

FRANCIELI DALCANTON

**PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POLI(3-
HIDROXIBUTIRATO) POR *Ralstonia eutropha* EM DIFERENTES
SUBSTRATOS**

FLORIANÓPOLIS – SC

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POLI(3-
HIDROXIBUTIRATO) POR *Ralstonia eutropha* EM DIFERENTES
SUBSTRATOS**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Gláucia Maria Falcão de Aragão

FRANCIELI DALCANTON
Engenheira de Alimentos

Florianópolis, 31 março de 2006

“Produção, extração e caracterização de Poli(3- hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos”

Por

Francieli Dalcanton

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof^ª. Dr^ª. Gláucia Maria Falcão de Aragão
Orientadora

Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus
Coordenador do CPGEA

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Gláucia Maria Falcão de Aragão

Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior

Prof^ª. Dr^ª Ana Paula Testa Pezzin

Prof^ª. Dr^ª Regina Vasconcellos Antônio

Florianópolis, 31 março de 2006.

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis, SC.

“Se eu pudesse deixaria algum presente a você,
deixaria aceso o sentimento de amar
a vida dos seres humanos.
A consciência de aprender tudo
o que foi ensinado pelo tempo a fora.
Lembraria os erros que foram cometidos
para que não mais se repetissem.
A capacidade de escolher novos rumos.
Deixaria para você, se pudesse,
o respeito àquilo que é indispensável:
Além do pão, o trabalho.
Além do trabalho, a ação.
E, quando tudo mais faltasse, um segredo:
O de buscar no interior de si mesmo
a resposta e a força para encontrar a saída.”

Mahatma Gandhi

“Nunca, jamais desanimeis,
Embora venham ventos contrários!”

Santa Paulina

Dedico este trabalho à minha mãe e à memória de meu pai.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir concretizar mais um sonho e dar mais um passo em minha caminhada.

À professora orientadora, Gláucia, pela grande contribuição nesta etapa da minha formação, sua presença marcante e idéias estimulantes foram decisivas e conquistaram minha admiração, respeito e amizade.

Aos colegas e amigos do projeto PHB, Jaciane, Mônica, Ricardo, Fabian, pela ajuda fundamental neste trabalho, a cada um meu sincero Muito Obrigada.

Aos professores Agenor e Ana Paula, por aceitarem participar da defesa desta dissertação, enriquecendo este trabalho.

À minha mãe, Maria Gessi, pelo exemplo de luta e de bondade, por cada palavra amiga e de carinho e por estar sempre presente apesar da distância. Aos meus queridos irmãos, Rodrigo e Sidnei, as minhas cunhadas e meus sobrinhos, por simplesmente existirem e fazerem parte da minha vida de uma maneira tão alegre e doce. Obrigada por acreditarem em mim.

À Franciny e ao Bruno, por serem amigos-irmãos, pela companhia em longas noites de trabalho, pelo incentivo, presença, conversas, ajuda na dissertação e pela amizade verdadeira.

Aos meus amigos Bianca, Priscilla, Patty, Déia, Gustavo, Fabrício, pelas conversas, risadas, apoio, amizade e pela presença especialmente nos momentos difíceis.

Aos colegas do ENGEBIO, pela compressão, ajuda e incentivo.

À CAPES por ter financiado esta pesquisa.

À UFSC pela oportunidade do desenvolvimento da mesma.

À todas as pessoas e situações que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, as quais, direta ou indiretamente, participaram da minha formação como profissional e ser humano, a minha eterna gratidão.

