,34) e E14 (35,7%), também foi utilizado no nível inferior (0,5 mL), sugerindo uma forte relação entre a quantidade de células e o volume de solvente. Dobrando o volume de suspensão celular (4 mL) e portanto a concentração de células, para um mesmo volume de clorofórmio (E16), a relação aumenta para 8 resultando em um baixo rendimento de extração (8,67%).

Comparando os ensaios E5 e E13 quanto a variação da massa de pérolas, neste último a massa de pérolas foi utilizada em seu nível superior (1,25 g), o que permitiu retirar amostra para análise de apenas uma das replicadas, na qual foi atingido o menor rendimento em P(3HB) (8,34 %). No ensaio E5, em que a massa de pérolas estava em nível inferior (0,7 g) foi possível não só obter polímero para a análise em todas as replicatas, bem como o rendimento em P(3HB) passou de 8,34% para 27,23%.

Porém, para comprovar estes resultados e determinar qual a melhor condição, foi feita uma análise estatística, a partir da qual se obteve uma tabela de análise de variância

(ANOVA), um gráfico de pareto e gráficos de superfície. Os resultados foram interpretados observando-se como os vários fatores afetam a resposta.

Segundo Teófilo & Ferreira (2005), existem diferentes métodos para se avaliar efeitos e coeficientes significativos e, entre os mais usados destaca-se a *análise de variância* (ANOVA). O modelo obtido pode não ser exatamente aquele que descreve a região estudada do sistema e, neste caso, não pode ser usado para fazer estimativas para deslocamento e muito menos para extrair conclusões sobre a região ótima. A maneira mais confiável de se avaliar a qualidade do ajuste do modelo é através da ANOVA. Na ANOVA, a variação total da resposta corrigida para a média (SS_{total}) é definida como a soma quadrática de dois componentes: a soma quadrática da regressão (SS_{regr}) e a soma quadrática dos resíduos (SS_{res}).

A Tabela 3.3 apresenta a ANOVA do planejamento proposto. Estão demonstrados a soma quadrática (SS), o grau de liberdade (df), a média quadrática (MS), o F calculado (F_{cal}) e a probabilidade dos valores serem significativos (*p*) (<0,05) para cada variável, suas interações e sua influência sobre o incremento na extração do P(3HB). Nesse caso, os valores destacados em vermelho refletem os fatores que exercem influência significativa sobre o processo.

Tabela 3.3: Análise de variância (ANOVA) demonstrando a variação significativa (valores em vermelho) sobre os parâmetros: volume de clorofórmio, volume de suspensão celular, massa de pérolas e diâmetro das pérolas.

ANOVA; Var.:%_PHB; R ² =,9074; Adj.:,87139 (plandef.sta)						
2**(4-0) design; MS Residual=117,6548						
DV: %_PHB						
	SS	df	MS	F _{cal}	<i>p</i>	
(1)M_PEROLA	1497,579	1	1497,579	12,72858	0,00104145	
(2)DIAM_PER	681,1787	1	681,1787	5,789636	0,021380034	
(3)V_CLOR	35523,64	1	35523,64	301,931	4,34932E-19	
(4)V_CELL	2534,354	1	2534,354	21,54059	4,4731E-05	
1 by 2	225,5201	1	225,5201	1,916794	0,174732644	
1 by 3	1,100713	1	1,100713	0,009355	0,923482433	
1 by 4	314,8653	1	314,8653	2,676178	0,110574506	
2 by 3	87,3936	1	87,3936	0,742796	0,394471306	
2 by 4	292,2859	1	292,2859	2,484266	0,123738188	
3 by 4	2,154131	1	2,154131	0,018309	0,893120219	
1*2*3	6,836933	1	6,836933	0,05811	0,810876041	
1*2*4	226,4745	1	226,4745	1,924906	0,173846246	
1*3*4	85,13526	1	85,13526	0,723602	0,400587557	
2*3*4	26,8949	1	26,8949	0,228592	0,63546083	
Error	4235,574	36	117,6548			
Total SS	45740,99	50				

Através da estimativa do valor de p dado pela ANOVA, verificou-se que das quatro variáveis testadas, quando analisadas individualmente, todas obtiveram um valor de p bem menor que o nível de significância (0,05) estabelecido para este teste, constatando que todas tiveram influência significativa no processo de extração do P(3HB). Porém, o mesmo não foi observado para as interações entre dois e três fatores, concluindo-se que estas não exerceram influência significativa no processo.

Porém, para analisar o efeito separado de cada variável sobre a resposta, é necessário observar o gráfico de pareto, demonstrado na Figura 3.3. Este gráfico apresenta quatro variáveis principais, seis interações de duas variáveis e quatro interações de três variáveis. Foi realizado ainda o teste t (*Student*) através do qual foram confirmados o nível de confiança e significância das quatro variáveis individualmente.

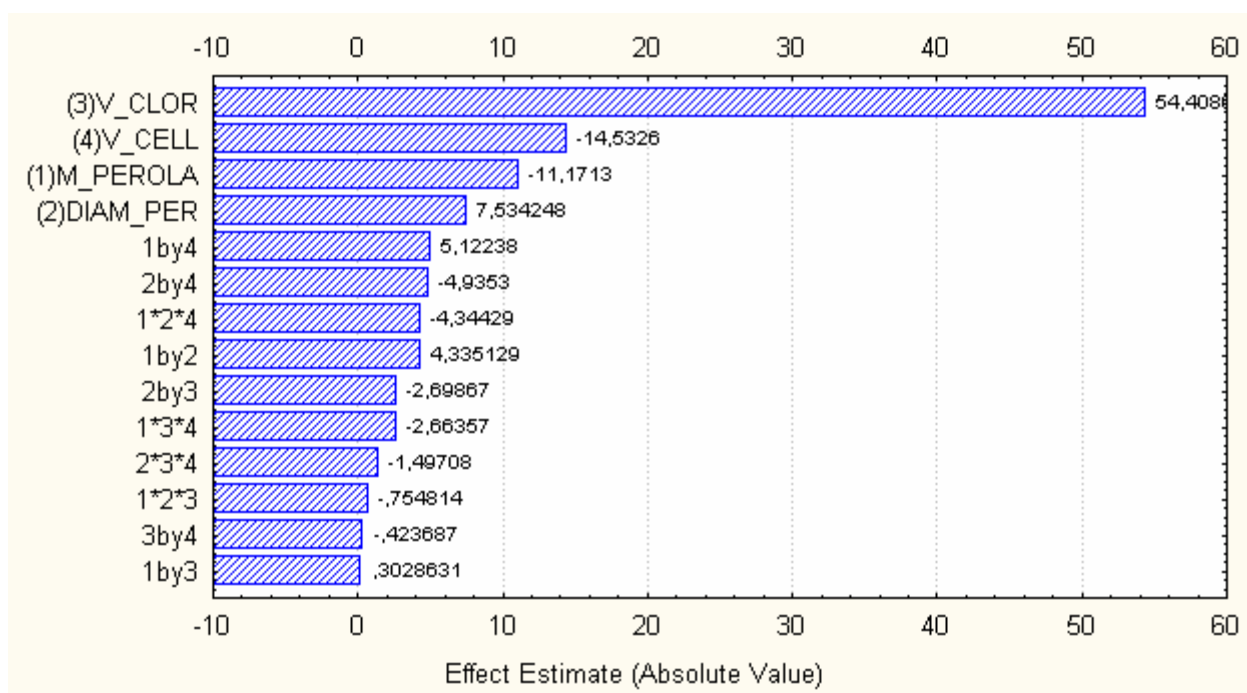


Figura 3.3: Análise estatística demonstrando a influência sobre os parâmetros volume de clorofórmio, volume de suspensão celular, massa de pérola e diâmetro das pérolas.

Observou-se claramente que das variáveis testadas, o volume de clorofórmio foi a de maior influência sobre o rendimento da extração de P(3HB). Quando o volume do clorofórmio passou do nível inferior (0,5 mL) para o nível superior (1 mL), o aumento do rendimento de extração de P(3HB) foi de 54,41 %.

Porém, o volume da suspensão celular, a massa de pérolas e o diâmetro das pérolas também foram significativos. O rendimento de extração do P(3HB) foi reduzido cerca de 14,53 e 11,17% com o aumento do volume de suspensão celular (4 mL) e massa de pérolas (1,25 g), respectivamente. Isto pode ser atribuído ao fato de que quando se trabalha com uma concentração muito alta de biomassa e, conseqüentemente uma concentração mais alta de polímero, ainda que sejam utilizadas mais pérolas proporcionando o rompimento celular, a capacidade de solubilização do clorofórmio atinge sua saturação tornando a solução polimérica muito viscosa, o que dificulta sua retirada do tubo. Além disso, analisando o parâmetro “massa de pérolas” isoladamente no nível superior, é possível supor que ocorre diminuição da mobilidade das pérolas e conseqüentemente, sua ação sobre as células.

Em relação a variável “diâmetro das pérolas”, quando esta passou do nível inferior (0,5 mm) para o superior (0,75 mm), houve um aumento na concentração de P(3HB) de 7,53%, demonstrando que, neste estudo, o rompimento celular não dependeu exclusivamente da quantidade de pérolas utilizada, mas também do diâmetro selecionado.

Considerando que as quatro variáveis testadas, foram significativas no processo, foi explorado o gráfico de superfície de resposta, avaliando o efeito dos parâmetros sobre o rendimento de extração.

O gráfico de superfície da Figura 3.4 demonstra a influência do diâmetro das pérolas e do volume de suspensão celular sobre o rendimento de extração de P(3HB). Observa-se que o rendimento de extração de P(3HB) foi cerca de 70% quando as pérolas de vidro passaram do nível inferior (0,5 mm) para o superior (0,75 mm), mantendo a suspensão celular no nível inferior (2 mL).

No gráfico da Figura 3.5, está demonstrada a influência entre as variáveis volume de suspensão celular e massa de pérolas sobre o rendimento de extração de P(3HB). Verificou-se que, mantendo o volume de suspensão celular e a massa de pérolas no nível inferior, (2 mL) e (0,7 g) respectivamente, o rendimento de extração de P(3HB) foi cerca de 60%.

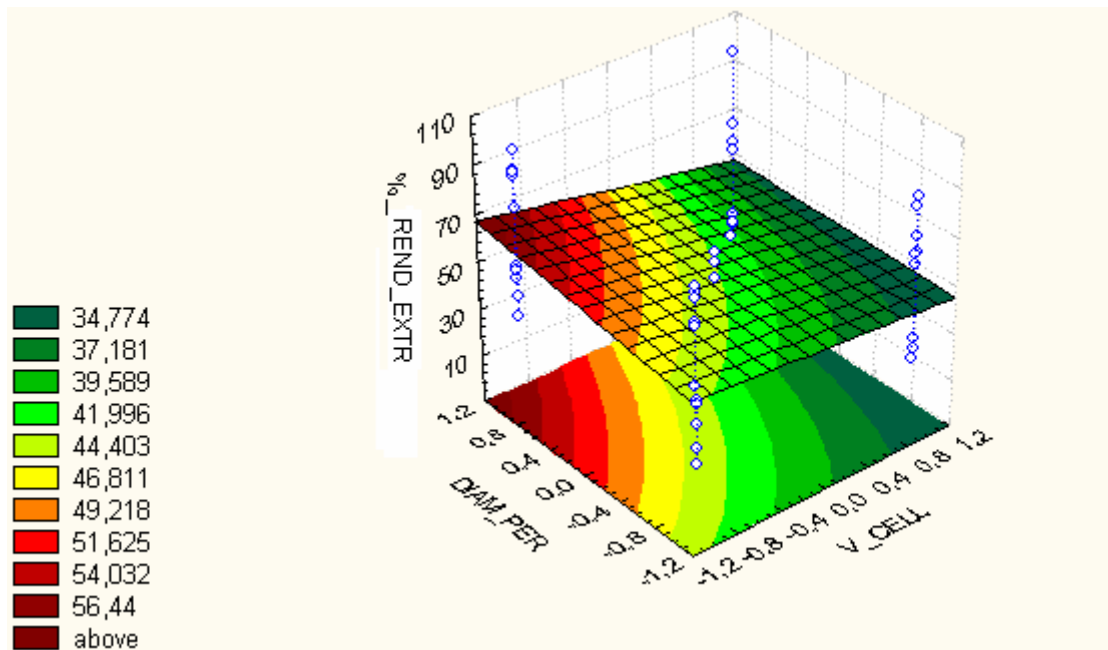


Figura 3.4: Gráfico de superfície demonstrando a interação entre diâmetro das pérolas e de suspensão celular sobre o rendimento de extração de P(3HB).

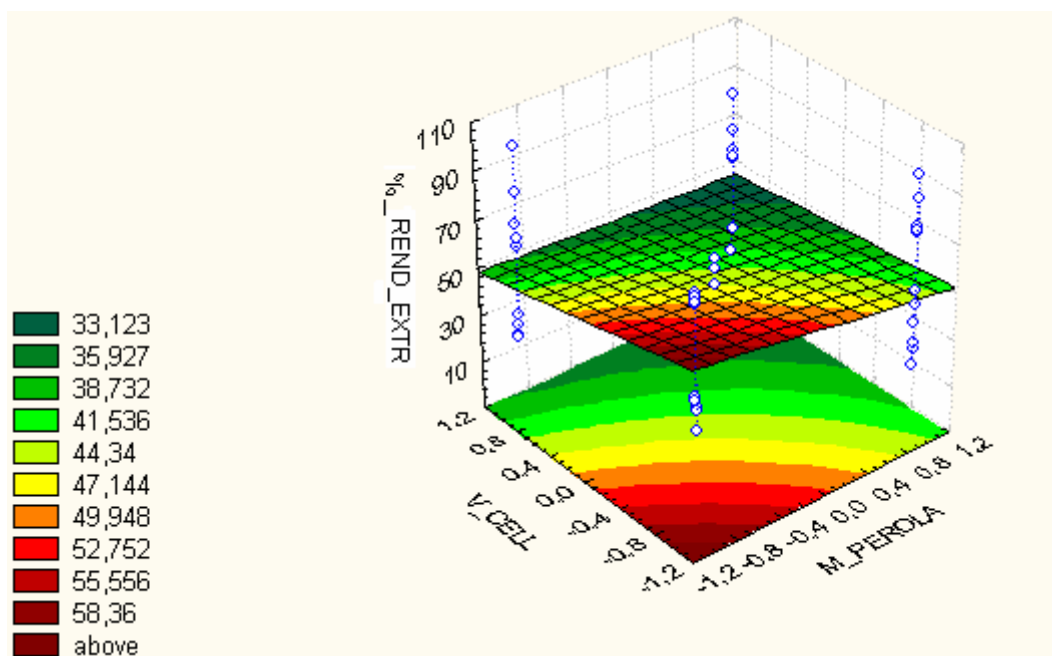


Figura 3.5: Gráfico de superfície demonstrando a interação entre volume de suspensão celular e massa das pérolas sobre o rendimento de extração de P(3HB).

Ao comparar as variáveis diâmetro das pérolas com volume de clorofórmio (Figura 3.6), observou-se que mantendo o volume de clorofórmio no nível superior (1 mL), a influência do diâmetro das pérolas foi mínima confirmando o baixo rendimento de extração quando o diâmetro das pérolas passa do nível inferior (0,5 mm) para o nível superior (0,75 mm). Constatou-se ainda, que a interação de ambas no nível superior gerou um rendimento de extração do P(3HB) cerca de 80 %.

Porém, o melhor rendimento de extração foi encontrado quando os parâmetros “volume de clorofórmio” e “volume da suspensão celular” foram avaliados (Figura 3.7). Foi verificado um rendimento de extração do P(3HB) de cerca de 90% mantendo o volume de clorofórmio no nível superior (1 mL) e a suspensão celular no nível inferior (2 mL).

Todavia, com o volume de clorofórmio no nível superior aliado ao volume de células também no nível superior, verificou-se uma redução no rendimento de aproximadamente 14 %, demonstrando a possibilidade do consumo de apenas a metade do volume de solvente neste caso.

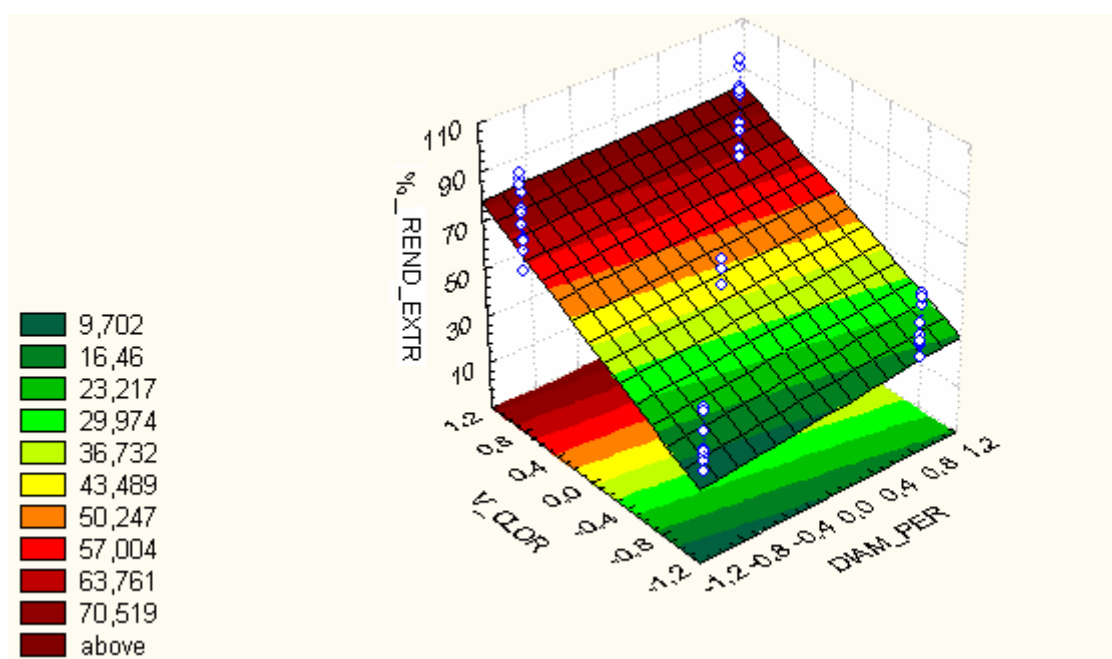


Figura 3.6: Gráfico de superfície demonstrando a interação entre o volume de clorofórmio e o diâmetro das pérolas sobre o rendimento de extração de P(3HB).

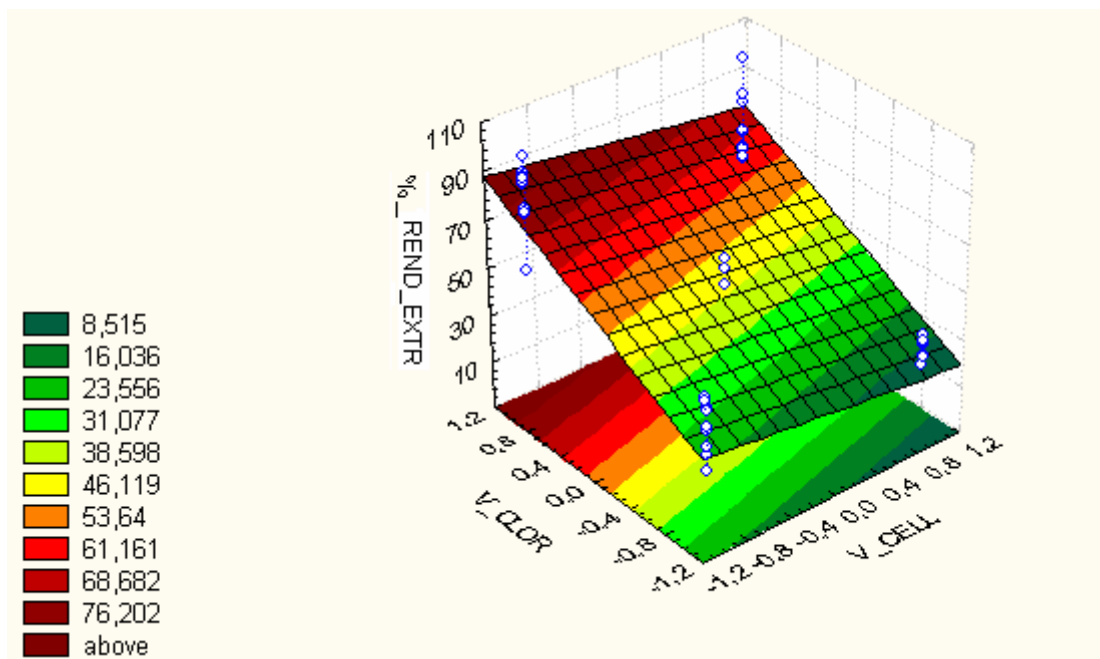


Figura 3.7: Gráfico de superfície demonstrando a interação entre o volume de clorofórmio e o volume de suspensão celular sobre o rendimento de extração de P(3HB).