RESUMO

Poli(3-hidroxi-butirato), P(3HB), é um biopolímero acumulado por muitos microrganismos como reserva de carbono e energia, em determinadas condições. Possui propriedades termoplásticas semelhantes às dos plásticos petroquímicos e a vantagem de ser biocompatível e completamente biodegradável. Entretanto, possui custo elevado de produção frente aos plásticos convencionais, o que limita seu uso. Algumas estratégias de produção de P(3HB) por *Ralstonia eutropha* foram estudadas, com o objetivo de aumentar a produção do polímero, visando a redução de seus custos. Neste trabalho teve-se por objetivo a melhoria das condições de cultura para o crescimento e produção de P(3HB) por *R. eutropha* em diferentes substratos. Uma das estratégias utilizadas foi a realização de cultivos a diferentes temperaturas. Além da utilização de um substrato de baixo custo, um novo método de extração de P(3HB) também foi estudado, visando a redução de poluentes e o custo de produção. Primeiramente, a modelagem matemática do crescimento da bactéria foi utilizada para estimar os parâmetros: velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}), tempo da fase lag (λ) e aumento logarítmico da população (A), utilizando-se resíduo amiláceo e glicose (padrão) como substrato. Utilizaram-se três modelos primários de crescimento e o modelo de Gompertz Modificado, foi o que melhor se ajustou às curvas de crescimento da bactéria, nas diferentes fontes de carbono testadas. Pelo modelo de Gompertz Modificado foi possível prever o momento da limitação de nitrogênio nas culturas. Não houve ajuste de nenhum dos modelos secundários aos parâmetros de crescimento μ e A nos substratos testados, somente foi possível modelar o efeito da variação da temperatura sobre o parâmetro λ , nos cultivos em resíduo amiláceo, com suplementação. Foi estudada a produção de P(3HB) nos substratos de glicose e resíduo amiláceo, e também a suplementação do meio de cultivo com óleo de soja, visando aumentar a produção de polímero. O resíduo amiláceo mostrou-se uma boa fonte de carbono para a produção de P(3HB). A suplementação aumentou o conteúdo de biopolímero em 6,1 e 8% nos cultivos a 30 e 35°C, respectivamente e, nos cultivos em glicose o aumento foi de 11,7 e 13,7% a 30 e 35°C, respectivamente. Nos cultivos a 35°C, a quantidade de P(3HB) e de células foram superiores em relação ao cultivo a 30°C. Foi possível desenvolver um método de extração simples, utilizando somente clorofórmio como solvente, juntamente com os processos de agitação e aquecimento. O melhor tempo determinado para a extração foi de 2 horas, visto que o filme de P(3HB) apresentou 98% de pureza e 94% de recuperação, com menor cristalinidade, maior estabilidade térmica e alta massa molar, em relação aos outros tempos de extração testados. A caracterização também foi realizada para os filmes de P(3HB) dos cultivos em resíduo amiláceo que apresentaram propriedades muito próximas aos obtidos em glicose. Somente os cultivos com suplementação de óleo apresentaram características diferentes.

Palavras-chave: *Ralstonia eutropha*, P(3HB), suplemento nutricional, temperatura de cultivo, extração.

ABSTRACT

Poly(3-hydroxybutyrate), P(3HB), is a biopolymer accumulated by many microorganisms, as carbon and energy storage, under established conditions. P(3HB) has thermoplastic properties similar to those of the conventional plastics and the advantage of being biocompatible and totally biodegradable. However, its high cost of production related to conventional plastics limits its use. Some strategies for production of P(3HB) by *Ralstonia eutropha* were studied, aiming to increase polymer production, and seeking costs reduction. In this work, the target was to improve the culture conditions for growth and production of P(3HB) by *Ralstonia eutropha* in different substratum. One of the strategies was to use different culture temperatures. Beyond the utilization of a low cost substrate, a new extraction method was studied, aiming the reduction of pollutant and production costs. Firstly, the mathematical modeling of bacteria growth was used to estimate the following parameters: specific maximum growth rate (μ_{\max}), time of lag phase (λ) and logarithmic increase of population (A), using starchy waste and glucose (standard) as carbon source. Three primary growth models were used, and the 'Modified Gompertz' model was present the best fit to the growth curves of the bacteria, on the different carbon sources tested. Through the 'Modified Gompertz' model, it was possible to establish the moment of nitrogen limitation in the culture. There was no adjustment of any of the secondary models to the growth parameters μ and A on the tested substrate. It was only possible to model the effect of temperature variation over the λ parameter, on the cultures in starchy waste, with supplementation. The production of P(3HB) was carried out on glucose and starchy waste, and also the supplementation of the culture with soybean oil, aiming to increase P(3HB) production. The starchy waste showed to be a good carbon source for P(3HB) production. The supplementation increased the P(3HB) content in 6.1 and 8% in the cultures at 30 and 35°C, respectively and the increase in the glucose cultures was of 11.7 and 13.7% in the cultures at 30 and 35°C. In the cultures at 35°C, the P(3HB) and cell contents were superior when compared to the cultures at 30°C. A simple extraction method was developed using only chloroform as solvent in association with agitation and heating. The best time verified for the extraction was of 2 hours, because the P(3HB) film showed 98% of purity and 94% of recuperation, with lower crystallinity, higher thermal stability and high molar mass. The characterization was also realized for the P(3HB) films produced on starchy waste cultures and they presented characteristics very similar to those obtained on glucose. Only the cultures with soybean oil showed different characteristics.

Key words: *Ralstonia eutropha*, P(3HB), nutritional supplementation, temperature of the culture, extraction.

SUMÁRIO

1	<u>INTRODUÇÃO</u>	1
2	<u>REVISÃO DA LITERATURA</u>	5
2.1	A BIODEGRADABILIDADE COMO ALTERNATIVA AO PROBLEMA AMBIENTAL	5
2.2	DESCRIÇÃO DOS POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA'S)	6
2.2.1	CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES	6
2.3	MICROORGANISMOS PRODUTORES	10
2.4	DESCRIÇÃO GERAL DE <i>RALSTONIA EUTROPHA</i>	13
2.5	METABOLISMO EM <i>RALSTONIA EUTROPHA</i>	14
2.5.1	METABOLISMO DURANTE O CRESCIMENTO BALANCEADO	14
2.5.2	BIOSSÍNTESE DE P(3HB)	14
2.5.3	DEGRADAÇÃO INTRACELULAR DE P(3HB)	17
2.6	BIODEGRADABILIDADE	20
2.7	APLICAÇÕES	21
2.8	CUSTOS DA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS	22
2.8.1	PRODUTIVIDADE DE PHA'S	23
2.8.2	CONTEÚDO DE PHA'S NAS CÉLULAS	24
2.8.3	CUSTO DO SUBSTRATO	24
2.8.4	CUSTOS DE EXTRAÇÃO	28
2.8.5	ESTRATÉGIAS DE SUPLEMENTAÇÃO	32
2.9	MODELAGEM MATEMÁTICA	33
2.9.1	MODELOS PRIMÁRIOS	34
2.9.2	MODELOS SECUNDÁRIOS	35
2.10	CARACTERIZAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS	36
2.11	PRODUÇÃO DE POLÍMERO BIODEGRADÁVEL NO BRASIL	38
3	<u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	40
3.1	MICROORGANISMO	40
3.2	MEIOS DE CULTURA	40
3.3	CONDIÇÕES DE CULTURA	42
3.3.1	PRÉ-CULTURAS	42
3.3.2	CULTURAS EM FRASCOS AGITADOS	42
3.3.3	CULTURA EM BIORREATOR	43

3.3.4	FONTES DE CARBONO	43
3.3.5	ALIMENTAÇÃO COM ÓLEO DE SOJA	44
3.4	TÉCNICAS ANALÍTICAS	45
3.4.1	AMOSTRAGEM	45
3.4.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA	45
3.4.3	DOSAGEM DE AÇÚCARES	46
3.4.4	DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO	47
3.4.5	DOSAGEM DE P(3HB)	48
3.5	EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE P(3HB)	49
3.5.1	EXTRAÇÃO DE P(3HB)	49
3.5.2	DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE PUREZA E PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DE P(3HB)	49
3.5.3	CARACTERIZAÇÃO DE P(3HB)	50
3.6	MODELAGEM DO CRESCIMENTO MICROBIANO	51
3.6.1	MODELOS PRIMÁRIOS	51
3.6.2	MODELOS SECUNDÁRIOS	54
3.6.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1	MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE <i>RALSTONIA EUTROPHA</i> EM RESÍDUO AMILÁCEO E GLICOSE PARA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS	57
4.1.1	MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE <i>R. EUTROPHA</i> CULTIVADA EM RESÍDUO AMILÁCEO	57
4.1.2	MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE <i>R. EUTROPHA</i> CULTIVADA EM RESÍDUO AMILÁCEO COM SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL	61
4.1.3	MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE <i>RALSTONIA EUTROPHA</i> CULTIVADA EM GLICOSE	64
4.1.4	MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE <i>R. EUTROPHA</i> CULTIVADA EM GLICOSE COM SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL	66
4.2	UTILIZAÇÃO DO MODELO DE GOMPertz MODIFICADO PARA PREVER O MOMENTO DA LIMITAÇÃO DA CULTURA	69
4.3	INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE OS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO: $\mu_{MÁX}$, λ E A	72
4.4	PRODUÇÃO DE P(3HB) UTILIZANDO COMO FONTE DE CARBONO RESÍDUO AMILÁCEO E GLICOSE EM MEIOS COM E SEM SUPLEMENTAÇÃO DE ÓLEO DE SOJA EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE CULTIVO	78
4.5	DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE P(3HB) DE CÉLULAS DE <i>R. EUTROPHA</i>	84
4.5.1	MÉTODO DE EXTRAÇÃO - TESTES PRELIMINARES	84