Assim, a melhor condição encontrada por este planejamento fatorial para a extração de P(3HB) por método mecânico foi a utilização da menor massa de pérolas (0,7 g), com maior diâmetro (0,75 mm), maior volume de clorofórmio (1 mL) e menor volume de suspensão celular (2 mL), sendo esta condição adotada para os demais experimentos.

3.4 Estratégias para manutenção da biomassa para utilização no método de extração mecânico

Após o cultivo, a biomassa contendo P(3HB) é normalmente liofilizada (CHEN *et al.*, 2001b), para posterior processo de extração. Com o intuito de minimizar o custo com energia para esta operação, que deve ser considerado para a produção industrial, optou-se ainda nesse trabalho, por testar a melhor condição obtida do planejamento fatorial utilizando uma biomassa úmida (obtida logo após o processo de cultivo), liofilizada e congelada.

Assim, após o cultivo, a biomassa foi concentrada por centrifugação, lavada duas vezes com água destilada e após, uma pequena quantidade foi congelada e outra liofilizada para

posterior extração do P(3HB). Uma outra porção foi diretamente submetida à extração logo após a centrifugação e lavagem das células, sem nenhum processo de manutenção.

Para esse experimento, foi analisado além do rendimento da extração, o grau de pureza das amostras que foi comparado ao P(3HB) comercial (*Aldrich* 36,350-2). As amostras extraídas foram submetidas à técnica de metanólise (BRAUNEGG *et al.*, 1978), e os metil ésteres detectados por CG refletem o grau de pureza do P(3HB) extraído. O percentual do composto foi calculado pelo método de normalização de área (KHOSRAVI-DARANI *et al.*, 2004; CHOI & LEE, 1999). Na tabela 3.4 podem ser observadas as diferenças entre o rendimento de extração e grau de pureza do P(3HB) para cada procedimento testado.

Tabela 3.4: Efeito das diferentes estratégias de manutenção sobre o rendimento de extração e pureza do P(3HB).

Estratégia de manutenção	Rendimento de extração (%)*	Erro padrão	Pureza (%)*	Erro padrão
Biomassa congelada	98,91	0,94	89,28	0,33
Biomassa liofilizada	94,93	**	89,21	**
Biomassa úmida	94,33	1,95	91,90	0,02

*Média entre as duplicatas. **Duplicata perdida

Com os resultados obtidos, verificou-se que a estratégia de congelamento da biomassa antes do processo de extração foi benéfica para a extração do polímero, apresentado um rendimento de extração cerca de 4 %, superior em relação à biomassa liofilizada e úmida que atingiram o mesmo rendimento. Isso pode ser explicado devido ao fato de que o congelamento da biomassa ocorreu de forma lenta a -20 °C, o que proporcionou a formação de cristais de gelo grandes no interior da célula, fragilizando a membrana e a parede celular, e com isso promovendo extravasamento do conteúdo intracelular.

Considerando o método de normalização das áreas, o P(3HB) da *Aldrich* teve um grau de pureza de 94%. Verificou-se que quando utilizado o método mecânico, o grau de pureza da biomassa liofilizada e da biomassa congelada foram muito semelhantes, atingindo cerca de 89%. No entanto, destacou-se a estratégia da utilização da biomassa logo após o cultivo, que atingiu um grau de pureza cerca de 92%.

Chen *et al.* (2001b), também preocupados com o consumo energético no processo de liofilização para extração de P(3HB) de *C. necator*, fizeram um estudo comparando estratégias de manutenção da biomassa. Eles utilizaram estratégias como liofilização, secagem em estufa à 60°C e biomassa úmida. Após o processo de extração do P(3HB), por

um método químico, com uma solução aquosa de surfactante (betaina) e quelante (EDTA), eles observaram que a ruptura celular foi significativamente diferente quando diferentes estratégias de manutenção das células foram utilizadas, sendo que para a biomassa liofilizada a ruptura foi muito mais eficiente do que para a biomassa úmida. Com a técnica de extração utilizada, foi encontrado um rendimento de extração de 93,3 % e grau de pureza de 98,7 %, já para a biomassa úmida, não foi possível determinar o rendimento de extração e a pureza foi de 87,4 %.

Khosravi-Darani *et al.* (2004), estudaram um processo de extração de P(3HB) da bactéria *C. necator*, utilizando fluido supercrítico. Visando atingir o máximo rendimento com mínimo consumo energético, foi realizado um estudo comparativo entre as estratégias de secagem a 60 °C da biomassa, liofilização e biomassa úmida. Eles observaram que tanto o grau de pureza quanto a massa molar foram mais altos na biomassa liofilizada, como também encontrado por Chen *et al.* (2001b), porém, o melhor rendimento de extração do P(3HB) foi encontrado para a biomassa úmida, embora neste caso o grau de pureza tenha sido o menor dos três ensaios. Segundo os autores, uma possível explicação para este resultado é que as células secas são menores e mais globulares que as células úmidas, tornando-se mais resistentes à ruptura por força mecânica.

Considerando que a diferença entre os métodos de manutenção (congelamento e liofilização) foi de 4%, a escolha do processo poderá ser feita em função da rotina de operação e escala do processo de produção e extração do P(3HB).

3.5 Extração pelo método mecânico adaptado utilizando temperatura

Foi adicionada ainda, uma etapa de aquecimento no método de extração, buscando avaliar o efeito das diferentes temperaturas e visando a otimização do processo de extração de P(3HB). Para tanto, foi selecionada a melhor condição obtida a partir do planejamento fatorial e testou-se a aplicação das temperaturas de 40°C, 50°C e 60°C, antes e depois do processo de rompimento celular no moinho de bolas, sendo as amostras incubadas durante 15, 30 e 60 minutos.

A Figura 3.8 apresenta o percentual do rendimento de extração de P(3HB), em função do tempo de tratamento nas diferentes temperaturas, com a incubação da amostra antes do

processo de extração com o método mecânico. O tempo zero de tratamento refere-se ao rendimento atingido em temperatura ambiente.

Observou-se, nesse caso, que a melhor temperatura de trabalho foi 40°C, sendo que, com apenas 15 minutos de tratamento obteve-se o máximo rendimento (91%). No entanto, para todos os casos, o rendimento decaiu com a permanência da amostra no sistema.

Hejazi *et al.* (2003), estudaram um processo de extração supercrítica de P(3HB) de *C. necator*, também observaram que o rendimento de extração era afetado pelo aumento da temperatura, fato que foi atribuído ao rompimento da membrana celular antes da parede celular, o que gera um encolhimento da parede celular impedindo a saída do polímero difuso em seu interior.

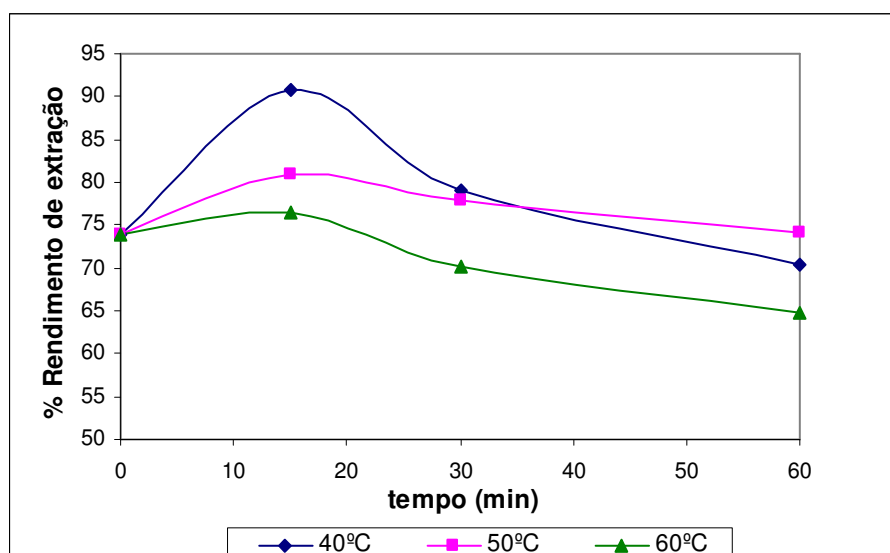


Figura 3.8: Efeito do tempo de tratamento com temperatura antes do processo de extração no moinho de bolas sobre o rendimento do processo de extração do P(3HB).

Nestes ensaios, também foi analisado o efeito da temperatura sobre o grau de pureza das amostras, (Figura 3.9). Observou-se que as três temperaturas testadas apresentaram influência positiva sobre o grau de pureza logo nos primeiros 15 minutos, elevando o grau de pureza do P(3HB) em cerca de 2%. Após este tempo, a permanência das amostras no sistema implicou somente em maiores gastos com energia.

Na temperatura de 40°C o grau de pureza máximo (92,77 %) foi atingido já nos primeiros 15 minutos, sofrendo leve decréscimo com o tempo de permanência da amostra no sistema. Para a temperatura de 50°C, houve um leve incremento no grau de pureza com o tempo, atingindo um valor máximo de 93,21%. No entanto, a temperatura de 60°C,

novamente mostrou efeito adverso, elevando o grau de pureza nos primeiros 15 minutos, reduzindo após 30 min e voltando a elevar decorridos 60 min, atingindo um valor máximo de 93,42%. Esses valores são comparáveis aos encontrados por Hanh *et al.* (1994), quanto estudava a extração de P(3HB) da bactéria *C. necator* utilizando somente tratamento com solução de hipoclorito de sódio.

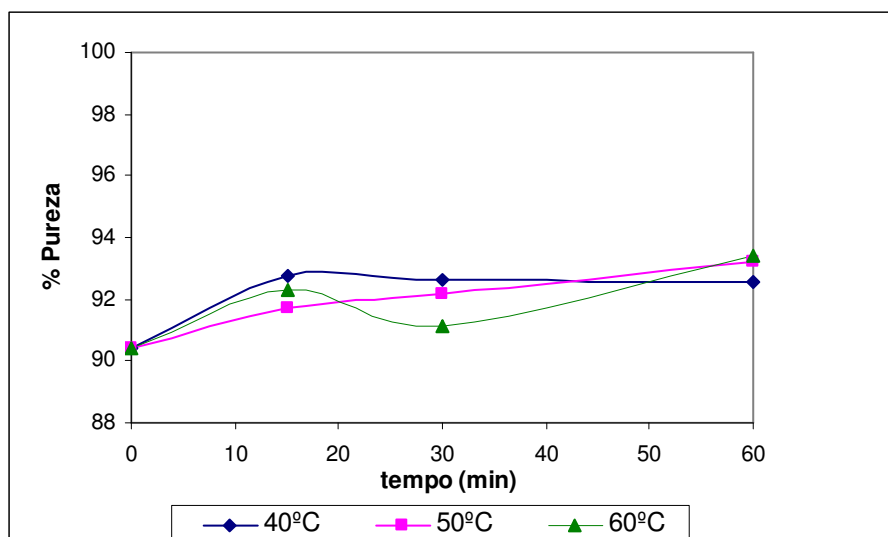


Figura 3.9: Efeito do tempo de tratamento com temperatura antes do processo de extração no moinho de bolas sobre o % de pureza do P(3HB).

Nas Figuras 3.10 e 3.11 foram observados os efeitos das diferentes temperaturas sobre o rendimento de extração e grau de pureza do P(3HB), com a incubação da amostra depois do processo de extração com o método mecânico.

Na Figura 3.10, pode-se observar que a estratégia de utilização de temperatura após o processo de extração não exerceu uma influencia expressiva sobre o rendimento de extração, obtendo um rendimento máximo de 78,82% com 30 minutos de tratamento térmico à 40°C e 77,10% à 50°C com o mesmo tempo, porém este não compensa o gasto energético no processo. O rendimento de extração obtido na temperatura de 50°C, manteve-se, praticamente constante, enquanto nas temperaturas de 40 e 60°C houve uma queda nos primeiros 15 minutos, elevando-se principalmente na temperatura de 40°C e voltando a cair decorridos 60 minutos.

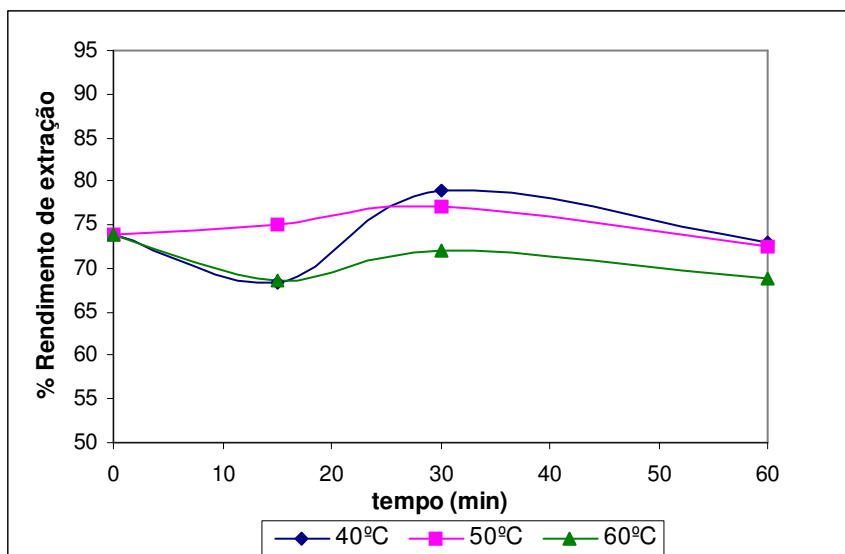


Figura 3.10: Efeito do tempo de tratamento com temperatura após o processo de extração no moinho de bolas sobre o rendimento do processo de extração do P(3HB).

Enquanto ao grau de pureza, explorado na figura 3.11, observou-se que todas as temperaturas exerceram efeito positivo nos primeiros 15 minutos. Porém, com o aumento do tempo de permanência da amostra no sistema, o grau de pureza foi reduzido em todos os casos, tendo sido a temperatura de 50 °C a mais eficiente nesse caso.

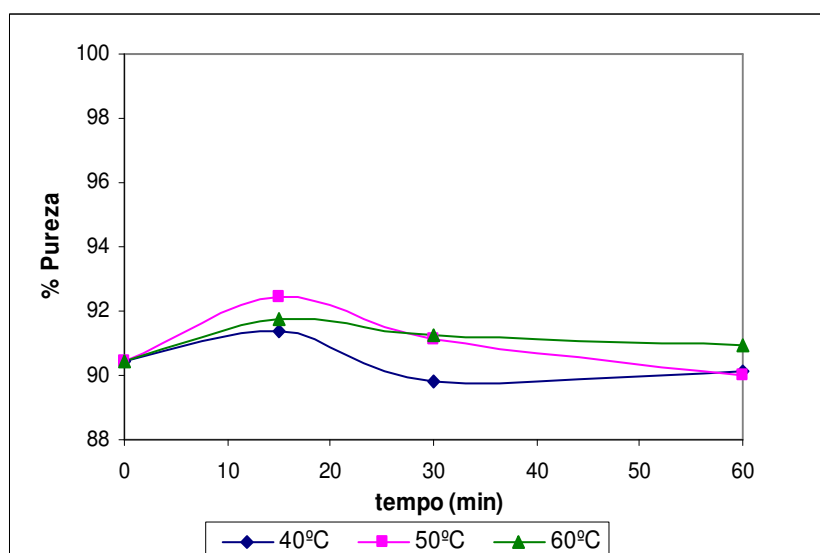


Figura 3.11: Efeito do tempo de tratamento com temperatura após o processo de extração no moinho de bolas sobre o % de pureza do P(3HB).

Como resultado, a manutenção das células na temperatura de 40°C no processo de extração (anterior ao rompimento celular), foi selecionada como ótima por incrementar o rendimento de extração em 23% e o grau de pureza em 3% do P(3HB) com apenas 15 minutos de incubação. Porém, constatou-se um efeito pouco representativo quando o tratamento térmico foi aplicado após o rompimento celular, isso indica que a elevação da temperatura exerceu uma ação entre as células (parede e membrana celular) de foram a torná-la mais suscetível a ação das pérolas de vidro para a promoção do rompimento celular.

Esses resultados demonstram que o uso da temperatura antes do rompimento celular, embora implique em uma etapa a mais no processo, tem grande importância sobre a eficiência e a pureza do produto final.

3.6 Comparação entre os métodos de extração mecânico e químico

Após a síntese do polímero a partir do cultivo de *C. necator* em shaker, o P(3HB) acumulado no interior das células foi extraído pelo método mecânico proposto (moinho de bolas) e comparado ao método químico de Hahn *et al* (1994) (dispersão de hipoclorito de sódio e clorofórmio), amplamente utilizado (HAHN, 1995; SQUIO, 2003; FORMOLO, 2003), desenvolvido por Hahn *et al.* (1994).

A dificuldade de extração do P(3HB), utilizando métodos químicos, constitui o primeiro obstáculo técnico à exploração comercial em função de sua elevada viscosidade. De acordo com Hanh *et al.* (1994) e Chen *et al.* (1999), a solução polimérica formada contém mais de 5% (m/v) de P(3HB) quando a técnica de extração química é utilizada.

A Tabela 3.5 apresenta os resultados obtidos após a extração pelos métodos mecânico e químico.

Tabela 3.5: Comparação entre os métodos de extração químico e mecânico.

	Método Químico	Método Mecânico
P(3HB) no interior das células (g/L)	11,86	11,86
P(3HB) após a extração (g/L)	7,03	7,59
Rendimento de Extração (%)	59,25	64,13
Grau de Pureza (%)	90,42	89,28

As células mantidas por congelamento após o cultivo em biorreator, foram submetidas à extração do P(3HB) utilizando dispersão de hipoclorito de sódio e clorofórmio, obtendo-se uma concentração de 7,03 g/L, o que significou um rendimento de extração de 59%, enquanto a extração com o método mecânico obteve um rendimento 5% superior, sendo o grau de pureza muito próximo (1,14%).

Em seu trabalho, Hanh *et al.* (1994), demonstraram um grau de pureza de 97% e um rendimento de extração de 91%. Porém, esses resultados não puderam ser comparados nesse trabalho devido à falta de reprodutibilidade da técnica. Assim, optou-se pela comparação entre os resultados obtidos neste estudo utilizando os métodos de extração mecânico e químico baseado em Hanh *et al.* (1994).

Choi & Lee (1999), buscaram um processo mais simples e econômico para a extração do P(3HB) de *E. coli*, tendo como principal vantagem a fragilidade deste organismo quando mutado para a produção de P(3HB). Vários ácidos, bases e surfactantes foram testados devido a sua habilidade em digerir material celular não-P(3HB). Eles observaram que o NaOH e KOH digeriram de maneira mais eficiente o material celular não-P(3HB) tendo como resultado um polímero com grau de pureza e rendimento de extração superiores a 90%, enquanto os ácidos foram considerados ineficientes para extração de P(3HB) de *E. coli*. Porém, quando as células foram tratadas com dodecil sulfato de sódio (SDS) o P(3HB) foi extraído com grau de pureza de 97,8%, mas com um rendimento de extração de 87,35%. Assim, eles optaram pelo uso das bases, que embora formem um P(3HB) com menor grau de pureza, apresentam maior rendimento de extração, são mais baratas e menos poluentes que o SDS.

Chen *et al.* (1999) estudaram um processo de extração utilizando uma solução aquosa de surfactante (betaína) e quelante (EDTA) e observaram o efeito da concentração do surfactante e do quelante, temperatura, pH e tempo de tratamento sobre o grau de pureza e rendimento de extração do P(3HB), alcançando um grau de pureza de 98,7% e um rendimento de extração de 93,3%. Porém, concluíram que altos valores de temperatura (além de 50 °C) e pH (acima de 13), embora confirmem alto grau de pureza e rendimento de extração, causam sérias degradações na massa molar do P(3HB).

No caso do método mecânico de extração, utilizando moinho de bolas, o atrito das células com as pérolas de vidro leva à lise celular, liberando o polímero para a fase líquida (clorofórmio), na qual este é solubilizado. Esse método pode ser considerado menos poluente, pois utiliza menor volume de solvente, e conseqüentemente a um custo mais baixo.

3.7 Considerações finais

Os resultados obtidos a partir do planejamento fatorial permitiram a seleção da melhor condição para realização do método mecânico de extração de P(3HB) proposto. Porém, demonstraram ainda a dependência do clorofórmio no processo, a despeito de ser um método mecânico de ruptura celular. Esta dependência pode ser explicada em função do P(3HB) ser uma substância hidrofóbica e, portanto ser solúvel apenas em solventes orgânicos. A manutenção da temperatura em 40°C por 15 minutos, anterior ao rompimento celular, melhora não só o rendimento como também o grau de pureza do polímero obtido.

Considerando o intuito de propor um método de extração de baixo custo, é importante ressaltar que para a aplicação deste método não é necessário um acondicionamento prévio das células, contudo, caso seja necessário acondicioná-las, o congelamento mostrou ser uma forma adequada, tradicionalmente, para os métodos químicos de extração, as células são liofilizadas, o que encarece o processo de extração.

Através do uso do método de extração mecânico, embora se tenha obtido um rendimento cerca de 5% superior ao método químico de extração, obteve-se o mesmo grau de pureza, oferecendo ainda a possibilidade de extração logo após o cultivo, descartando a necessidade de liofilização das células. Além disso, o tempo necessário para a extração pode ser reduzido em 58%, tornando o método proposto atrativo economicamente.

CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE P(3HB) OBTIDOS POR *Cupriavius necator*

De acordo com Nascimento (2001), dentre as várias etapas do processo de produção do P(3HB), destacam-se o cultivo, como um dos responsáveis pela massa molar final do polímero obtido e a etapa de extração, que influencia nas propriedades do produto final, sendo esta última crítica para a processabilidade do material, uma vez que determina o grau de pureza do polímero obtido. Assim, neste capítulo, buscou-se avaliar as propriedades de filmes de P(3HB), obtidos do cultivo em biorreator e extraídos pelo método mecânico adaptado e método químico, com e sem a etapa de purificação.

Os filmes poliméricos foram caracterizados pelas técnicas de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difratometria de raios-X (DRX), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TGA) e cromatografia de permeação em gel (GPC).

4.1 Influência da etapa de purificação sobre as características dos filmes de P(3HB) obtidos pelos métodos mecânico e químico.

4.1.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR para os polímeros extraídos pelos diferentes métodos, purificados e não purificados são mostrados na Figura 4.1, onde foram observados os picos característicos do P(3HB): deformações axiais simétrica e assimétrica da ligação C-H em 2930 e 2988 cm^{-1} ; deformações axiais da carbonila (C=O) em 1721 cm^{-1} , pico atribuído à vibração da carbonila do grupo éster no estado cristalino (XU *et al.*, 2002); deformação angular simétrica no plano dos grupos CH_3 em 1382 cm^{-1} . Estes picos também foram observadas por (DUARTE, 2004), (VOGELSANGER *et al.*, 2003b) e (XU *et al.*, 2002).

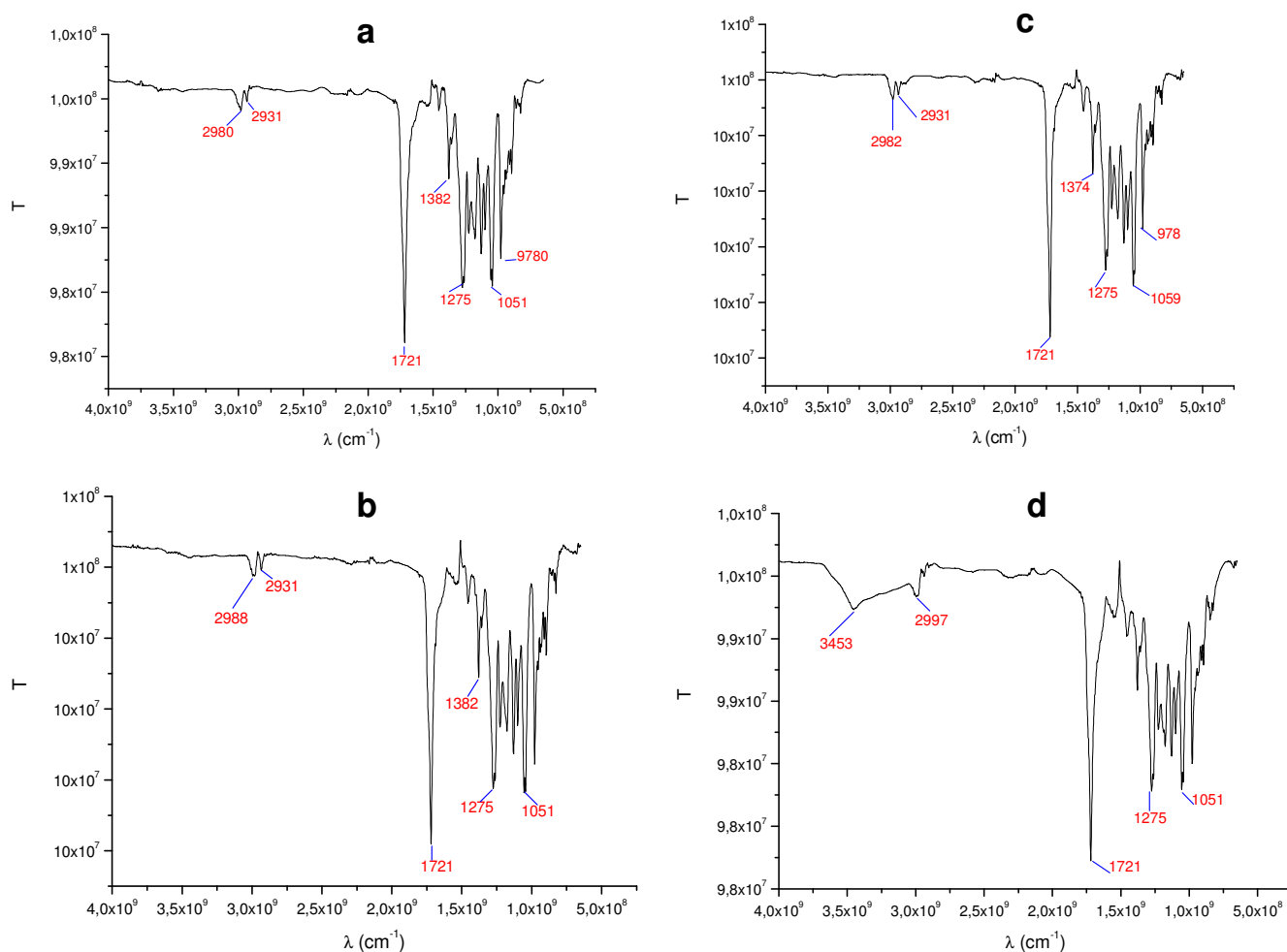


Figura 4.1: Espectros de FTIR para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico e mecânico com e sem a etapa de purificação: a) mecânico purificado; b) químico purificado; c) mecânico não-purificado; d) químico não-purificado.

Foram observados ainda picos em 1275 e 1051 cm^{-1} , atribuídos aos estiramentos simétricos e assimétricos, respectivamente, do grupo C-O-C. Galego *et al.* (2000), observaram os picos característicos da ligação C-O-C na faixa de 1.228 cm^{-1} a 1.279 cm^{-1} .

Porém, na amostra obtida pelo método de extração químico sem a etapa de purificação (Figura 4.1 d), observou-se ainda uma banda larga em 3453 cm^{-1} , devido provavelmente à solução aquosa de hipoclorito utilizada neste método de extração, que não foi observada após a purificação (Figura 4.1 b). Camargo (2003), também observou um pico em 3443 cm^{-1} , em uma amostra da PHBV obtido da PHB Industrial, o qual foi atribuído ao estiramento OH, indicando a presença de umidade no material.

Na Tabela 4.1 podem ser observadas as bandas características para o P(3HB) no espectro de Infravermelho.

Tabela 4.1: Bandas características no espectro de Infravermelho para o P(3HB) obtido pelas diferentes técnicas de extração, comparadas com a literatura.

Atribuições	λ (cm^{-1}) P(3HB) obtido	λ (cm^{-1}) literatura
Deformação axial da carbonila (C=O)	1721	1724 (XU <i>et al.</i> , 2002)
Deformação angular simétrica no plano dos grupos CH_3	1382	1380 (XU <i>et al.</i> , 2002)
Estiramento assimétrico e simétrico do grupo C-O-C	1275 e 1051	1186 e 1133 (XU <i>et al.</i> , 2002) 1279 e 1228 (GALEGO <i>et al.</i> , 2000)

Todos os picos característicos foram observados nas quatro amostras, demonstrando que o polímero produzido é realmente o P(3HB).

4.1.2 Difratomia de raios-X (DRX)

Os perfis de difração de raios-X para os polímeros extraídos pelos diferentes métodos, purificados e não purificados são mostrados na Figura 4.2. Como pode ser observado, os difratogramas apresentaram picos de difração em 2θ igual a 13,5° (reflexão 020); 17° (reflexão 110); 20° (reflexão 021); 22° (reflexão 101); 25° (reflexão 121); 27°

(reflexão 040) e 31° (reflexão 002), típicos do polímero P(3HB) semicristalino, similar ao P(3HB) mostrado por Duarte (2004) e Schneider (2006).

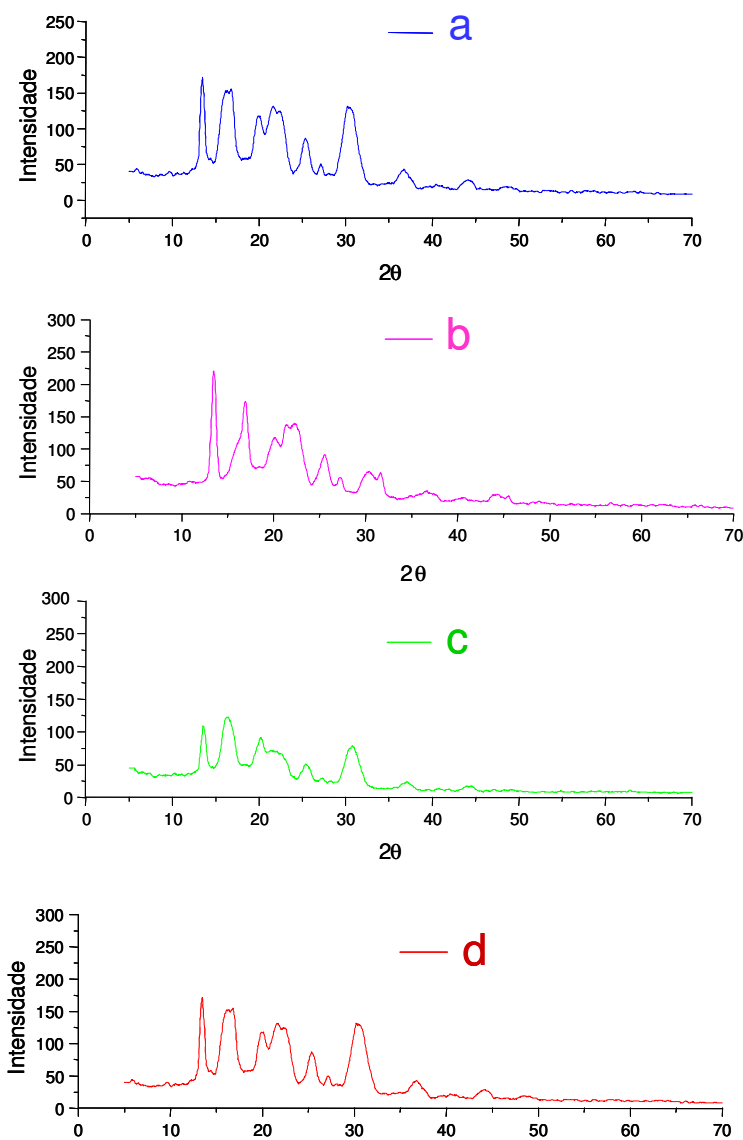


Figura 4.2: Difratomogramas de raios-X para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico e mecânico com e sem a etapa de purificação: a) mecânico purificado; b) químico purificado; c) mecânico não-purificado; d) químico não-purificado.

Tabela 4.2: Grau de cristalinidade dos filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico e mecânico com e sem a etapa de purificação, determinados por difração de raios-X.

P(3HB)	Grau de cristalinidade (%)
Mecânico purificado	60,03
Químico purificado	61,66
Químico não-purificado	58,30
Mecânico não-purificado	60,40

Pode-se observar, de acordo com a Tabela 4.2, que os valores variaram entre 58% e 61%, o que representa uma variação muito menor que 5%. Foi constatado apenas um aumento no grau de cristalinidade de 3,36% para a amostra obtida pelo método químico após a etapa de purificação em relação a amostra não purificada. De acordo com Hahn *et al.* (1994), o grau de cristalinidade do P(3HB) extraído pelo método de dispersão de hipoclorito de sódio e clorofórmio, devido à recristalização ocorrida pela precipitação em não solvente (hipoclorito de sódio, no caso), e ainda, o fato de que a própria técnica de purificação envolve a solubilização em clorofórmio e precipitação em não solvente (*n*-hexano), isso deve ter contribuído fortemente para o alto grau de cristalinidade desta amostra.

4.1.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica que detecta alterações físicas ou químicas, em um sistema polimérico, que são acompanhadas pela troca de calor (LIMA, 2004). Quando a amostra é aquecida, várias transformações ocorrem envolvendo absorção (processo endotérmico) ou liberação de calor (processo exotérmico). A partir desta técnica podem ser obtidos os dados de: temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de cristalização (T_c), entalpia de cristalização (ΔH_c), temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m), grau de cristalinidade (α_c) entre outros.

É importante salientar, que quando os polímeros são submetidos a um segundo aquecimento após a etapa de fusão e com resfriamento lento e controlado, a história térmica destes é apagada, sendo possível fazer comparações entre as amostras, pois todas passaram pelo mesmo tratamento térmico. Assim, o 2º aquecimento também foi realizado para visualizar a T_g , difícil de determinar no primeiro aquecimento devido à alta cristalinidade do P(3HB). A T_m , a ΔH_m e conseqüentemente, o α_c foram determinados a partir do 1º aquecimento, pois refletem os valores reais das amostras.

A Figura 4.3 demonstra as curvas de DSC dos filmes de P(3HB) extraídos pelos diferentes métodos, purificados e não purificados, referentes ao 1º e 2º aquecimentos, respectivamente.

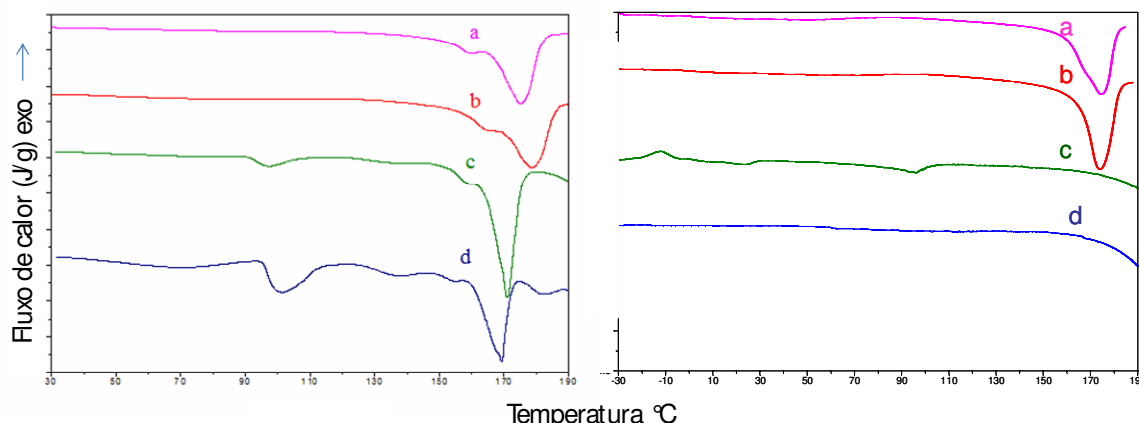


Figura 4.3: Curvas de DSC (1º e 2º aquecimento) para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico e mecânico com e sem a etapa de purificação: a) mecânico purificado; b) químico purificado; c) químico não-purificado; d) mecânico não-purificado.

As curvas de DSC para ambas as amostras purificadas foram muito similares e o mesmo perfil também foi observado para as amostras não purificadas.

As principais alterações observadas na Figura 4.3 referentes ao 1º aquecimento foram: uma diminuição da temperatura de fusão e a presença de picos de fusão adicionais em temperaturas mais baixas para as amostras não purificadas. Esses resultados evidenciam a presença de impurezas, mostrando a necessidade da etapa de purificação. Os valores de T_m encontrados para os filmes de P(3HB) purificados extraídos pelos métodos mecânico e químico foram 175 e 178°C, respectivamente. Segundo Lima (1992), a T_m do P(3HB) geralmente oscila entre 170 e 180°C. Embora os valores de T_m encontrados para os filmes não purificados extraídos pelos métodos mecânico e químico tenham sido respectivamente 169 e 171°C, estes continuam dentro da faixa esperada para o P(3HB).

No segundo aquecimento também foi verificado que as curvas de DSC das amostras purificadas são similares entre si, assim como das amostras não purificadas. Ainda na Figura 4.3, a principal alteração entre as quatro amostras observada referente ao 2º aquecimento foi o deslocamento dos picos de fusão para temperaturas bem inferiores (96°C) para ambas as amostras não purificadas. O α_c do filme extraído pelo método mecânico foi bem inferior ao α_c do filme extraído pelo método químico, mostrando a mesma tendência observada no primeiro aquecimento, enquanto não foi possível determinar o α_c para os filmes não purificados extraídos por ambos os métodos.

Os dados de T_m , ΔH_m e α_c determinados a partir do 1º aquecimento das curvas de DSC, bem como os dados de T_g , T_m , ΔH_m e α_c , determinados a partir do 2º aquecimento, estão relacionados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Dados de temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (α_c) determinados a partir das curvas de DSC (1º aquec.); temperatura de transição vítrea (T_g), T_m , ΔH_m e grau de cristalinidade (α_c) (2º aquec.) para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico e mecânico com e sem a etapa de purificação.

P(3HB)	1º aquecimento			2º aquecimento			
	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	α_c (%)	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	α_c (%)
mecânico purificado	175	87	61	-14	174	84	62
químico purificado	178	98	65	*	173	99	66
químico não-purificado	171	85	56	-14	*	*	*
mecânico não-purificado	169	51	36	*	*	*	*

* não foi possível detectar

Só foi possível observar a T_g em cerca de -14°C para os filmes extraídos pelo método mecânico purificado e químico não purificado. Estes resultados mostram que as T_g s encontradas foram mais baixas que os valores geralmente reportados na literatura, pois de acordo com Anderson & Dawes (1990), a T_g do P(3HB) varia de -5°C a 5°C . Não foi possível determinar a T_g para o filme extraído pelo método químico purificado, devido à sua maior cristalinidade em relação aos demais.