4.5.2	CULTURA EM BIORREATOR PARA A EXTRAÇÃO DAS CÉLULAS CONTENDO P(3HB)	87
4.5.3	PADRONIZAÇÃO DO NOVO MÉTODO DE EXTRAÇÃO	88
4.5.4	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES OBTIDOS PELO NOVO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE P(3HB)	91
4.6	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE P(3HB) OBTIDOS A PARTIR DOS CULTIVOS UTILIZANDO RESÍDUO AMILÁCEO COMO FONTE DE CARBONO	99
4.6.1	CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)	99
4.6.2	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)	100
4.6.3	CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC)	102
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	104
	REFERÊNCIAS DA LITERATURA	107
	ANEXOS	118
	ANEXO I	119
	ANEXO II	130

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Estrutura geral dos PHA's para diferentes monômeros. Fonte: Lee, 1996a	7
Figura 2.2 - <i>Ralstonia eutropha</i> em fase de crescimento (a), Fonte: Ampe, 1995; e fase de produção (b), Fonte: Sudesh et al., 2000, a barra representa 0,5 μm .	13
Figura 2.3 - Produtos do acetil-CoA em condições de crescimento balanceado e de excesso de carbono. Fonte: Byrom, 1987.	15
Figura 2.4 - Via de síntese de P(3HB) por <i>R. eutropha</i> e seu circuito regulatório. Fonte: Kessler e Witholt (2001).	19
Figura 2.5 - Biociclo de polihidroxialcanoatos. Fonte: METABOLIX, 2004.	21
Figura 3.1 - Shaker Certomat BS-1 utilizado nas culturas de <i>R. eutropha</i> em frascos agitados.	42
Figura 3.2 - Biorreator Bioflo 110 utilizado no experimento.	43
Figura 3.3 – Curva típica de crescimento microbiano em função do tempo, apresentando os parâmetros biológicos de crescimento.	52
Figura 4.1- Curvas de crescimento de <i>R. eutropha</i> em resíduo amiláceo expressa em $\ln(\text{abs}/\text{abs}_0)$ pelo tempo nas temperaturas de 30°C (\square), 35°C (\blacksquare) e 40°C (\blacktriangle). As linhas representam o modelo de Gompertz Modificado ajustado aos dados experimentais.	59
Figura 4.2 - Curvas de crescimento de <i>R. eutropha</i> em resíduo amiláceo com suplementação de óleo de soja expressa em $\ln(\text{abs}/\text{abs}_0)$ pelo tempo nas temperaturas de 30°C (\square), 35°C (\blacksquare) e 40°C (\blacktriangle). As linhas representam o Modelo de Gompertz Modificado ajustado aos dados experimentais. (\downarrow) representa o momento da suplementação com óleo de soja.	62
Figura 4.3 - Curvas de crescimento de <i>R. eutropha</i> em glicose expressa em $\ln(\text{abs}/\text{abs}_0)$ pelo tempo nas temperaturas de 30°C (\square), 35°C (\blacksquare) e 40°C (\blacktriangle). As linhas representam o modelo de Gompertz Modificado ajustado aos dados experimentais.	65
Figura 4.4 - Curvas de crescimento de <i>R. eutropha</i> cultivadas em glicose a 30°C, sem suplementação de óleo de soja (\blacksquare) e com suplementação de óleo de soja, equivalente a 0,6 g.L ⁻¹ em ácido oléico (\square). As linhas representam o modelo de Gompertz Modificado ajustado aos dados experimentais.	67
Figura 4.5 - Curvas de crescimento de <i>R. eutropha</i> em glicose com suplementação de óleo de soja expressa em $\ln(\text{abs}/\text{abs}_0)$ pelo tempo nas temperaturas de 30°C (\square), 35°C (\blacksquare) e 40°C (\blacktriangle). As linhas representam o modelo de Gompertz Modificado ajustado aos dados experimentais. A suplementação com óleo de soja foi realizada com 12 horas de cultivo (\downarrow).	68