Para os filmes extraídos pelo método mecânico o α_c passou de 36 para 61% mostrando um incremento de 25% com etapa de purificação, fato não observado pela técnica de DRX (item 4.1.2). Entretanto, ressalta-se que para o cálculo do grau de cristalinidade do filme extraído pelo método mecânico não purificado foi levado em consideração somente a entalpia de fusão do pico em 169°C , descartando as entalpias de fusão dos outros 3 picos observados no DSC, atribuídos a impurezas, o que explica a baixa cristalinidade desta amostra. Para os filmes extraídos pelo método químico o α_c passou de 56 para 65%, com incremento de 9%, este resultado está de acordo com o obtido por DRX, porém com incremento de somente 3%. O cálculo do grau de cristalinidade para o filme extraído pelo método químico não purificado também não levou em consideração a entalpia de fusão do pico em 97°C . Entretanto, comparando-se o α_c dos polímeros extraídos por ambos os métodos sem a etapa de

purificação, o α_c do filme extraído pelo método químico foi bem superior, devido ao fato deste ter apresentado uma quantidade menor de impurezas.

Observou-se que os filmes purificados apresentaram α_c mais elevado em relação aos filmes não purificados, independentemente do método de extração. Isso também foi observado por Hahn *et al.* (1994), quando compararam dois métodos químicos de extração, um somente com hipoclorito de sódio e outro utilizando a dispersão de hipoclorito de sódio e clorofórmio. Os autores não encontraram diferenças entre as temperaturas de fusão, sendo ambas em 176°C, porém, observaram que para o método com dispersão de hipoclorito de sódio a entalpia de fusão foi incrementada, o que foi atribuído ao fato de que, nesse processo o P(3HB) primeiro passa para a fase do clorofórmio e depois é recristalizado através de precipitação em não solvente, enquanto na extração somente com hipoclorito de sódio, os grânulos de P(3HB) são liberados da célula na forma crua, não passando pela recristalização.

Segundo Doi & Sudesh (2000 *apud* LIMA, 2004), o P(3HB) apresenta alta cristalinidade, variando na faixa de 55 a 80 %. A análise por microscópica óptica do polímero, realizada por eles, mostrou a formação de grandes esferulitos, indicando cinética com baixa taxa de nucleação, formando poucos cristais de maior tamanho, fator responsável pela característica quebradiça do P(3HB) com baixa taxa de degradação em relação aos polímeros com menor grau de cristalinidade. É importante lembrar também que os filmes foram preparados por evaporação de solvente e, de acordo com Lima (2004), esta condição garante a cristalização máxima do P(3HB).

4.1.4 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) é uma ferramenta utilizada para medir variações de massa de uma amostra, a qual pode resultar de uma transformação física (evaporação, condensação, sublimação, entre outras), ou química (decomposição, oxidação, etc) em função da temperatura ou do tempo, sendo muito aplicada para prever o comportamento termodegradativo do material, o grau de pureza, o teor de umidade, de voláteis e de resíduos, a composição de blendas e outras (NASCIMENTO, 2001).

De acordo com as curvas de TGA demonstradas na Figura 4.5, todos os filmes de P(3HB) extraídos pelos métodos mecânico com etapa de purificação e químico, com e sem purificação, apresentaram degradação térmica em apenas um estágio de perda de massa, indicando que o processo ocorre em um único mecanismo de degradação, como também

observado por Duarte (2004). Apenas para a amostra obtida pelo método de extração mecânico sem etapa de purificação, a degradação térmica ocorreu em dois estágios de perda de massa, o que sugere a presença de impurezas remanescentes do processo de extração, que podem ser atribuídos a resíduos celulares.

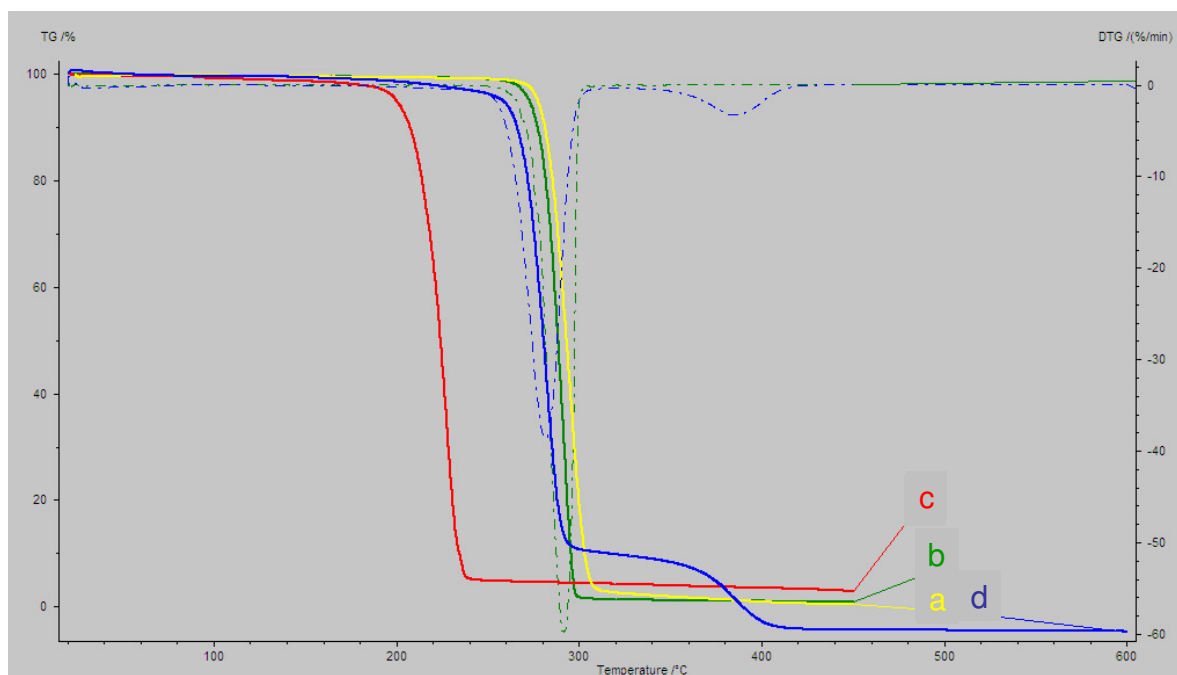


Figura 4.4: Curvas termogravimétricas dos filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico e mecânico com e sem a etapa de purificação: a) químico purificado; b) mecânico purificado; c) químico não-purificado; d) mecânico não-purificado.

Tabela 4.4: Dados de temperatura de início de degradação (T_i), temperatura máxima de degradação (T_{pico}) e porcentagem de perda de massa determinados a partir das curvas de TGA dos filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico e mecânico com e sem a etapa de purificação.

	T_i (°C)	T_{pico} (°C)	Perda de massa (%)
químico purificado	282	294	99,3
mecânico purificado	281	292	99,3
químico não-purificado	214	228	97,2
mecânico não-purificado	270	283	90,5

Os dados determinados a partir das curvas de TGA são mostrados na Tabela 4.4, onde se observou uma nítida influência da etapa de purificação no processo de extração do polímero. Os filmes de P(3HB) extraídos com a etapa de purificação, pelos métodos mecânico e químico apresentaram melhor estabilidade térmica, com temperatura de início de

degradação (T_i) em 282 e 281°C e temperatura máxima de degradação (T_{pico}) em 294 e 292°C, respectivamente. Estes valores foram superiores aos encontrados por Duarte (2004) para o P(3HB) com massa molar média igual a 240.000 g.mol⁻¹ apresentando $T_i = 270$ °C e $T_{pico} = 288$ °C e similares ao P(3HB) com massa molar média igual a 300.000 g.mol⁻¹, onde foram relatados valores de $T_i = 283$ °C e $T_{pico} = 307$ °C, ambos obtidos da PHB Industrial.

De acordo com Nascimento (2001), o TGA também é uma técnica importante para detectar o grau de impurezas decorrentes do processo de extração do polímero do interior da bactéria, no qual se utilizam vários reagentes e solventes. As impurezas são responsáveis por muitas das propriedades finais dos produtos acabados, como o grau de transparência, odor e brilho, além de contribuírem para cisões de cadeias poliméricas, acarretando em queda das propriedades termomecânicas.

A Tabela 4.4 também mostra que o grau de pureza, representado pela perda de massa, obtido foi bastante alto para os polímeros purificados (99,3 %), independentemente do método de extração utilizado, sendo similar ao P(3HB) encontrado por Nascimento (2001) (99,12 %), extraído por método químico com massa molar de 232.300 g.mol⁻¹. Já para os filmes obtidos sem a etapa de purificação, o grau de pureza foi de 97,2 % para o método químico e 85,2 % para o método mecânico.

A técnica de TGA também foi utilizada por Hahn *et al.* (1995), em seu estudo de caracterização do P(3HB) produzido por *C. necator* e *E. coli*, nesse estudo o P(3HB) foi extraído pelo método de dispersão de hipoclorito de sódio e clorofórmio, sendo encontrado um grau de pureza de 98 %. Segundo estes autores, as impurezas podem ser proteínas ou cátions do meio de cultivo.

4.1.5 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A cromatografia de permeação em gel é uma técnica utilizada para determinação de massa molar e polidispersividade de materiais poliméricos. A Figura 4.6 ilustra os cromatogramas obtidos pela análise de GPC.

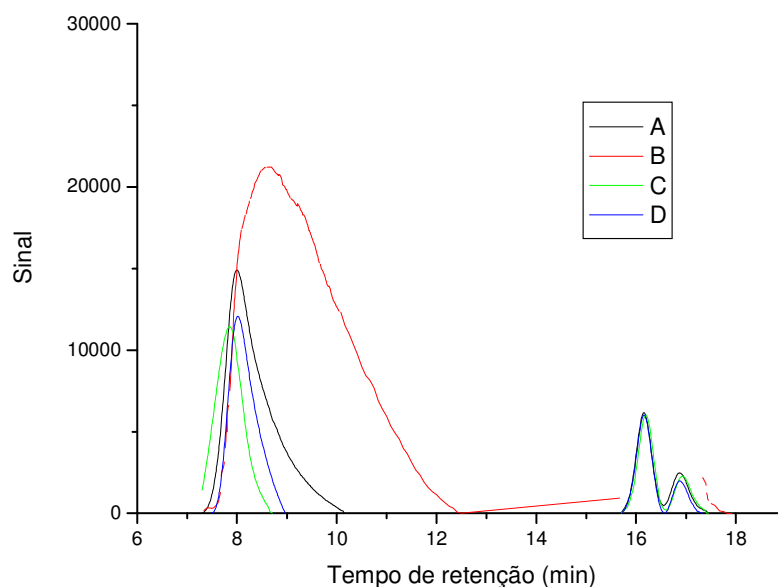


Figura 4.5: Curvas obtidas pela análise de GPC para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico e mecânico com e sem a etapa de purificação: a) mecânico purificado; b) mecânico não-purificado; c) químico purificado; d) químico não-purificado.

Os valores de massa molar bem como os valores de polidispersividade, obtidos do gráfico da Figura 4.6 estão demonstrados na Tabela 4.5. Os valores de \overline{M}_w obtidos para todas as amostras variaram de $4,67 \cdot 10^5$ a $7,89 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹. Os maiores valores encontrados foram para as amostras obtidas a partir do método mecânico. Estes valores foram mais altos que os encontrados por Nascimento (2001) e Jiang *et al.* (2006).

Nascimento (2001), que estudou a adição de plastificante dioctil phtalato (DOP) em P(3HB) obtido da PHB industrial, observou uma \overline{M}_w de $2,3 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹. Enquanto Jiang *et al.* (2006), estudaram o impacto do pré-tratamento da biomassa com metanol ou NaOH antes da extração com acetona de PHAs de cadeia média produzidos por *Pseudomonas putida*. Os autores obtiveram uma $\overline{M}_w = 8,2 \cdot 10^4$ g.mol⁻¹, com uma variação de ± 103 , para os diferentes pré-tratamentos, e um índice de polidispersividade de 1,86.

De acordo com Anderson & Dawes (1990), os valores geralmente encontrados na literatura de \overline{M}_w para o P(3HB) situam-se na faixa de $2,2 \cdot 10^5$ a $2,2 \cdot 10^6$ g.mol⁻¹. A Empresa Zeneca considera um \overline{M}_w de $6 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹ aceitável para aplicação de seu termoplástico Biopol® (LUZIER, 1992 *apud* NASCIMENTO, 2001).

Tabela 4.5: Dados de massa molar ponderal média (\overline{Mw}), massa molar numérica média (\overline{Mn}) e polidispersividade, determinados a partir da análise de GPC dos filmes de P(3HB) extraídos pelos métodos mecânico e químico com e sem a etapa de purificação.

P(3HB)	\overline{Mw} (g.mol ⁻¹)	\overline{Mn} (g.mol ⁻¹)	Polidispersividade
mecânico purificado	7,44.10 ⁵	6,58.10 ⁵	1,13
mecânico não-purificado	7,89.10 ⁵	7,00.10 ⁵	1,12
químico purificado	4,67.10 ⁵	4,37.10 ⁵	1,07
químico não-purificado	6,16.10 ⁵	5,77.10 ⁵	1,07

Segundo Nascimento (2001), a massa molar está diretamente ligada ao processo de extração do polímero do interior dos microrganismos, considerando que a etapa de purificação do mesmo também requer procedimentos operacionais que acarretam uma quebra ou cisão das cadeias poliméricas, isto causa uma queda sensível na massa molar do polímero virgem. Isso explica o fato dos polímeros terem sofrido decréscimo da massa molar após a etapa de purificação independente do método utilizado.

De acordo com Anderson & Dawes (1990), a polidispersividade de um polímero é a medida da distribuição de suas massas molares individuais em torno da massa molar ponderal média, ou seja, quanto mais próximo for este valor de 1, mais homogênea é a distribuição de tamanho médio das cadeias poliméricas. Esta propriedade é normalmente atribuída ao microrganismo produtor, bem como à estratégia de produção. No entanto, Nascimento (2001), demonstrou que a massa molar ponderal média tem mostrado variações que dependem muito do processo de extração utilizado na obtenção do polímero. Como é possível verificar na Tabela 4.5, os valores de polidispersividade para todas as amostras foram considerados ótimos, de acordo com Anderson & Dawes (1990).

Chen *et al.* (1999), propuseram um método de extração utilizando solução aquosa de surfactante, para obtenção do P(3HB) de *C. necator*. Os autores encontram uma massa molar viscosimétrica (\overline{Mv}) de 3,12.10⁵ g.mol⁻¹, em pH e temperatura ótimos.

Kosravi-Darani *et al.* (2004), utilizaram CO₂ supercrítico para a extração de P(3HB) de *C. necator*, e analisaram ainda, o efeito de processos de pré-tratamento da biomassa sobre a \overline{Mn} do polímero obtido. Os autores observaram que quando foi utilizada a biomassa úmida, a \overline{Mn} foi de 7,15.10⁵ g.mol⁻¹, para a biomassa seca à 60°C, a \overline{Mn} foi de 6,3.10⁵ g.mol⁻¹ e quando a biomassa foi liofilizada antes do processo de extração a \overline{Mn} foi de 7,6.10⁵ g.mol⁻¹, demonstrando que a estratégia de manutenção da biomassa antes do processo de extração interfere não somente no grau de pureza do polímero formado, mas também na sua massa molar final.

Choi & Lee (1999), estudaram métodos químicos de extração de P(3HB) de *E. coli*, utilizando NaOH e KOH e comparando a $\overline{M_w}$ e o índice de polidispersividade do polímero obtido após o processo de extração. Os autores observaram a redução da massa molar de $2,2 \cdot 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ no interior da bactéria para $1,9 \cdot 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ com NaOH e $2,0 \cdot 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ com KOH, em todos os casos a polidispersividade variou entre 2,47 e 2,94. Uma possível explicação para valores de massa molar superiores é o fato de que esta bactéria não possui depolimerases em seu interior.

4.2 Considerações finais

A espectroscopia no infravermelho, aliada a difratometria de raios-X permitiram concluir que o polímero sintetizado foi o P(3HB).

As curvas obtidas por DSC mostram perfis similares para as amostras purificadas e o mesmo perfil também foi observado para as amostras não purificadas, que apresentaram picos adicionais de fusão em temperaturas mais baixas que o P(3HB), atribuídas a presença de impurezas evidenciando a importância da etapa de purificação. Os graus de cristalinidade obtidos pela técnica de DSC mostraram-se em concordância com os dados obtidos por DRX, demonstrando que a etapa de purificação aumenta a cristalinidade da amostra.

A estabilidade térmica dos polímeros foi similar, exceto para a amostra obtida pelo método químico de extração sem a etapa de purificação, fato foi atribuído a sua menor cristalinidade somado a uma menor massa molar.

Os valores de massa molar ponderal média para as amostras obtidas pela extração mecânica foram superiores, embora todas apresentassem massa molar dentro da faixa usualmente aceitável para aplicações.

CAPÍTULO V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

BIODEGRADAÇÃO EM SOLO DOS FILMES DE P(3HB) EXTRAÍDOS PELO MÉTODO MECÂNICO E QUÍMICO A PARTIR DE *Cupriavidus necator*

A enorme quantidade de plásticos sintéticos derivados de polímeros petroquímicos anualmente descartados torna difícil prever um futuro da Humanidade sem uma política global para diminuição do impacto deste tipo de lixo no meio ambiente. Dessa maneira, muitos grupos de pesquisa têm buscado soluções que garantam um desenvolvimento sustentável, onde o Homem e o meio possam conviver sem causar prejuízos entre si (NASCIMENTO, 2001).

Neste capítulo são apresentados os resultados de caracterização após a biodegradação em solo compostado dos filmes de P(3HB) extraídos pelos diferentes métodos de extração a partir de *Cupriavidus necator* com e sem a etapa posterior de purificação. O acompanhamento da biodegradação dos filmes foi realizado por meio de análise visual, das propriedades térmicas e da variação da massa molar.

5.1 Caracterização dos filmes de P(3HB) submetidos à biodegradação em solo compostado

5.1.1 Análise visual

A Figura 5.1. ilustra as fotos dos filmes de P(3HB) extraídos pelos métodos mecânico e químico, com e sem a etapa de purificação em função do tempo de biodegradação. Observou-se que o método utilizado de extração e a etapa de purificação exerceram uma forte influência na taxa de degradação dos filmes. As amostras purificadas levaram mais tempo para se degradarem que as não purificadas. Esse resultado pode ser explicado pelo aumento do grau de cristalinidade gerado pela purificação, como observado pelo DRX e DSC (itens 4.2 e 4.3). As amostras extraídas pelo método químico apresentaram visivelmente taxa de degradação mais acelerada que aquelas extraídas pelo método mecânico.

Após 7 dias de degradação em solo, os filmes extraídos com pérolas com e sem purificação apresentaram os primeiros vestígios de degradação, com a presença de pequenas colônias na superfície do filme. Já o filme extraído com hipoclorito purificado apresentou, além da formação de colônias a presença de orifícios, enquanto o filme extraído com hipoclorito não purificado já se encontrava em estágio avançado de degradação, quase totalmente fragmentado. Com 14 dias de degradação, os filmes extraídos com pérolas já apresentaram pequenos orifícios concentrados nas colônias, enquanto o filme extraído com hipoclorito purificado estava quase totalmente degradado, não tendo sido encontrado nenhum fragmento do filme extraído com hipoclorito não purificado. Após 21 dias de degradação, o filme extraído com pérolas purificado apresentou-se totalmente colonizado; o filme extraído com pérolas não purificado já estava nos últimos estágios de degradação, tendo sido encontrado somente alguns fragmentos, enquanto o filme extraído com hipoclorito não purificado já havia sido completamente decomposto pelos microrganismos presentes no solo. Após 28 dias de degradação, ambos os filmes extraídos por pérolas já se encontram completamente degradados.

Dessa forma, a taxa de biodegradação pode ser representada da seguinte forma:

Químico não-purif. > Químico purif. > Mecânico não-purif. > Mecânico purif.

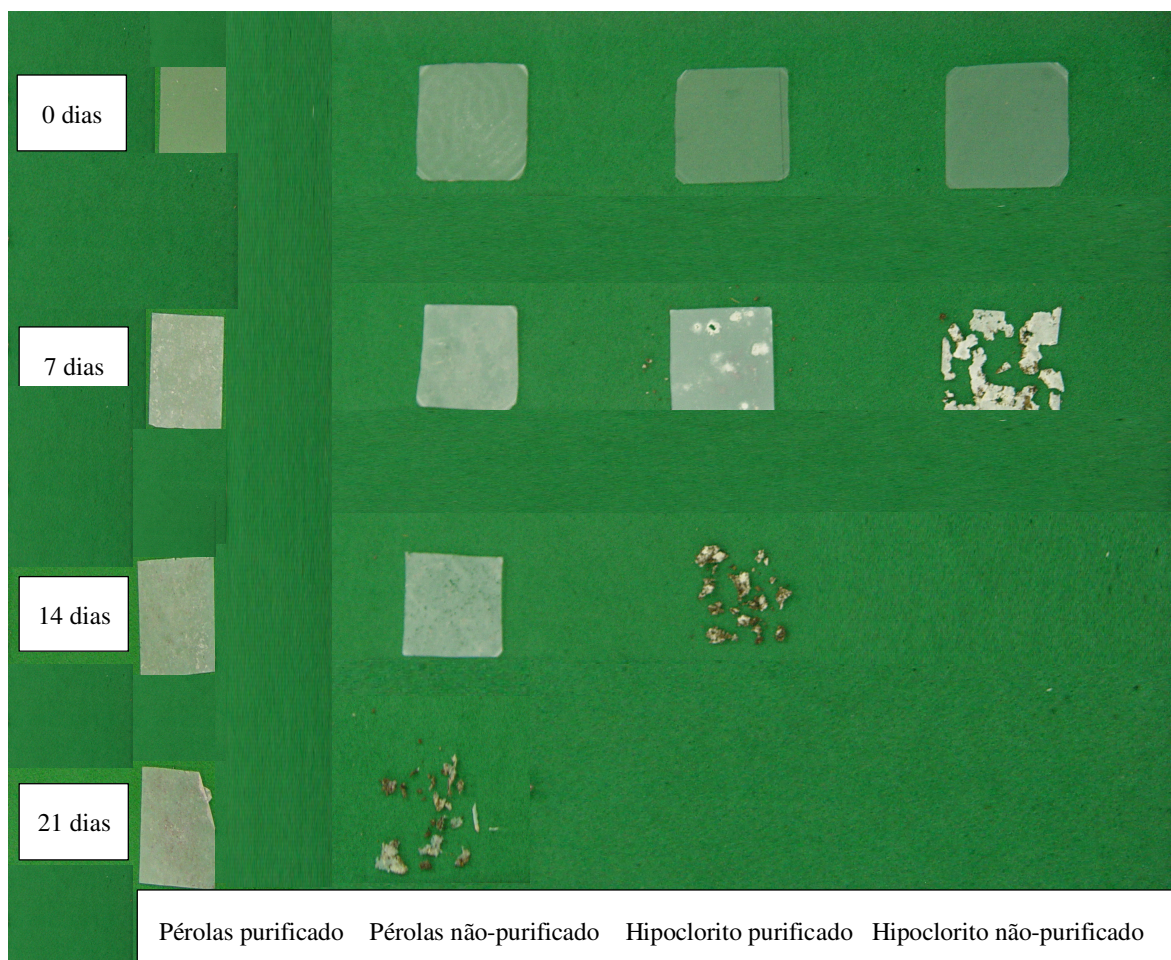


Figura 5.1: Análise visual para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico purificado em função do tempo de biodegradação em solo compostado.

5.1.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Devido ao perfil de biodegradação das amostras, optou-se por iniciar a discussão em ordem crescente, de acordo com o grau de degradação das amostras.

As Figuras 5.2 e 5.3 demonstram as curvas de DSC dos filmes de P(3HB) extraídos pelo método mecânico com e sem a etapa de purificação, respectivamente, em função do tempo de biodegradação em solo compostado, referentes ao primeiro e segundo aquecimento.

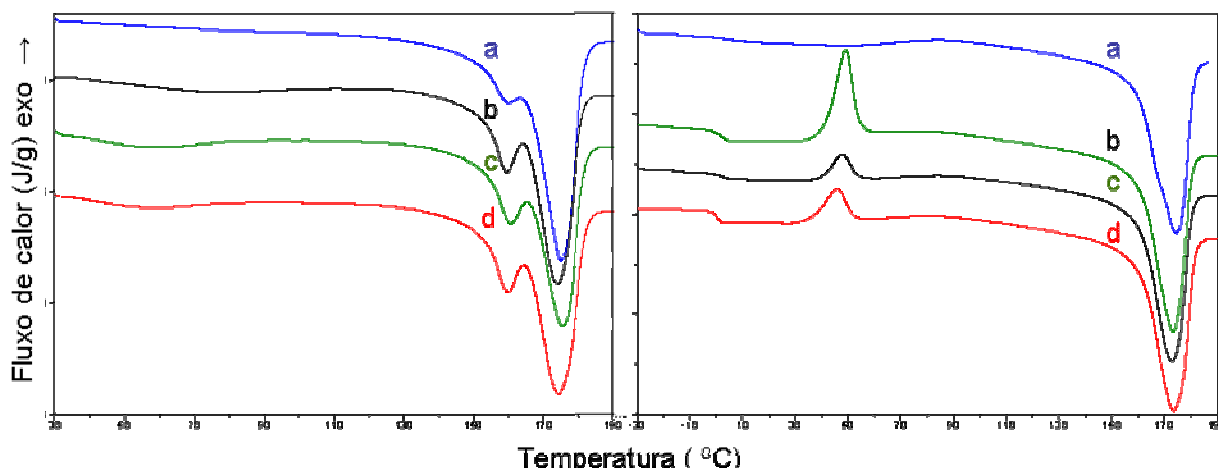


Figura 5.2: Curvas de DSC (1º e 2º aquecimento) para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método mecânico purificado em função do tempo de biodegradação em solo compostado: a) 0 dias; b) 7 dias; c) 14 dias; d) 21 dias.

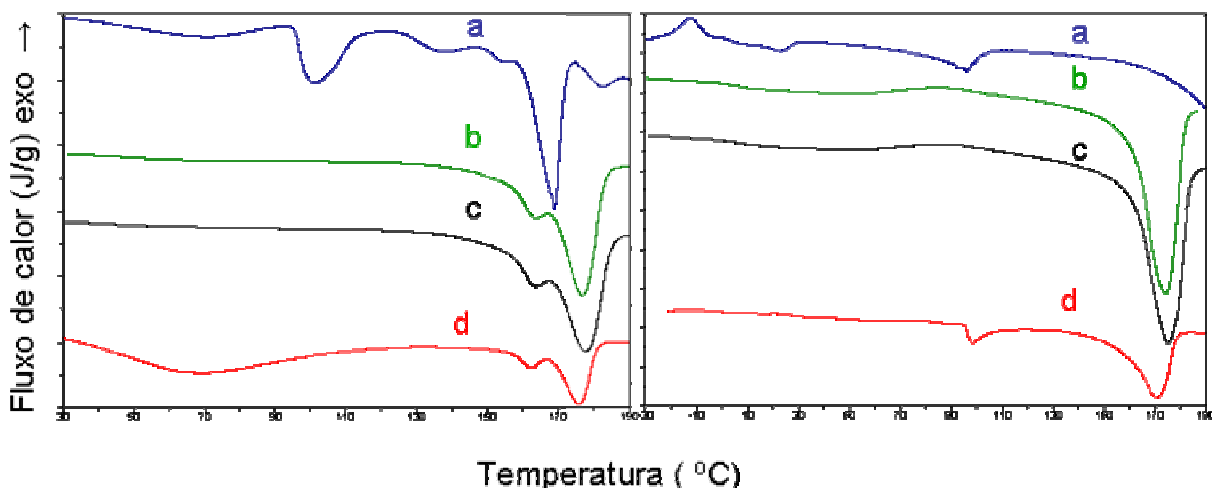


Figura 5.3: Curvas de DSC (1º e 2º aquecimento) para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método mecânico não purificado em função do tempo de biodegradação em solo compostado: a) 0 dias; b) 7 dias; c) 14 dias; d) 21 dias.

De um modo geral, no primeiro aquecimento das curvas de DSC do P(3HB) extraído pelo método mecânico purificado, observadas na Figura 5.2, não foram observadas alterações acentuadas na T_m , no ΔH_m e consequentemente no α_c . No segundo aquecimento, já foi observada uma T_g mais acentuada e o aparecimento de um pico de cristalização em cerca de 50°C, que diminuiu em função do tempo de biodegradação.

Na Figura 5.3 foi observado um pico adicional de fusão em cerca de 95°C nas curvas referentes ao tempo 0 dias de biodegradação, este pico destaca-se mais no 1º aquecimento do que no 2º aquecimento, e desaparece após 7 e 14 dias de biodegradação. Isso sugere a presença de impurezas no filme polimérico que podem ser atribuídas a resíduos celulares, que

foram rapidamente degradados com o calor recebido na primeira corrida do DSC, bem como pelos microrganismos presentes no solo. No 2º aquecimento não foi identificada a fusão do P(3HB) na temperatura característica, que vai de 170 a 180°C, para a amostra referente ao tempo 0 dias de biodegradação. Entretanto, observa-se o início de um pico endotérmico em cerca de 160°C, que foi interrompido, pois a corrida foi somente até 190°C. Outra característica importante foi o aparecimento de um pico de cristalização no 2º aquecimento após 7 dias de biodegradação, embora menos acentuado que os picos apresentados na Figura 5.2, que diminui em função do tempo. Isso também foi observado por Pezzin (2001), que após algumas semanas de degradação observou que a possibilidade de formar cristais durante o 2º aquecimento diminui, pois o material já se encontra bastante cristalino.

Os dados de T_m , ΔH_m e α_c foram determinados a partir do 1º aquecimento das curvas de DSC, enquanto os dados de T_g , T_m , ΔH_m e α_c , determinados do 2º aquecimento, estão relacionados na Tabela 5.1. Observou-se que a temperatura de transição vítrea variou de -3 a 0°C para os filmes de P(3HB) obtidos pelo método de extração mecânico com etapa de purificação. É interessante notar, no entanto, que a visualização da T_g está bem caracterizada nas curvas de DSC (exceto para a amostra zero dia). Porém, foi observada apenas uma oscilação no ΔH_m e conseqüentemente do α_c , o que indica que esta amostra não sofreu degradação acentuada no período estudado. Estes dados estão de acordo com a análise visual, que apontou esta amostra com a menor taxa de degradação.

Tabela 5.1: Dados de temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (α_c) determinados a partir das curvas de DSC (1º aquec.); temperatura de transição vítrea (T_g), T_m , ΔH_m e α_c (2º aquec.) para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método mecânico purificado e não purificado em função do tempo de biodegradação em solo compostado. *Dado não obtido.

P(3HB) purificado	1º aquecimento			2º aquecimento			
	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	α_c (%)	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	α_c (%)
0 dias	164	86	61	-3	174	88	62
7 dias	164	79	56	0	160	77	54
14 dias	164	76	54	-2	177	78	55
21 dias	164	83	58	0	177	86	61
P(3HB) não purificado	1º aquecimento			2º aquecimento			
0 dias	169	45	30	*	*	*	*
7 dias	177	90	60	*	174	89	59
14 dias	177	90	60	-14	175	89	59
21 dias	176	33	22	*	170	34	22

O comportamento do filme de P(3HB) obtido pelo método mecânico de extração sem a etapa de purificação foi bem distinto do purificado. Observou-se um aumento da T_m , ΔH_m e consequentemente do α_c nos primeiros tempos de 7 e 14 dias de biodegradação, sugerindo que a degradação é iniciada pela fração amorfa do polímero. Porém, com o aumento do tempo de biodegradação (21 dias) a T_m foi diminuída e, surgiu um segundo pico de fusão que no 1º aquecimento, constitui uma área de fusão ampla que vai desde a temperatura ambiente até cerca de 140 °C. No 2º aquecimento, um pico de fusão mais agudo também foi observado em cerca de 98°C para a amostra após 21 dias de degradação, sugerindo que a degradação da fração cristalina foi mais expressiva, gerando outro domínio cristalino de tamanho menor. Só foi possível obter a T_g para a amostra com 14 dias de biodegradação (Tabela 5.1), sendo este valor bem distinto do valor encontrado para a amostra purificada e bem menor do que o encontrado na literatura que vai de -5 a 5°C (Anderson & Dawes 1990).

Oliveira *et al.* (2006), também observaram o aumento do ΔH_m e α_c , quando estudaram a degradação do P(3HB) por irradiação γ . De acordo com os autores, este fenômeno, conhecido como quemicristalização, também ocorre com outros polímeros. O aumento do α_c durante a degradação resulta na liberação de fragmentos de macromoléculas e, considerando ainda que a T_g é menor que a temperatura ambiente, esses fragmentos apresentam muita mobilidade e podem se rearranjar em novas estruturas cristalinas, provavelmente onde já existem cristais.

As Figuras 5.4 e 5.5 demonstram as curvas de DSC dos filmes de P(3HB) obtidos pelo método de extração químico com e sem etapa de purificação em função do tempo de biodegradação em solo compostado, referentes ao primeiro e segundo aquecimentos, respectivamente.

As principais alterações observadas na Figura 5.4 referente ao primeiro e segundo aquecimentos foram: uma diminuição da T_m e ΔH_m e a presença de um pico adicional de fusão em 69°C para a amostra degradada após 7 dias. Ao contrário do que aconteceu para os filmes de P(3HB) obtidos pelo método de extração mecânico, os filmes obtidos pelo método químico foram degradados rapidamente. Foi observado ainda, de acordo com a Tabela 5.2, que a T_m , ΔH_m e α_c , diminuíram com o tempo de biodegradação. Isso sugere que para estas amostras não houve quemicristalização, apenas a fragmentação em vários domínios cristalinos menores, demonstrado pelo 2º pico de fusão que surgiu após 7 dias de biodegradação.

Pezzin *et al.* (2002), ao estudarem a degradação hidrolítica de blendas de PPD com PLLA para aplicações biomédicas, observaram que para o PLLA homopolímero a T_m diminuiu de 178 para 169°C, após 10 semanas em tampão fosfato. Os autores atribuíram o

fato a uma reorganização dos fragmentos de cadeia, formando cristais menores, fazendo com que ocorra fusão dos cristais a uma temperatura mais baixa.

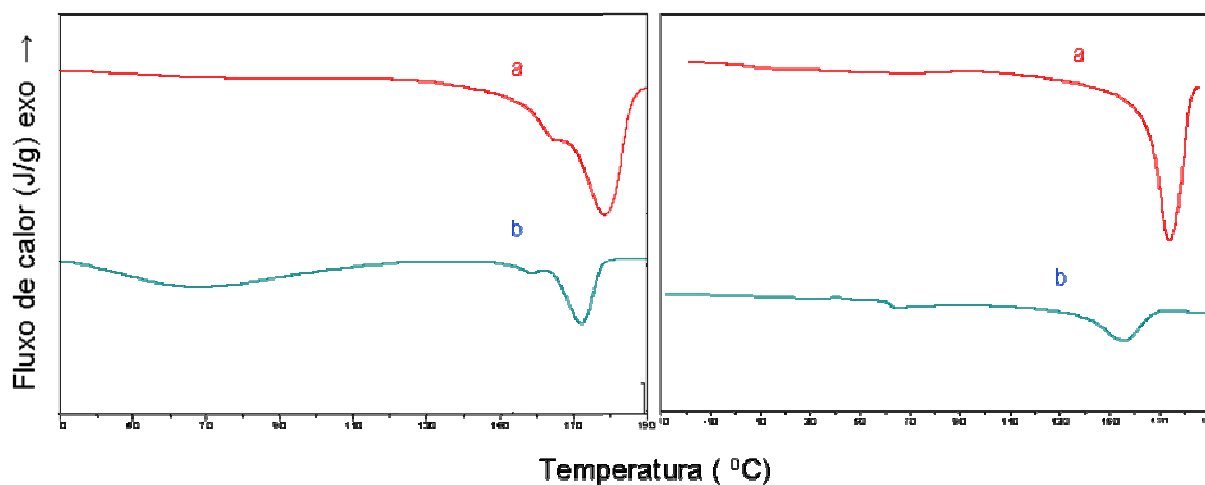


Figura 5.4: Curvas de DSC (1° e 2° aquecimento) para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico purificado em função do tempo de biodegradação em solo compostado: a) 0 dias e b) 7 dias.

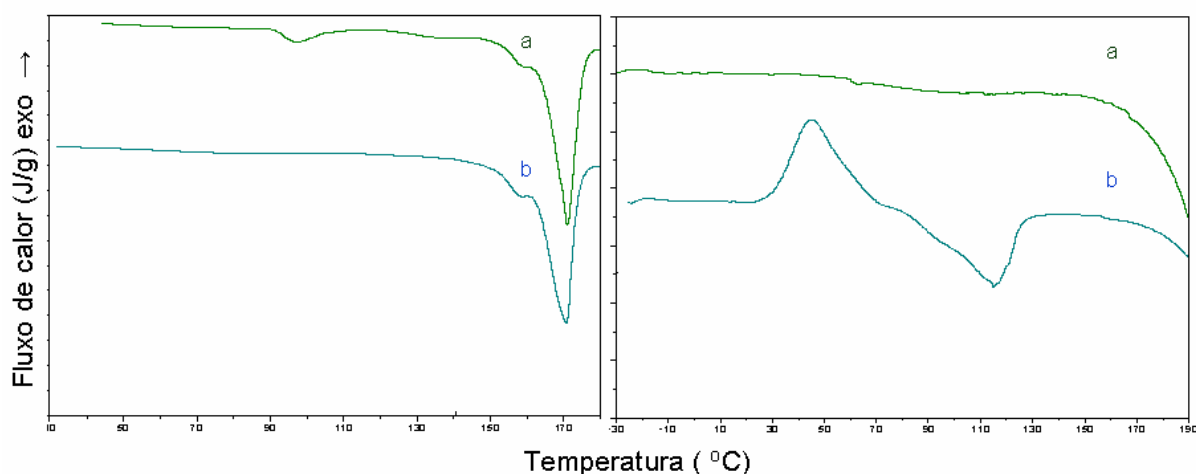


Figura 5.5: Curvas de DSC (1° e 2° aquecimento) para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico não purificado em função do tempo de biodegradação em solo compostado: a) 0 dias e b) 7 dias.

Tabela 5.2: Dados de temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (α_c) determinados a partir das curvas de DSC (1° aquec.); temperatura de transição vítrea (T_g), T_m , ΔH_m e grau de cristalinidade (α_c) (2° aquec.) para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico purificado e não purificado em função do tempo de biodegradação em solo compostado. * Dado não obtido.

P(3HB) purificado	1° aquecimento			2° aquecimento			
	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	α_c (%)	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	α_c (%)
0 dias	178	97	64	*	173	96	66
7 dias	172	28	18	*	155	27	18
P(3HB) não purificado	1° aquecimento			2° aquecimento			
0 dias	171	79	52	-14	*	*	*
7 dias	170	92	61	-14	115	39	26

A Figura 5.5 apresenta as curvas de DSC para os filmes de P(3HB), obtidos pelo método de extração química sem etapa de purificação. Foi observado um pico de fusão no primeiro aquecimento em cerca de 100°C, para a amostra em tempo zero, que desapareceu após 7 dias de biodegradação e no 2º aquecimento. Esse pico pode ser atribuído novamente, à impurezas como resíduos celulares, uma vez que aparece somente nas amostras não purificadas e é rapidamente degradada por microrganismos e a baixas temperaturas.

Assim como para os filmes purificados, após a extração química, os filmes não purificados também apresentaram pequena redução da T_m , no primeiro aquecimento após 7 dias, sendo porém mais acentuada no segundo aquecimento.

No entanto, o perfil de degradação do filme obtido pelo método de extração química, sem etapa de purificação, está mais de acordo com o encontrado na literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Como pode ser verificado na Tabela 5.2, houve um aumento do ΔH_m e conseqüentemente do α_c , com o aumento do tempo de biodegradação, no primeiro aquecimento, sugerindo a ocorrência de quemicristalização, como discutido anteriormente.