- Figura 4.6 - Acompanhamento do μ pelo tempo (—) e consumo de nitrogênio pelo tempo (—) nos cultivos utilizando a glicose como fonte de carbono, nas seguintes condições: (a) cultivo a 30°C; (b) cultivo a 35°C; (c) cultivo a 30°C com suplementação de óleo de soja; (d) cultivo a 35°C com suplementação de óleo de soja. _____ 71
- Figura 4.7 - Efeito da temperatura na duração da fase lag para os modelos: Linear, Raiz Quadrada, Equação de Arrhenius e Weibull nos cultivos em resíduo amiláceo com suplementação nutricional. _____ 74
- Figura 4.8 - Curvas de crescimento de *R. eutropha* em glicose expressa em $\ln(\text{abs}/\text{abs}_0)$ pelo tempo nas temperaturas de 30°C (□), 32,5°C (◆), 35°C (■), 37,5°C (○) e 40°C (▲). As linhas representam o modelo de Gompertz Modificado ajustado aos dados experimentais. _____ 76
- Figura 4.9 - Efeito da temperatura na velocidade específica máxima de crescimento para os modelos: Linear, Raiz Quadrada, Equação de Arrhenius e Weibull nos cultivos em glicose com cinco temperaturas de cultivo. _____ 77
- Figura 4.10 - Evolução da produção de P(3HB) em função do tempo de cultivo para a cultura com suplementação de óleo (■) e sem suplementação de óleo (□) nas temperaturas de cultivo de 30°C (a), 35°C (b) e 40°C (c). (↓) representa o momento da adição do óleo de soja. ____ 79
- Figura 4.11 - Concentração final de P(3HB) para os cultivos realizados em resíduo amiláceo e glicose nas temperaturas de 30°C e 35°C. No cultivo realizado em glicose com suplementação a 30°C foi adicionado o dobro da quantidade de óleo em relação aos outros experimentos. _ 81
- Figura 4.12 - Filme de P(3HB) extraído do cultivo em glicose/frutose a partir do método baseado em preparação de blendas poliméricas. _____ 85
- Figura 4.13 - Ajuste do modelo de Gompertz Modificado à curva de crescimento de *R. eutropha* em glicose, expressa em $\ln(\text{Abs}/\text{Abs}_0)$ pelo tempo em biorreator. _____ 87
- Figura 4.14 - Esquema do novo método de extração de P(3HB) variando o tempo de extração. _____ 88
- Figura 4.15 - Filmes de P(3HB) extraídos a partir do novo método de extração em 1 hora (a), 2 horas (b) e 3 horas de extração (c). _____ 89
- Figura 4.16 - Curvas de TGA dos filmes de P(3HB) extraídos pelo novo método, em diferentes tempos de extração, juntamente com o filme da PHB Industrial. _____ 94
- Figura 4.17 - Cromatogramas obtidos para análise de massa molar, área do pico *versus* tempo de retenção em min, para as amostras: PHB-5: amostra da PHB Industrial; PHB-I: 3 horas de extração; PHB-V: 1 hora de extração; PHB-VII: 2 horas de extração. _____ 96

Figura 4.18 - Curvas de TGA dos os filmes de P(3HB) extraídos pelo novo método, nos cultivos em resíduo amiláceo nas temperaturas de 30°C e 35°C, com suplementação de óleo (c/o) e sem suplementação (s/o), e do filme da PHB Industrial. _____ 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Comparação entre as propriedades dos polímeros. _____	8
Tabela 2.2 - Produção de PHA`s em várias bactérias. _____	12
Tabela 2.3: Biodegradação de um filme de 1mm de P(3HB-co-3HV) em diferentes ambientes. _____	20
Tabela 3.1 – Composição do meio MM. _____	41
Tabela 3.2 - Composição da solução concentrada de oligoelementos. _____	41
Tabela 3.3 - Procedimento de determinação de nitrogênio amoniacal. _____	47
Tabela 4.1 - Valores dos índices estatísticos para os modelos de Gompertz, Gompertz Modificado e Logístico, aplicados às curvas de crescimento de <i>R. eutropha</i> em resíduo amiláceo. _____	58
Tabela 4.2 - Parâmetros obtidos pelo ajuste do modelo de Gompertz Modificado para o crescimento de <i>R. eutropha</i> em resíduo amiláceo. _____	60
Tabela 4.3 - Valores dos índices estatísticos para os modelos de Gompertz, Gompertz Modificado e Logístico, aplicados as curvas de crescimento de <i>R. eutropha</i> em resíduo amiláceo com suplementação de óleo. _____	61
Tabela 4.4 - Parâmetros de crescimento obtidos do modelo de Gompertz Modificado para os cultivos em resíduo amiláceo com suplementação de óleo de soja. _____	63
Tabela 4.5 - Valores dos índices estatísticos para os modelos de Gompertz, Gompertz Modificado e Logístico, aplicados as curvas de crescimento de <i>R. eutropha</i> em glicose. ____	64
Tabela 4.6 - Parâmetros obtidos pelo modelo de Gompertz Modificado para os cultivos em glicose. _____	65
Tabela 4.7 - Parâmetros obtidos do modelo de Gompertz Modificado para os cultivos em glicose com adição de óleo de soja. _____	68
Tabela 4.8 - Parâmetros de crescimento de <i>Ralstonia eutropha</i> utilizando glicose como fonte de carbono, com e sem suplementação de óleo de soja. _____	70
Tabela 4.9 - Valores de tempo, onde a velocidade específica de crescimento é máxima e onde ocorre a limitação de nitrogênio, nas culturas utilizando glicose como fonte de carbono, em diferentes temperaturas, com e sem suplementação de óleo de soja. _____	71
Tabela 4.10 - Coeficiente de Correlação (R^2) obtidos pelos modelos: Linear, Raiz Quadrada, Equação de Arrhenius e Weibull, para os parâmetros de crescimento μ e A obtidos pelo modelo GM nos cultivos em resíduo amiláceo, sem e com suplementação. _____	72