Foi observado ainda, que para as amostras que não foram submetidas à etapa de purificação, houve um aumento do ΔH_m e conseqüentemente do α_c , nestas amostras ocorreu o fenômeno de quemicristalização e a degradação foi mais rápida quando comparadas às amostras que foram submetidas a etapa de purificação.

De acordo com Parra *et al.* (2006), a degradação do P(3HB) por microrganismos ambientais, é afetada diretamente pelo grau de cristalinidade e massa molar da amostra, além da temperatura de degradação que proporciona o crescimento dos microrganismos. Dessa forma, uma possível explicação para os diferentes perfis de biodegradação em função dos diferentes métodos de extração, pode estar diretamente relacionada com a massa molar final obtida após o processo de extração.

5.1.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

As Figuras 5.6 e 5.7 apresentam os termogramas de TGA para os filmes de P(3HB) obtidos pelo método de extração mecânico com e sem a etapa de purificação, respectivamente, em função do tempo de biodegradação em solo compostado. As tabelas 5.3 e 5.4 relacionam os dados de temperatura de início de degradação térmica (T_i), temperatura máxima de degradação (T_{pico}) e os percentuais de perda de massa obtidos pela técnica de TGA.

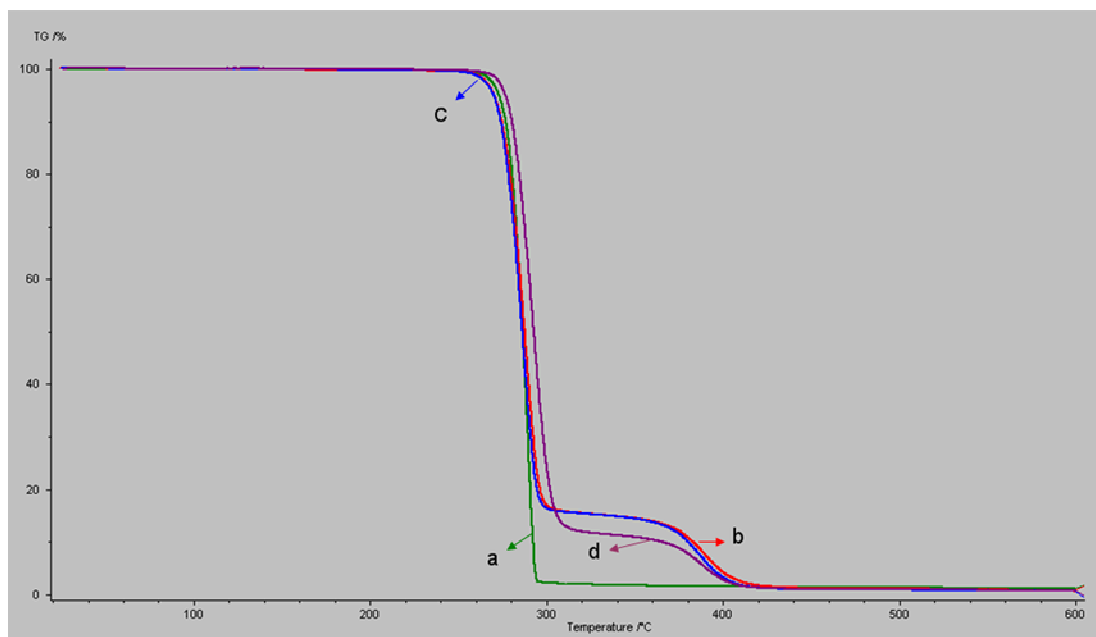


Figura 5.6: Curvas termogravimétricas dos filmes de P(3HB) extraídos pelo método mecânico purificado em função do tempo de biodegradação em dias: a) 0; b) 7; c) 14; d) 21.

Tabela 5.3: Dados de temperatura de início de degradação (T_i), temperatura máxima de degradação (T_{pico}) e porcentagem de perda de massa, determinados a partir das curvas de TGA dos filmes de P(3HB) extraídos pelo método mecânico purificado em função do tempo de biodegradação.

Mecânico purificado	T_i 1(°C)	T_i 2(°C)	T_{pico} 1(°C)	T_{pico} 2(°C)	Perda de massa 1 (%)	Perda de massa 2 (%)
0	280	*	290	*	98,4	*
7	276	289	373	392	83,3	12,0
14	275	371	287	390	83,6	12,7
21	281	372	293	390	87,4	9,1

* Dado não obtido.

De acordo com a Figura 5.6 pode-se observar que o P(3HB) obtido pelo método mecânico de extração com etapa de purificação apresentou degradação térmica em apenas um estágio de perda de massa com temperatura de início de degradação (T_i) em 280°C, no tempo zero dias de biodegradação. No entanto, para as amostras com 7, 14 e 21 dias de biodegradação a degradação térmica ocorreu em dois estágios, com percentuais de perdas de massas menores para o segundo estágio em relação ao primeiro estágio. O primeiro estágio corresponde a temperatura de degradação térmica do P(3HB) e o segundo estágio, mais estável termicamente, pode ser atribuído a resíduos de solo da amostra, visto que somente apareceu nas amostras biodegradadas.

Considerando apenas a temperatura de início de degradação térmica do primeiro estágio (Tabela 5.3), observa-se que esta não apresenta variação, apenas a perda de massa foi

reduzida com o tempo de biodegradação. Como foi constatado na análise de DSC (item 5.1.2), esta amostra não apresentou degradação muito acentuada no período de estudo, portanto, a redução na perda de massa pode ser atribuída a um início de erosão superficial da amostra.

O filme de P(3HB) obtido pelo método de extração mecânico sem a etapa de purificação (Figura 5.7), apresentou um comportamento contrário ao polímero submetido à etapa de purificação. Foi observada degradação térmica em dois estágios de perda de massa para a amostra no tempo zero dias e apenas um estágio de degradação térmica nos demais tempos de biodegradação. Esse comportamento aliado ao encontrado pela técnica de DSC para esta amostra (5.1.2), indica a presença de resíduos celulares da extração, que são primeiramente degradados por microrganismos do solo.

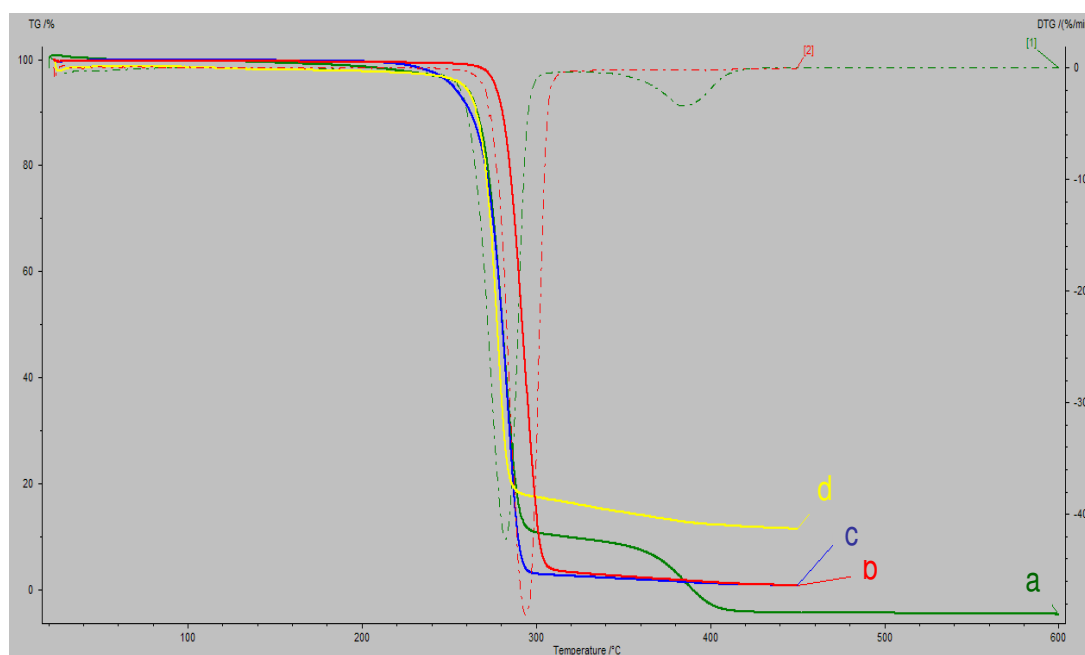


Figura 5.7: Curvas de TGA dos filmes de P(3HB) extraídos pelo método mecânico não purificado em função do tempo de biodegradação em dias: a) 0; b) 7; c) 14; d) 21.

Tabela 5.4: Dados de temperatura de início de degradação (T_i), temperatura máxima de degradação (T_{pico}) e porcentagem de perda de massa, determinados a partir das curvas de TGA para os filmes de P(3HB) extraídos pelo método mecânico sem a etapa de purificação em função do tempo de biodegradação.

Mecânico não-purificado	T_i (°C)	T_{pico} (°C)	Perda de massa (%)
0 dias	270	283	90,5
7 dias	283	296	99,7
14 dias	271	284	99,3
21 dias	269	279	88,6

Analisando a Tabela 5.4, observa-se que a temperatura de início de degradação térmica (T_i) e temperatura máxima de degradação térmica (T_{pico}) apresentaram uma pequena variação com o tempo. Para a amostra com 7 dias de biodegradação houve um ligeiro aumento na estabilidade térmica, que voltou a cair gradativamente com o tempo de biodegradação. Este fator pode ser atribuído a quemicristalização, também observada pela análise de DSC.

Vanin *et al.*, (2004), estudaram a degradação por hidrólise de P(3HB) e blendas com poli(L-ácido láctico) (PLLA) e observaram que houve aumento da estabilidade térmica com o tempo e, após 12 meses foi constatado que não houve degradação acentuada.

O aumento na estabilidade térmica com o tempo de biodegradação de blendas de polietileno com amido também foi observado por Morancho *et al.*, (2006), os autores atribuíram o comportamento à recristalização do material com o tempo de biodegradação.

As Figuras 5.8 e 5.9 apresentam as curvas de TGA para os filmes de P(3HB) obtidos pelo método de extração químico com e sem a etapa de purificação, respectivamente, em função do tempo de biodegradação em solo compostado. As tabelas 5.5 e 5.6 apresentam os dados de temperatura de início de degradação térmica (T_i), temperatura máxima de degradação (T_{pico}) e os percentuais de perda de massa obtidos pelas curvas de TG e DTG.

O filme obtido pelo método de extração químico com etapa de purificação (Figura 5.12), teve uma degradação mais rápida que os filmes obtidos pelo método mecânico, sendo possível encontrar apenas pequenos fragmentos de amostra no solo após 14 dias de biodegradação, porém, não em quantidade suficiente para serem submetidos à caracterização. Novamente, foi observado somente um estágio de perda de massa. Todavia, constatou-se que o filme purificado apresentou uma queda mais brusca na estabilidade térmica após 7 dias de biodegradação em solo, houve uma diferença de 42°C na T_i em relação à amostra no tempo 0 dias, ou seja sem biodegradação (Tabela 5.5). Outro fator também observado foi que mesmo submetida a 450°C a amostra com 7 dias de biodegradação não perdeu toda a sua massa (82,63%), isso pode ser devido à presença de resíduos do solo na amostra.

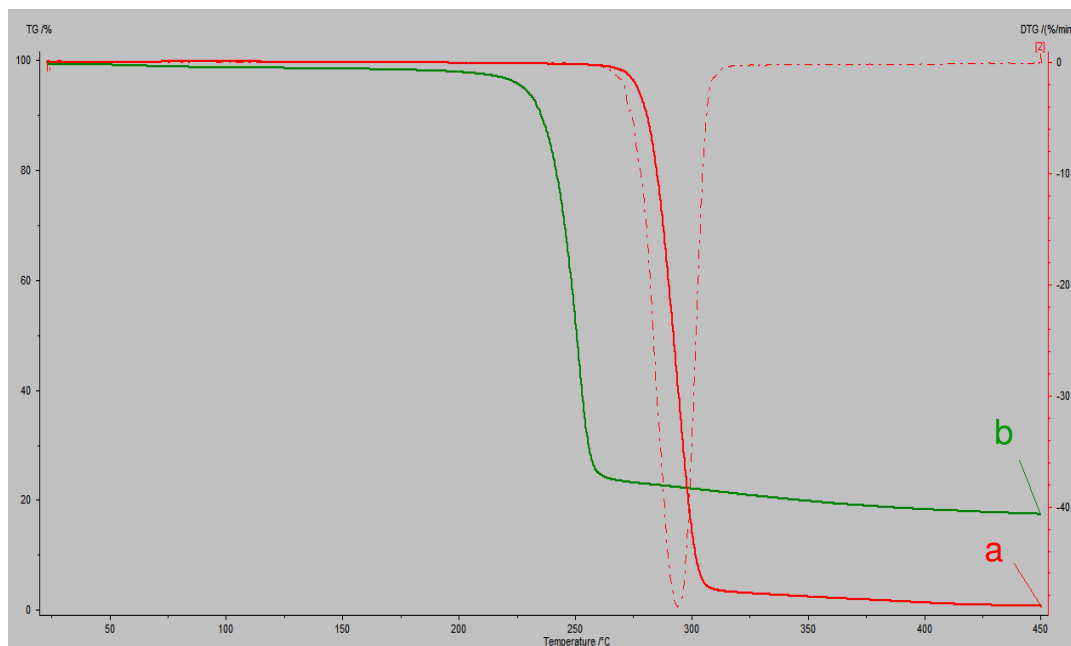


Figura 5.8: Curvas termogravimétricas dos filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico com a etapa de purificação em função do tempo de biodegradação em dias: a) 0; b) 7.

Tabela 5.5: Dados de temperatura de início de degradação (T_i), temperatura máxima de degradação (T_{pico}) e porcentagem de perda de massa, determinados a partir das curvas de TG e DTG dos filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico com a etapa de purificação em função do tempo de biodegradação.

Químico purificado	T_i (°C)	T_{pico} (°C)	Perda de massa (%)
0 dias	282	294	99,36
7 dias	240	252	82,63

O filme obtido pelo método químico de extração sem etapa de purificação (Figura 5.9), foi ainda menos estável à degradação, não restando nenhum fragmento de amostra após 14 dias de biodegradação. Porém foi observado um pequeno aumento na estabilidade térmica com o tempo de biodegradação (13 °C), comportamento semelhante ao observado para o P(3HB) extraído pelo método mecânico não-purificado (Tabela 5.6).

Foi constatado que houve semelhança no comportamento das amostras submetidas à etapa de purificação independente do método de extração, o mesmo perfil também foi observado entre as amostras não purificadas, isto também foi observado quando a análise de DSC foi realizada.

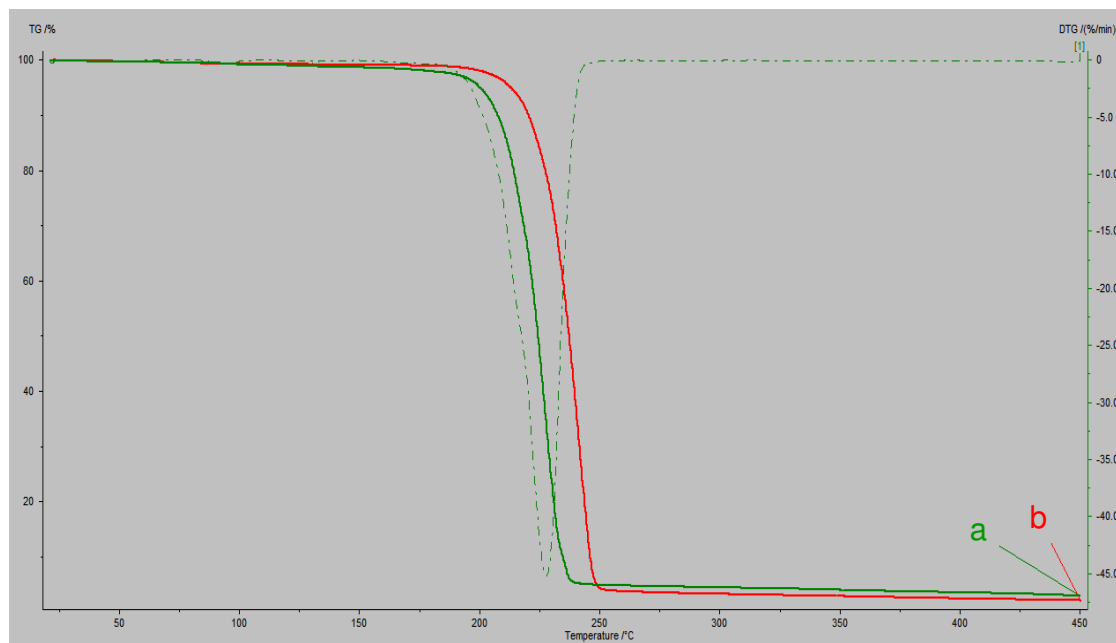


Figura 5.9: Curvas de TGA dos filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico sem a etapa de purificação em função do tempo de biodegradação em dias: a) 0; b) 7.

Tabela 5.6: Dados de temperatura de início de degradação (T_i), temperatura máxima de degradação (T_{pico}) e porcentagem de perda de massa, determinados a partir das curvas de TG e DTG dos filmes de P(3HB) extraídos pelo método químico sem a etapa de purificação em função do tempo de biodegradação.

Químico não-purificado	T_i (°C)	T_{pico} (°C)	Perda de massa (%)
0 dias	214	229	97,15
7 dias	227	243	98,04

5.1.4 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A técnica de cromatografia de permeação em gel também pode ser utilizada para o acompanhamento da variação da massa molar e polidispersividade de polímeros submetidos à degradação.

Os valores de massa molar bem como os valores de polidispersividade, obtidos para as amostras de P(3HB) obtidas pelos diferentes métodos de extração, com e sem etapa de purificação, submetidos à degradação em solo compostado por 7, 14 e 21 dias estão demonstrados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7: Dados de massa molar ponderal média (\overline{Mw}), massa molar numérica média (\overline{Mn}) e polidispersividade, determinados a partir da análise de GPC dos filmes de P(3HB) extraídos pelos métodos mecânico e químico com e sem a etapa de purificação, em função do tempo de biodegradação.

P(3HB)	Tempo (dias)	\overline{Mw} (g.mol ⁻¹)	\overline{Mn} (g.mol ⁻¹)	Polidispersividade
mecânico purificado	0	7,44.10 ⁵	6,58.10 ⁵	1,13
	7	7,62.10 ⁵	6,22.10 ⁵	1,22
	14	8,32.10 ⁵	7,72.10 ⁵	1,08
	21	7,55.10 ⁵	6,44.10 ⁵	1,17
mecânico não-purificado	0	7,89.10 ⁵	7,00.10 ⁵	1,12
	7	6,12.10 ⁵	5,52.10 ⁵	1,11
	14	5,37.10 ⁵	4,83.10 ⁵	1,11
	21	5,98.10 ⁵	1,90.10 ⁵	3,15
químico purificado	0	4,67.10 ⁵	4,37.10 ⁵	1,07
	7	2,87.10 ⁵	2,44.10 ⁵	1,17
	14	108	87	1,24
químico não-purificado	0	6,16.10 ⁵	5,77.10 ⁵	1,07
	7	1,19.10 ³	1,18.10 ³	1,01

Analisando a tabela 5.7 é possível verificar que para a amostra obtida pelo método mecânico com etapa de purificação praticamente não houve variação de massa molar, bem como da polidispersividade, o que indica que esta amostra foi mais estável ao ataque microbiano durante o período estudado. Enquanto para a amostra obtida pelo método mecânico sem etapa de purificação, foi possível observar redução da massa molar ponderal média e uma redução ainda mais expressiva da massa molar numérica média, o que foi constatado pela polidispersividade de 3,15 após 21 dias de biodegradação, demonstrando estágios de degradação graduais. O ataque microbiano a esta amostra pode ter sido facilitado pelo menor grau de cristalinidade, demonstrado pela análise de DSC (item 5.1.2), e ainda pela presença de impurezas na amostra. A amostra obtida pelo método químico com etapa de purificação, demonstrou cerca de 40% de redução de massa molar nos primeiros 7 dias apresentado-se em estágio bem avançado de degradação ao 14 dias e com 21 dias a amostra estava totalmente degradada. Tendo sido esta redução semelhante para \overline{Mw} e \overline{Mn} , os valores de polidispersividade apresentaram pequena variação. Enquanto para a amostra obtida pelo método químico sem etapa de purificação, a biodegradação foi ainda mais acelerada, não restando nenhum fragmento de amostra com 14 dias de biodegradação em solo.

O acompanhamento da biodegradação em solo do P(3HB) e blendas com poli(ϵ -caprolactona) (PCL) por GPC também foi realizado por La Cara *et al.*, (2003), os autores observaram que após 20 dias, a \overline{Mw} foi reduzida a praticamente metade do valor inicial e, 40

dias após este valor já era muito mais baixo. Esse comportamento foi observado para as amostras de P(3HB) obtidas pelo método de extração químico com etapa de purificação.

Outro fator também observado foi a clara influência da etapa de purificação sobre a estabilidade do polímero, independente do método de extração. Foi constatado que a purificação causa uma pequena degradação do polímero, porém a despeito disto, o P(3HB) foi mais estável quando submetido à etapa de purificação.

De acordo com Parra *et al.* (2006), a degradação do P(3HB) por microrganismos ambientais, é afetada diretamente pelo grau de cristalinidade e massa molar da amostra. Considerando que as amostras purificadas possuem maior grau de cristalinidade, pela solubilização em clorofórmio e precipitação em não-solvente (HAHN *et al.*, 1995), o perfil de degradação encontrado para as amostras estudadas indica que o grau de cristalinidade afeta de maneira mais intensa a biodegradação por microrganismos do que a massa molar.

5.2 Considerações finais

Os resultados obtidos pela análise visual mostraram que a cinética de biodegradação das amostras de P(3HB) ocorre na seguinte ordem: Químico não-purif. > Químico purif. > Mecânico não-purif. > Mecânico purif. Indicando que o polímero obtido pelo método de extração mecânico é mais estável à degradação. Como a degradação ocorre pela parte superficial do filme e é predominantemente facilitada pela região amorfa, as amostras obtidas sem etapa de purificação apresentaram degradação mais rápida em relação as amostras purificadas independente do método de extração.

As análises térmicas demonstraram que os filmes de P(3HB) apresentaram perfis de degradação semelhantes entre as amostras purificadas e entre as amostras não purificadas, independente do método de extração. Os resultados obtidos por DSC, demonstraram a ocorrência de quemicristalização para as amostras não purificadas, comportamento confirmado pela análise de TGA, na qual as amostras não purificadas apresentaram maior estabilidade térmica logo após o início dos ensaios de biodegradação.

Através da análise de cromatografia de permeação em gel foi possível observar a redução da massa molar em função do tempo de biodegradação no solo para as amostras obtidas pelo método mecânico sem etapa de purificação e pelo método químico com e sem

etapa de purificação. Demonstrando que as amostras com etapa de purificação e, conseqüentemente com grau de cristalinidade mais alto, são mais estáveis a biodegradação.

CONCLUSÕES

O planejamento fatorial permitiu selecionar a melhor condição para realização do método mecânico proposto. No entanto, foi constatada ainda a dependência do solvente no processo a despeito de ser um método mecânico de ruptura celular. Tendo em vista que o objetivo do trabalho era propor um método de extração de baixo custo, é importante ressaltar que para a aplicação deste método não é necessário o uso de temperatura, pressão, surfactantes, quelantes, digestão com hipoclorito de sódio, tratamento enzimático, bem como um acondicionamento prévio das células, o que implica em redução de custos e ainda em tempo de processo.

O método mecânico apresentou um bom rendimento de extração quando comparado ao químico, alcançando ainda o mesmo grau de pureza, aliado às melhores propriedades finais alcançadas, tornando este método de extração, uma interessante alternativa para a aplicação industrial.

As análises de caracterização constataram que as amostras de P(3HB) apresentaram diferentes taxas de biodegradação em solo compostado, de acordo com a técnica de extração utilizada, demonstrando a forte influência da extração sobre as propriedades e estabilidade final do polímero. Verificou-se ainda, que apesar da etapa de purificação tornar os filmes mais cristalinos e causar redução da massa molar, os polímeros apresentaram melhores propriedades térmicas e foram mais estáveis quanto à degradação causada tanto por temperatura quanto por microrganismos do solo.

SUGESTÕES E PERSPECTIVAS

Durante o estudo para a realização deste trabalho, surgiram a uma série de questionamentos e possibilidades que poderão ser abordados em futuros estudos, são estes:

- Analisar a massa molar das amostras de P(3HB) obtidas do processo de extração mecânico com a etapa de temperatura, visando traçar um paralelo entre o rendimento de extração, grau de pureza e massa molar.

- Analisar a massa molar do P(3HB) no interior da bactéria, antes do processo de extração, visando uma comparação do grau de cisão de cadeias causada pelos processos de extração.

- Analisar e calcular o grau de cristalinidade e estabilidade térmica do P(3HB) antes do processo de extração.

- Ampliar a escala de extração.

- Realizar análises de DRX com as amostras submetidas ao ensaio de biodegradação para observar o surgimento ou não de picos adicionais ou ainda a transformação dos já existentes em picos mais agudos, como análise comprobatória de um rearranjo cristalino.

- Realizar análises de microscopia óptica com luz polarizada das amostras de P(3HB) degradadas e não degradadas para observar a formação de novos e pequenos cristalitos, buscando a comprovação de um rearranjo cristalino.

REFERÊNCIAS

- ABE, H., DOY, Y. Structural effects on enzymatic degradabilities for poly[α -3-hydroxybutyric acid] and its copolymers. **Inter J. of Biological Macromolecules**. 25: 185-192, 1999
- AKIYAMA, M.; TSUGE, T.; DOI, Y. Environmental life cycle comparison of PHA produced from renewable carbon sources by bacterial fermentation. **Polymer Degradation and Stability**. 80: 183 – 194, 1992.
- AMPE, F. **Métabolisme du benzoate chez *Alcaligenes eutrophus*: quels mécanismes physiologiques régulent la biodégradation des composés aromatiques?** . These (Doctorat spécialité: Microbiologie – Biotechnologie) – L'Institut National des Sciences appliquées de Toulouse, Toulouse. 1995.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbial Review**. 54: 450 – 472, 1990.
- ANDERSON, A.J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbial Review**. 54: 450 – 472, 1990.
- ANDRADE RODRIGUES, M. F.; VALENTIN, H. E.; BERGER, P. A.; TRAN, M.; ASRAR, J.; GRUYS, K. J.; STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoate accumulation in *Burkholderia* sp.: a molecular approach to elucidate the genes involved in the formation of two homopolymers consisting of short-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 53: 453-460, 2000.
- ARAGÃO, G. M. F. de. **Production de poly- β -hydroxyalkanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre dès cultures**. Toulouse. These du Doctorale (Sciences de la Vie), L'Institut National des Sciences appliquées de Toulouse, 1996.
- ASTAR, J.; GRUYS, K. J. Biodegradable polymer: Biopol[®]. **In: STEINBÜCHEL, A & DOI, Y. Biopolymers**. v.4. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.
- ASTM G160 (1998). **Evaluating microbial susceptibility of nonmetallic materials by laboratory soil burial**.
- BAPTIST, J.N. Process for preparing poly(β -hydroxybutyric acid). **U.S. Patent** 3044942, 1962.
- BERGER, E.; RAMSAY, B.A.; RAMSAY, J.A.; CHAVARIE, C.; BRAUNEGG, G. PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. **Biotechnol. Technol**. 3: 227-232, 1998.
- BILLMEYER Jr, F. W. **Textbook of polymer science**. 3 ed. New York: John Wiley & Sons, 1984.

BLOEMBERGEN, S. D. A *et al.* Studies of composition and cristalinity of bacterial poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate). **Macromolecules**.19: 2865-2871, 1986.

BOURQUE, D.; OUELLETTE, B.; ANDRE, G.; GROLEAU, D. Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from methanol: characterization of a new isolate of *Methylobacterium extorquens*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 37: 7-12, 1992.

BRANDL, H., BACHOFEN, R.; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E. Minireview: Degradation and applications of polyhydroxyakanoates. **Can. J. Microbiol.** 41: 143 – 153, 1995.

BRAUNNEG, G., SONNLEITNER, B., LAFFERTY, R. M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β – hydroxybutyric acid in microbial biomass. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 6: 29 – 37, 1978.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G. & GENSER, K.F.; Review article: Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology.** 65: 127-61, 1998.

BRUNS, R. E.; BARROS NETO, B.; SCRMINIO, I. S. **Planejamento e otimização de experimentos.** v.1. Campinas: Editora da Unicamp, 1995.

BYRDSON, J. A. **Plastics Materials.** 6 ed. London: British Library Cataloguing in Publication Data, 1995.

BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms; technology and economics. **Trends Biotechnology.** 5: 246 – 250, 1987.

CAMARGO, F. A. **Obtenção, caracterização e estudo de biodegradação de blendas de poli(3-hidroxi butirato-co-valerato) (PHBV) com lignina de bagaço de cana de açúcar.** Campinas. Dissertação de Mestrado (Faculdade de Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, 2003.

CAMPBELL, D. & WHITE, J. R. **Polymer Characterization.** London: Chapman & Hall, 1989.

CANEVAROLO, S.V. **Ciência dos Polímeros:** um texto básico para tecnólogos e engenheiros. São Paulo: ArtLiber Editora, 2002.

CHEN, Y.; YANG, H.; ZHOU, Q.; CHEN, J.; GU, G. Cleaner recovery of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus*. **Process Biochemistry**, 36: 501 – 506, 2001a.

CHEN, Y. XU, Q.; YANG, H.; GU, G. Effects of cell fermentation time and biomass drying strategies on the recovery of poly-3-hydroxyalkanoates from *Alcaligenes eutrophus* using a surfactant-chelate aqueous system. **Process Biochemistry**, 36: 773 – 779, 2001b.

CHOI, J. LEE, S. Y. Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. **Bioprocess Engineering**, 17: 335 – 342, 1997.

CHOI, J.; LEE, S.Y. Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. **Biotechnol. Bioeng.** 62: 546 – 553, 1999.

DOELLE, H.W. **Bacterial Metabolism.** New York .Academic Press, 1975.

DOI, Y.; KANESAWA, Y.; KUNIOKA, M. & SAITO, T. Biodegradation of Microbial Copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). **Macromolecules.** 23: 26-31, 1990.

DUARTE, M. A. T. **Estudo do processamento e da degradação térmica do poli(3-hidroxibutirato) e de suas blendas com poli(ϵ -caprolactona).** Joinville. Dissertação de Mestrado (Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade do Estado de Santa Catarina, 2004.

ELIGIO, R.; FREITAS, N. A.; OLIVEIRA, L. M. G. B.; SÁNCHEZ, R. P(HB-14%HV) microcapsule with antigen SAG1/P30 as a controlled release antigen delivery system. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Polímeros. **Anais.** Águas de Lindóia. 2005. Associação Brasileira de Polímeros.

FILHO, R.P.; ROSA, D.S.; CHUI, Q.S.H.; AGNELLI, J.A.M. Avaliação da biodegradação de PHB, PHB-V e PCL em solo compostado. Anais do VI Congresso Brasileiro de *Polímeros.* **Anais.** Gramado – RS, 1244-1247, 2001. Associação Brasileira de Polímeros.

FORMOLO, M. C.; VOGELSANGER JR, N.; SCHNEIDER, A. L.; FURLAN, S. A.; ARAGÃO, G. M. F.; PEZZIN, S. H.; PEZZIN, A. P.T. Biossíntese de polímero biodegradável: caracterização térmica e espectroscópica. Anais do VII Congresso Brasileiro de Polímeros. **Anais.** Belo Horizonte. 2003. Associação Brasileira de Polímeros.

FUKUI, T.; DOI, Y. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. **Appl Microbiol Biotechnol.** 49:333-336, 1998.

GALEGO, N.; ROZSA, C.; SANCHEZ, R.; FUNG, J.; TOMAS, J. S. Characterization and application of PHA family as composite materials. **Polymer Testing.** 19: 485 – 492, 2000.

GOMES, J. G. C. & BUENO NETTO, C. L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. **Revista Brasileira de Eng. Química.** 17: 24-29, 1997.

GOMEZ, J. G. C.; FONTOLAN, V.; ALLI, R. C. P.; RODRIGUES, M. F. A.; BUENO NETTO, C. L.; SILVA, L. F.; SIMÕES, D. A. Production of P3HB-co-3HV by soil isolated bacteria able to use sucrose. **Rev Microbiol,** v. 28, pg 43-48, 1997.

HAHN, S. K.; CHANG, Y. K.; KIM, B. S.; CHANG, H. N. Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. **Biotech. and Bioeng.** 44: 256 – 261, 1994.

HAHN, S. K.; CHANG, Y. K.; LEE, S. Y. Recovery and characterization of poly (3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli.* **Applied and Environmental Microbiology.** 61 (1): 34-39. 1995.

- HEJAZI, P.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; YAMINI, Y. Supercritical fluid dispersion of *Ralstonia eutropha* for Poly(β -hydroxybutyrate) recovery. **Biotechnol. Prog.** 19: 1519 – 1523, 2003.
- HIGGINS, D.; BEST, J.; JONES, J. **Biotechnology – principle and applications**. Oxford. Blackwell Scientific Publication, 1995.
- HOLMES, P. A.; LIM, G.B. Separation process. US **Patent** 4,910,14.
- IADEVAIA, S.; MANTZARIS, N. V. Genetic network driven control of PHBV copolymer compositiona. **J. of Biotechnol.** 122: 99 – 121, 2006.
- JENDROSSEK, D. Extracellular polyhydroxyalkanoate depolymerases: The key enzymes of PHA degradation. **In: STEINBÜCHEL, A & DOI, Y. Biopolymers.** v.3b. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.
- JENDROSSEK, D.; SCHIRMER, A.; SCHLEGEL, H. G. Biodegradation of polyhydroxyaldanoic acids. Mini-review. **Appl Microbial Biotechnol.** 46: 451 – 436, 1996.
- JIANG, X.; RAMSAY, J. A.; RAMSAY, B. A. Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440. **J. of Microbiol. Methods.** 67: 212 – 219, 2006.
- JONAS, R. & FARAH, L. F. Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation and Stability.** 59: 101 – 106,1998.
- KESSLER, B.; WITHOLT, B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 97-104, 2001.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. Statistical media optimization for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. **Process Biochemistry.** 40: 2173 – 2182, 2005.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A.K., Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. **Process Biochemistry**, 40: 2173 – 2182, 2005.
- KHOSRAVI-DARANI, K.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; SHOJAOSADATI, S. A. YAMINI, Y. Effect of process variables on supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* cells for poly(*R*-hydroxybutyrate) recovery. **Biotechnol. Prog.**, 20: 1757 – 1765, 2004.
- KIM, M.; CHO, K-S.; RYU, H. W.; LEE, E. G.; CHANG, Y. K. Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition sodium dodecyl sulfate. **Biotechnol. Letters**, 25: 55 – 59, 2003.
- KIM, P. S.; LEE, S. C.; LEE, S. Y.; CHANG, H. N.; CHANG, Y. K.; WOO, S. I. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. **Biotechnology and Bioengineering.** 43: 892 – 898, 1994.

- KOYAMA, N.; DOI, Y. Continuous production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**, 17: 281-284, 1995.
- KUMAGAI, Y.; DOI, Y. Enzymatic degradation of binary blends of microbial poly(3-hydroxybutyrate) with enzymatically active polymers. **Polymer Degradation and Stability**. 37: 253-256, 1992.
- LA CARA, F.; IMMIRZI, B.; IONATA, E.; MAZZELLA, A.; PORTOFINO, S.; ORSELLE, G.; PRISCO, P. P. Biodegradation of poly-ε-caprolactone/poli-β-hydroxybutyrate blend. **Polymer Degrad. and Stability**. 79: 37 – 43, 2003.
- LAGEVEEN, R. G. *et al.* Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans* : effect of substrates on formation and composition of poly- (R)- 3-hydroxyalkanoates and poli-(R)-3-hydroxyalkanoates. **Appl. Environ. Microbiol.** 54: 2924 – 2932, 1988.
- LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Production of Poly(hydroxyalkanoic acid). Review. **Biotechnology**.52: 28 – 57, 1995a.
- LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Production of poly(hydroxyalkanoic acid). **Advances in Biochemical Engineering**. 52: 27-57, 1995b.
- LEE, S. Y.; PARK, S. H.; HONG, S. H.; LEE, Y.; LEE, S. H. Fermentative production of building blocks for chemical synthesis of polyesters. **In: STEINBÜCHEL, A & DOI, Y. Biopolymers**. v.3b. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.
- LEE, S.Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Review: **Biotechnology and Bioengineering**. 49: 1 – 14,1996b.
- LEE, S.Y. Pláctic bacteria – progress and prospects fo polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Trends Biotechnology**. 14: 437 – 438. 1996a.
- LEE, S.Y.; CHOI, I.; WONG, H. H. Recent advancesin polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. **International Journal of Biological Macromolecules** . 25: 31 – 36, 1999.
- LEE, S.Y.; CHOI, J.; WONG, H.H. Recent advances in polyhydroxyakanoate production by bacterial fermentation: mini-reviu. **Internation Journal of Biological Macromolecules**. 25: 31 – 36, 1999.
- LIMA, J. A. **Blendas de poli(hidroxibutirato) e elastômeros de epiclorigrina**. Campinas. Dissertação de Mestrado (Departamento de Físico-Química), Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- LING, Y.; WONG, H. H.; THOMAS, C. J.; WILLIAMS, D. R. G.; MIDDELBERG, A. P. J. Pilot-scale extraction of PHB from recombinant *E. coli* by homogenization and centrifugation. **Bioseparation**, 7: 9 – 15, 1997.
- LING, Y.; WONG, H.H.; THOMAS, C.J.; WILLIAMS, D.R.G.; MIDDELBERG, A.P.J. Pilot-scale extraction of PHB from recombinant *E. coli* by homogenization and centrifugation. **Bioseparation**.7: 9 – 15, 1997.

- LUONG, J. H.T.; MULCHNDANI, A.; LEDUY, A. Batch Kinectis of microbial polyssacharide biosynthesis. **Biotechnol. and Bioeng.** 31: 639 – 646, 1988.
- MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Polímeros.** 2 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1999.
- MARANGONI, C. **Estudo de estratégias de produção de Poli(3-hidroxi butirato) por *Ralstonia eutropha* utilizando substrato de baixo custo e ácido propiônico.** Florianópolis. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, 2000a.
- MARANGONI, C.; FUGIRO Jr, A. ARAGÃO, G. M. F. The influence of source on the growth of *Ralstonia eutropha*, aiming at the production of polyhydroxyalkanoate. **Brazilian J. of Chemical Engen.**, 18: 175 – 180, 2001.
- MARANGONI, C.; FURIGO Jr, A.; ARAGÃO, G. M. F. Oleic acid improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerte) by *Ralstonia eutropha* in inverted sugar and propionic acid. **Biotechnology Letters.** 22: 1635 – 1638, 2000b.
- MARCHESSAULT, R.; YU, G. Crystalization and material properties of polyhydroxyalkanoates. **In: STEINBÜCHEL, A & DOI, Y. Biopolymers.** v.3b. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.
- MARCHESSAULT, R.; YU, G. Crystalization and material properties of polyhydroxyalkanoates. **In: STEINBÜCHEL, A & DOI, Y. Biopolymers.** v.3b. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.
- MEI, L. H. I; MARIANI, P. D. S. C. Visão geral sobre os polímeros ou plásticos ambientalmente degradáveis (PADs). Campinas: Editora da Unicamp, 2005.
- MERGAERT, J.; WEBB, A.; ANDERSON, C.; WOUTERS, A.; SWINGS, J. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3hydroxyvalerate) in soils. **Appl. Environment. Microbiol.** 59 (10): 3233 - 3238, 1993.
- MIDDELBERG, A. P. J. Process-scale disruption of microorganisms. **Biotechnol. Advances.** 13 (3): 491 – 551, 1995.
- MILLER, G. L. **Analytical Chemistry.** v31. *s.l.*, 1959.
- MIRALLES, J. **Ecologia Para Organizações Juvenis.** Lisboa: APCC, 1999.
- MOCHIZUKI, M. Properties and application of aliphatic polyester products. **In: STEINBÜCHEL, A & DOI, Y. Biopolymers.** v.4. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.
- MORANCHO, J. M.; RAMIS, X.; FERÁNDEZ, X.; CADENATO, A.; SALLA, J. M.; VALLÉS, A.; CONTAT, L.; RIBES, A. Calorimetric and thermogravimetric studies of UV-irradiated polypropylene/starch-based materials aged in soil. **Polymer Degrad. and Stability.** 91: 44 – 55, 2006.