Tabela 4.11 - Coeficiente de Correlação (R^2) obtidos pelos modelos: Linear, Raiz Quadrada, Equação de Arrhenius e Weibull, para os parâmetros de crescimento μ e A obtidos pelo modelo GM nos cultivos em glicose. _____	73
Tabela 4.12 - Valores dos índices estatísticos para os modelos secundários: Modelo Linear, Modelo da Raiz Quadrada, Modelo da Equação de Arrhenius e Modelo de Weibull. _____	74
Tabela 4.13 - Parâmetros obtidos do modelo de Gompertz Modificado para os cultivos em glicose em cinco temperaturas. _____	76
Tabela 4.14 - Dados gerais obtidos nas culturas. _____	82
Tabela 4.15 - Parâmetros obtidos pelo modelo de Gompertz Modificado para o cultivo em biorreator, utilizando glicose como fonte de carbono. _____	88
Tabela 4.16 - Porcentagens de pureza e porcentagens de recuperação dos filmes de P(3HB) obtidos a partir do novo método de extração. _____	89
Tabela 4.17 - Porcentagem de perda de massa obtida pela análise de TGA para os filmes obtidos pelo novo método de extração. _____	91
Tabela 4.18 - Dados da T_g , T_m e χ_c obtidos pelo DSC para os filmes de P(3HB) nos diferentes tempos de extração, juntamente com o filme da PHB Industrial. _____	92
Tabela 4.19 - Temperatura de início de degradação (T_i), temperatura máxima de degradação (T_{pico}) e porcentagem de perda de massa para os diferentes filmes de P(3HB) obtidos a partir da TGA. _____	95
Tabela 4.20 - Dados de massa molecular (M_n) e de polidispersidade, para os diferentes filmes de P(3HB), obtidos pelo novo método de extração, juntamente com o da PHB industrial. _____	96
Tabela 4.21 - Dados gerais da caracterização dos filmes de P(3HB) obtidos pelo novo método de extração. _____	98
Tabela 4.22 - Dados da T_g , T_m e χ_c obtidos pelo DSC para os filmes de P(3HB) obtidos dos cultivos utilizando resíduo amiláceo como fonte de carbono, juntamente com filme da PHB Industrial. _____	99
Tabela 4.23 - Dados da temperatura inicial de decomposição (T_i), temperatura máxima de decomposição (T_{pico}) e % de perda de massa, obtidos pela análise de TGA para os filmes obtidos em resíduo amiláceo. _____	101
Tabela 4.24 - Dados de massa molar (M_n) e de polidispersidade obtidos para os diferentes filmes obtidos em resíduo amiláceo, juntamente com PHB industrial. _____	102

NOMENCLATURA

PHA's	Polihidroxicanoatos
P(3HB)	Poli(3-hidroxiacetato)
P(3HB- <i>co</i> -3HV)	Poli(3-hidroxiacetato- <i>co</i> -3-hidroxiacetato)
μ_{\max}	Velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})
μ	Velocidade específica de crescimento (h^{-1})
λ	Duração da fase lag (h)
A	Aumento logarítmico populacional
NB	Meio nutriente
MM	Meio mineral
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
TGA	Análise Termogravimétrica
T_m	Temperatura de fusão ($^{\circ}\text{C}$)
T_g	Temperatura de transição vítrea ($^{\circ}\text{C}$)
T_i	Temperatura de início de degradação ($^{\circ}\text{C}$)
T_{pico}	Temperatura máxima de degradação ($^{\circ}\text{C}$)
GPC	Cromatografia de permeação em gel
MSE	Erro médio quadrado
R^2	Coefficiente de correlação
GP	Modelo de Gompertz
GM	Modelo de Gompertz Modificado
LO	Modelo Logístico
χ_c	Grau de cristalinidade
rpm	Rotações por minuto
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
TCA	Ciclo dos ácidos tricarbóxicos
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
CoASH	Coenzima A
Da	Dalton

CAPÍTULO I

I INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e econômico, na maioria dos países, tem como consequência um grande aumento na produção de lixo. Só no Brasil, são despejadas diariamente 51 mil toneladas de plásticos em aterros e lixões, o que representa cerca de 19% do total de lixo gerado (PIEMOLINI, 2004). A presença do plástico de origem petroquímica nesses aterros representa um grave problema pois, como demoram a se decompor, acabam comprometendo a circulação de gases e líquidos, dificultando a degradação de outros materiais constituintes do lixo, retardando a estabilização das áreas dos aterros (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997).

Em resposta à crescente preocupação com os problemas ambientais causados pela produção e acúmulo de materiais plásticos de origem petroquímica, bem como o esgotamento das fontes de combustíveis fósseis, muitos países estão realizando estudos de gerenciamento e diminuição do volume de lixo sólido, buscando ainda a produção de materiais plásticos biodegradáveis, a partir de fontes renováveis de carbono. Portanto, estes novos materiais devem possuir as propriedades desejáveis dos plásticos convencionais, serem produzidos a partir de substratos renováveis e ainda serem completa e rapidamente biodegradados, quando descartados no meio ambiente (PIEMOLINI, 2004).

Para contornar esse problema, estão sendo estudadas alternativas como a reciclagem de produtos constituídos de plásticos e a substituição por plásticos biodegradáveis, mais compatíveis com a filosofia de preservação ambiental (SOTERO, 2000). Os plásticos biodegradáveis, ou bioplásticos, são polímeros que se degradam completamente ao ataque microbiano em um curto espaço de tempo, sob condições apropriadas do meio ambiente. Dentre os biopolímeros em desenvolvimento estão os polihidroxialcanoatos (PHA's).

Os PHA's são biopolímeros produzidos por inúmeras bactérias, sob condições apropriadas de cultivo. Fisiologicamente, são materiais de reserva energética, geralmente acumulados intracelularmente pelas bactérias nativas produtoras, sob limitação de um nutriente essencial, como nitrogênio, fosfato, ou oxigênio e na presença suficiente da fonte de carbono. Estes biopolímeros apresentam características muito interessantes como propriedades termoplásticas, biodegradabilidade e biocompatibilidade, o que os tornam de grande aplicabilidade. São considerados uma alternativa aos polímeros convencionais porque, além de serem biodegradáveis, possuem propriedades físico-químicas muito similares aos vários plásticos de origem petroquímica e podem ser produzidos a partir de fontes renováveis de carbono (LEE 1996a; RAMSAY, 1994).

As aplicações destes poliésteres são bastante amplas, não se restringindo apenas à utilização como polímero convencional. A biocompatibilidade e a baixa dissolução dos PHA's em ambientes biológicos os tornam úteis na medicina, na fabricação de materiais de sutura e próteses ósseas. Podem ainda ser utilizados na indústria farmacêutica (na produção de cápsulas para a liberação controlada de fármacos) e de alimentos (embalagens ativas) (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998).

Muitos são os microrganismos produtores de PHA's e a espécie *Ralstonia eutropha* é uma das que apresenta condições mais favoráveis à produção industrial. Este microrganismo destaca-se pela possibilidade de acumular mais de 80% de sua massa seca em polímero, com alta massa molar e utilizando diferentes tipos de substratos como glicose, frutose, entre outros (RAMSAY, 1994).

Apesar desta grande possibilidade de aplicações, os plásticos biodegradáveis ainda têm participação mínima no mercado, em virtude de seu alto custo em relação aos plásticos petroquímicos. A redução dos custos de produção depende da obtenção de linhagens altamente eficientes na conversão dos substratos no produto desejado, da utilização de substratos de baixo custo, do desenvolvimento de processos que permitam explorar ao máximo o potencial dessas linhagens e do desenvolvimento de processos de extração-purificação de forma a tornar os custos de extração do produto os menores possíveis (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005a).

Estratégias de produção de P(3HB) para elevar o conteúdo de biopolímero e diminuir o custo total dos mesmos são necessárias. A utilização de substratos de baixo custo pode representar 40% de economia no processo de produção de P(3HB) (KIM, 2000). Uma alternativa interessante é a utilização de suplementos nutricionais ou indutores de produção de P(3HB). Estes agentes podem interferir na via metabólica proporcionando maior produção de células e resultando em maior produtividade, mas também podem agir diretamente na síntese de P(3HB) (MARANGONI et al., 2000; KAHAR et al., 2004). O estudo da temperatura de cultivo de *R. eutropha* também é um parâmetro importante, pois se houver a possibilidade de operação a temperaturas mais altas que a utilizada, 30°C, em níveis industriais é interessante, em virtude da economia em algumas etapas de troca de calor.