NASCIMENTO, J. F. **Estudo da processabilidade e da caracterização do poli(3- ácido butírico) – PHB obtido a partir da cana-de-açúcar**. Campinas. Dissertação de Mestrado (Faculdade de Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, 2001.

NONATO, R.V.; MANTELATTO, P.E.; ROSSEL, C.E.V. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. Mini-Review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 57: 1 -5, 2001.

OLIVEIRA, L. M.; ARAÚJO, E. S.; GUEDES, S. M. L. Gamma irradiation effects on poly(hydroxybutyrate). **Polymer Degradation and Stability.** 91: 2157 – 2162.

ORTS, W.J.; MARCHESSAULT, R.H.; BLUHM, T.L. Thermodynamics of the melting point depression in poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) copolymers. **Macromolecules**, 24: 6435-6438, 1991.

OTAKE, Y.; KOBAYASHI, T.; ASBE, H.; MURAKAMI, N.; ONO, K. Biodegradation of low-density polyethylene, polystyrene, polyvinyl chloride and urea formaldehyde resin buried under soil for over 32 years. *J. Appl. Polym. Sci.* 56: 1789 – 1796, 1995.

PAGE, W.; CORNISH, A. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- β -hydroxybutyrate. *Appl. and Environ. Microbiol.* 59(2): 4236 – 4244, 1993.

PARRA, D. F.; FUSARO, J.; GABOARDI, F.; ROSA, D. S. Influence of poly(ethylene glycol) on the thermal, mechanical, morfological, physical-chemical and biodegradation properties of poly(3-hydroxybutyrate). **Polymer Degrad. and Stability.** 91: 1954 – 1959, 2006.

PEZZIN, A. P. T. **Obtenção e caracterização de blendas de poli(p-dioxanona)/poli(L-ácido láctico) (PPD/PLLA) para aplicação como prótese de menisco bioreabsorvível**. Campinas. Tese de Doutorado (Engenharia Mecânica), Universidade Estadual de Campinas, 2001.

PEZZIN, A. T. P.; ZAVAGLIA, C. A. C. DUEK, E. A. R. Estudo da degradação *in vitro* de blendas de poli(p-dioxanona)/poli(L-ácido láctico) (PPD/PLLA) preparadas por evaporação de solvente. **Polímeros Ciência e Tecnologia.** 12 (4): 285 – 294, 2002.

PRADELLA. J. G. C. *et al.* Controle da Biossíntese de poli-3-hidroxiácidoalcanoatos bacterianos através do fluxo de substratos. *Anais do VII Congresso Brasileiro de Polímeros.* **Anais.** Belo Horizonte. 1055 – 1056, 2003.

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

RAMSAY, J.A.; BERGER, E.; VOYER, R.; CHAVARIE, C.; RAMSAY, B. A. Extraction of PHB using chlorinated solvents. **Biotechnol. Tech.** 7: 9 – 15, 1994.

RATTEDGE, C.; KRISTIANSEN, B. Basic biotechnology. 2 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2001.

- REDDY, C.S.K. *et al.* Polyhydroxyalkanoate: an overview. Review paper. *Elsevier*. 87: 137 -146, 2003.
- REE, Y. H.; KIM, G. J.; YUN, K. Y.; BAE, K.S. Accumulation of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes sp* SH – 69 in batch culture. *Biotechnology Letters*. 14: 27 – 32, 1992.
- REHM, H. J., REED, G. **Biotechnology**. v.6 Weinheim: VCH, 1988.
- REUTZ, I.; SCHOBERT, P.; BOWIEN, B. Effect of phosphoglycerate mutase deficiency metabolism of *Alcaligenes eutrophus*. *Journal Bacteriol*. 151: 8 – 14, 1982.
- RIJK, T. C.; MEER, P. V.; EGGINK, G.; WEUSTHUIS, R. A. Methods for analysis of poly(3-hydroxyalkanoate) composition. **In:** STEINBÜCHEL, A & DOI, Y. **Biopolymers**. v.3b. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.
- RODRIGUES, R. C. **Condições de cultura para a produção de poli(3-hidroxiutirato) por *Ralstonia eutropha* a partir de resíduos de indústrias de alimentos**. Florianópolis, Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.
- ROSA, D. S.; ROSA, M. I. F. P. S.; CARRARO, G.; RENTEADO, D. F. Caracterização das propriedades térmicas e morfológicas de polímeros biodegradáveis. **Projeções** (Bragança Pta). 7: 85 – 90, 1999.
- SADER, M. S; FERREIRA, M.; DIAS, M. Filmes de poli(3-hidroxibutirato): síntese e caracterização morfológica. Anas do VI Congresso Brasileiro de Polímeros. **Anais**. Gramado – RS, 1244-1247, 2001. Associação Brasileira de Polímeros.
- SAITO, T.; KOBAYASHI, T. Intracellular degradation of PHAs. **In:** STEINBÜCHEL, A & DOI, Y. **Biopolymers**. v.3b. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.
- SANTOS, C. E. O., RODRIGUES, T. C., ROSA, D. S., CALIL, M. R. O efeito da irradiação UV – B na biodegradação dos polímeros PCL e PHB. **In:** 6º Congresso Brasileiro de Polímeros. **Anais**. Belo Horizonte. 2001, Associação Brasileira de Polímeros.
- SCHNEIDER, A. L. S. **Síntese, caracterização e biodegradação de poli-3-hidroxibutirato – P(3HB) de *Ralstonia eutropha* e blendas de P(3HB)/PCL (poli- ϵ -caprolactona)**. Florianópolis. Tese de Doutorado (Departamento de Engenharia Química e de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
- SCHNEIDER, A. L. S., FURLAN, S. A., MERKLE, R., CARVALHOJONAS, M. F., JONAS, R. Optimization of pH, temperature and inoculum ratio for the production of b-D-galactosidase by *K marxianus* using a lactose free-medium. **Acta Biotechnologica**. Alemanha , 21 (1): 57 - 64, 2001.
- SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; TORRES, B. B. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) production by *Burkholderia sp*. **Journal of Biotechnology**, v. 76, p. 165-174, 2000.

SPIER, V. C. **Caracterização espectroscópica e cromatográfica de copolímeros biodegradáveis**. Joinville. Dissertação de Mestrado (Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade do Estado de Santa Catarina, 2005.

SQUIO, C. **Estratégias de alimentação e utilização de suplementos nutricionais na produção de poli(3-hidroxibutirato-co-3-valerato) por *Ralstonia eutropha***. Florianópolis. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. 2003.

STEINBÜCHEL, A. & DOI, Y. **Biopolymers**. v.3. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.

STEINBÜCHEL, A.; VALENTIM, H.E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiol Lett**. 128: 219-228, 1995.

STEVENS, M. M.; QANADILO, J. F.; LANGER, R.; PRASAD SHASTRI, V. A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering. **Biomaterials**. 25 (5): 887 - 894, 2004.

SUAVE, J.; D'ALLAGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T. P.; SILVA, D. A. K.; SOLDI, V.; MEIER, M. M. Microencapsulação do pesticida malathion em polímeros biodegradáveis: caracterização e ensaios de liberação. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Polímeros. **Anais**. Águas de Lindóia. 2005. Associação Brasileira de Polímeros.

SUDESH, K. ABE H. DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Science**. 25: 1503 – 1555, 2000.

TAGUCHI, K.; TAGUCHI, S.; SUDESH, K.; MACHARA, A.; TSUGE, T. DOI, Y. Metabolic pathways and engineering of PHA biosynthesis. **In: STEINBÜCHEL, A & DOI, Y. Biopolymers**. v.4. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.

TANAKA, K., ISHIZAKI, A., KANAMARU, T., KAWANO, T. Production of poly- (D-3- hydroxybutirate) from CO₂, H₂ and O₂ by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnol. Bioeng**. 45: 268 – 275, 1994.

TONIAZZO, T. **Biodegradação em solo de novos copolímeros pet pós-consumo e poli (adipato de etileno) (pet-co-pea)**. Joinville. Trabalho de Conclusão de Curso (Química Industrial), Universidade da Região de Joinville, 2005.

TSUJI, H.; IKADA, Y. Blends of aliphatic polyesters. 1. Physical properties and morphologies os solution-cast blens from poly(DL-lactide) and poly(ϵ -caprolactone), **J. Applied Polym. Sci**. 60: 2367-2375, 1996

VANIN, M.; SANTANA, C. C.; TORRANI, I. L.; PRIVELIC, T.; DUEK, E. A. R. Estudo da degradação *in vitro* de blendas de poli(β -hidroxibutirato) (PHB)/poli(L-ácido láctico) (PLLA) na forma de filmes. **Polímeros Ciência e Tecnologia**. 14 (3): 187 – 193, 2004.

VASCONCELOS, Y. Plástico de açúcar. **Revista Pesquisa FAPESP**, São Paulo. Disponível em:

http://www.revistapesquisa.fapesp.br/show.php?id=revistas1.fapesp1..20021001.20021080.SEC7_4>. Acesso em: novembro de 2002.

VIVEIROS, M. Bagaço vira plástico biodegradável. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 02 de novembro de 2002. Disponível em:

<http://www.ipt.br/imprensa/midia/?ID=962>>. Acesso em novembro de 2002.

VOGELSANGER, N., FORMOLO, M.C., PEZZIN A.P.T., SCHNEIDER A.L.S., FURLAN S.A., BERNARDO H. P., PEZZIN S.H., PIRES A.T.N., DUEK, E.A.R. **Materials Research**, 6: 359-365, 2003.

VOGELSANGER, N., FORMOLO, M.C., PEZZIN A.P.T., SCHNEIDER A.L.S., FURLAN S.A., BERNARDO H. P., PEZZIN S.H., PIRES A.T.N., DUEK, E.A.R. **Materials Research**, 6: 359-365, 2003.

VOGELSANGER, N; FORMOLO, M. C.; FURLAN, S. A.; SCHNEIDER, A. L.; PEZZIN, S. H.; PEZZIN, A. P. T. Biodegradabilidade em solo de blendas de poli(3-hidroxiobutirato) e poli(ϵ -caprolactona). Anais do XI Encontro da Química da Região Sul. **Anais**. Pelotas. 2003b. XI Encontro de Química da Região Sul.

WANG, F.; LEE, S.Y. Poly(3-hydroxybutyrate) production with high polymer content by fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 3703 – 3706, 1997.

WARD, P. G.; O'CONNOR, K, E. Bacterial synthesis of polyhydroxyalkanoates containing aromatic and aliphatic monomers by *Pseudomonas putida* CA-3. **Biological Macromolecules**. 35: 127 – 133, 2005.

WENDLANDT, W.W. & GALLAGHER, P.K., In TURI, E.A. **Thermal Characterisation of Polymeric Materials**. Orlando: Academic Press, 1981.

WILLIAMS, S. F.; MARTIN, D. P. Applications of PHAs in medicine and pharmacy. In: STEINBÜCHEL, A & DOI, Y. **Biopolymers**. v.4. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.

WILLIAMS, S.F.; MARTIN, D. P.; HOROWITZ, D.M.; PEOPLES, O.P. **PHA applications: addressing the price performance issue. I. Tissue engineering**. Inter. J. of Biological Macromolecules. 25: 111 – 121, 1999.

XU, J.; GUO, B. H.; YANG, R.; WU, Q.; CHEN, G. Q.; ZHANG, Z. M. In situ FTIR study on melting and crystallization of polyhydroxyalkanoates. **Polymer**. 43: 6893 – 6899, 2002.

YAMANE, T.; FUKUNAGA, M.; LEE, Y.W.. Increased PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB producer, **Biotechnol. Bioeng.**, 50: 197-202, 1996.

YOSHIE, N.; INOUE, Y. Structure, composition and solution properties of PHAs. In: STEINBÜCHEL, A & DOI, Y. **Biopolymers**. v.3b. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.

YU, J.; SI, Y. Metabolic Carbon Fluxes and Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates in *Ralstonia eutropha* on Short Chain Fatty Acids. **Biotechnolog. Prog.**, 20: 1015 – 1024, 2004.

www.biocycle.com.br Acessado em 20/04 de 2006.

www.ouraycolorado.com Acessado em 09/09 de 2006.

www.plasticsnews.com Acessado em 09/09 de 2006.

ANEXO 1

Curvas de correlação

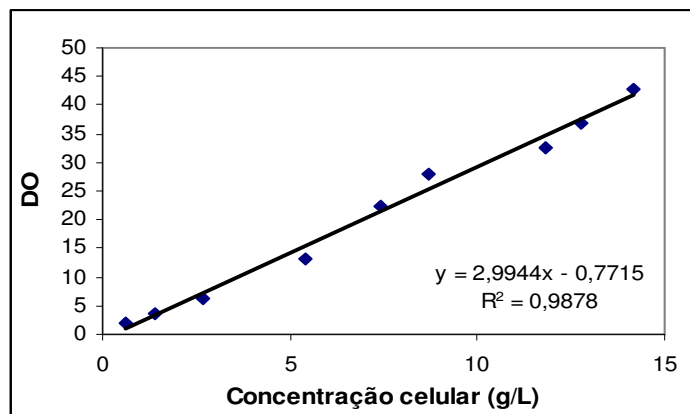


Figura A.1: Curva de correlação abs X peso seco para as células de *C. necator*.

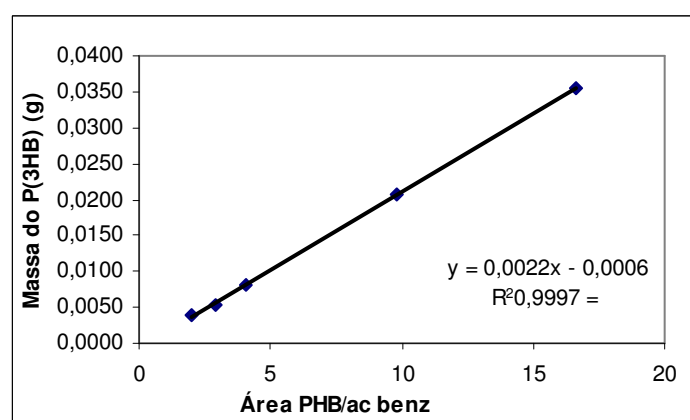


Figura A.2: Curva padrão típica para determinação da concentração de P(3HB).

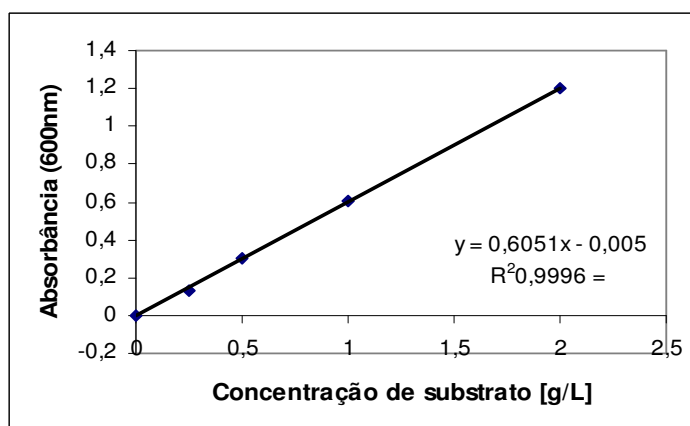


Figura A.3: Curva padrão para determinação da concentração de substrato.

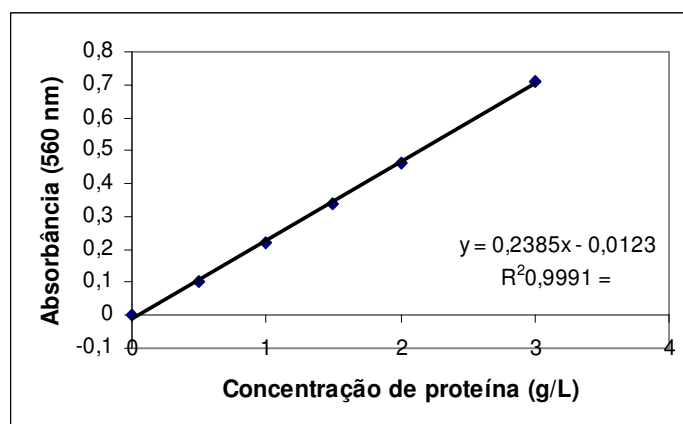


Figura A.4: Curva padrão para determinação da concentração de proteína.

Figura A.5: Curva de correlação Log Mw X tempo de retenção para cálculo de massa molar do P(3HB)

ANEXO 2

Curvas de consumo de O₂ e substrato

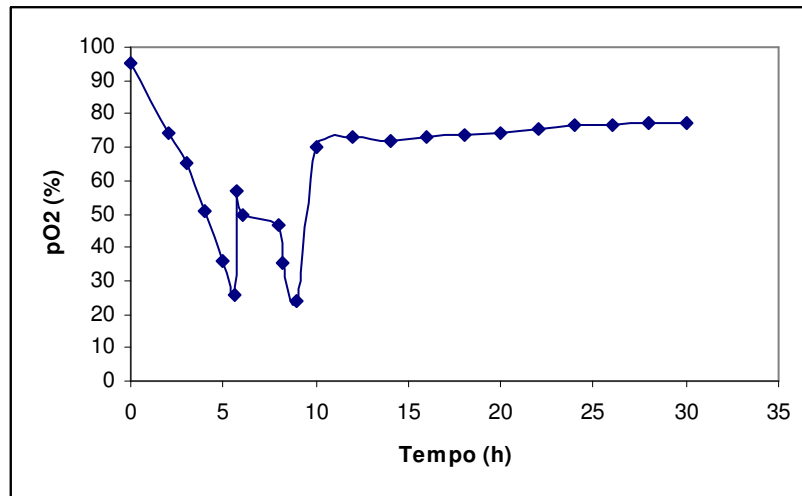


Figura B.1: Evolução do consumo de O₂ (expresso em pO₂%) do cultivo em batelada alimentada de *Cupriavidus necator* a 30°C.

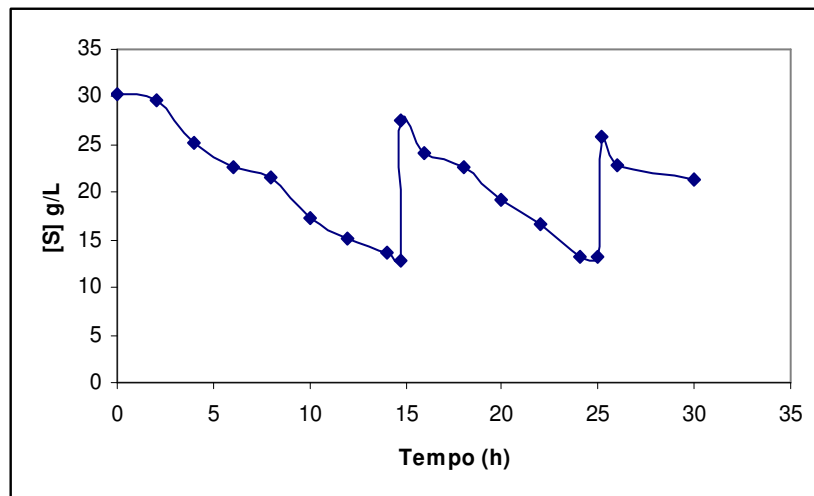


Figura B.2: Evolução do consumo de substrato do cultivo em batelada alimentada de *Cupriavidus necator* a 30°C.