A extração afeta significativamente a economia global do processo (KAPRITCHKOFF et al., 2005). A pesquisa por uma técnica de extração de P(3HB) de células de *Ralstonia eutropha*, que possa diminuir a quantidade de solventes utilizados, tornar o processo mais simples e menos poluente, tornando assim os custos de extração de P(3HB) os menores possíveis também se faz necessária, bem como o conhecimento das características do filme produzido em tais condições.

Vários modelos são utilizados em microbiologia de alimentos para prever o crescimento microbiano. Embora Baranyi e Roberts (1994) tenham observado que estes modelos não possuem aplicação prática em Engenharia Bioquímica por serem objetivos distintos da microbiologia de alimentos, a descrição mais detalhada do crescimento microbiano tem sido realizada através da aplicação destes modelos, com sucesso em processos biotecnológicos.

Este trabalho teve como objetivo geral melhorar as condições de cultivo de *Ralstonia eutropha* para aumentar a produção de polihidroxialcanoatos, utilizando substrato de baixo custo, como resíduo da indústria de alimentos e desenvolver um método de extração simples.

E como objetivos específicos:

- Estudar um modelo matemático primário que descreva o crescimento da bactéria nos diferentes substratos testados e utilizar o modelo para definir o momento da limitação da cultura;
- Estudar um modelo secundário que melhor descreva como os parâmetros de crescimento de *R. eutropha* variam com a temperatura de cultivo;

- Avaliar a capacidade de crescimento de *Ralstonia eutropha* em um resíduo simulando um efluente da indústria amilácea, como substrato, avaliando a produção de P(3HB);
- Avaliar a influência da adição de óleo de soja no início da fase de produção de P(3HB);
- Estudar a influência da temperatura no crescimento celular e na produção de P(3HB);
- Desenvolver um método de extração simples que utilize apenas um solvente nesta extração;
- Caracterizar os filmes de P(3HB) produzidos pelo novo método de extração e compará-los com o polímero obtido comercialmente.

Este trabalho está estruturado em diferentes capítulos. O capítulo II traz uma revisão da literatura sobre os diferentes assuntos abordados na pesquisa. No capítulo III são apresentados os materiais e os métodos utilizados nesse estudo. Os resultados e discussão são descritos no Capítulo IV e no Capítulo V estão as conclusões e sugestões. Ao final, estão incluídos alguns anexos para complementação do trabalho e as referências da literatura.

CAPÍTULO II

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A biodegradabilidade como alternativa ao problema ambiental

Os polímeros petroquímicos são um dos materiais que causam grande poluição ambiental. O polipropileno, polietileno, poli(cloreto de vinila), poliestireno entre outros, são largamente utilizados na manufatura de plásticos. Os polímeros sintéticos são facilmente moldados em formas complexas, apresentam alta resistência química e são relativamente elásticos. Alguns podem ser moldados em fibras ou em finos filmes transparentes. Estas características fazem destes plásticos próprios para aplicações em bens duráveis e em embalagens (SOTERO, 2000).

Os polímeros são muito usados porque são fáceis de manufaturar, produzidos a um baixo custo e duram longos períodos. Infelizmente, estas mesmas qualidades os transformam num grande problema ambiental, devido ao fato de serem baratos e descartáveis. A grande demanda de produção gera poluição ambiental, uma vez que estes materiais permanecem no ambiente resistindo à degradação (LUZIER, 1992).

Em resposta à preocupação pública crescente com os efeitos maléficos dos materiais de origem petroquímica no meio ambiente, os biopolímeros são uma realidade que permite minimizar o problema dessa poluição. Os polihidroxialcanoatos (PHA's) são uma classe de polímeros que se destacam por possuírem propriedades semelhantes aos materiais termoplásticos, por serem biodegradáveis e passíveis de serem produzidos a partir de matérias-primas renováveis, oferecendo a possibilidade de um ciclo fechado e consequentemente minimizando o impacto ambiental (KAHAR et al., 2004).

2.2 Descrição dos polihidroxicanoatos (PHA's)

Os polihidroxicanoatos (PHA's) são polímeros 100% biodegradáveis. Podem ser produzidos a partir de vários hidroxicanoatos (HAs), os quais são sintetizados por numerosos microrganismos. Possuem propriedades similares a vários termoplásticos sintéticos como o polipropileno, podendo ser substituído em seu lugar. Eles são completamente degradados à água e dióxido de carbono sob condições aeróbicas e a metano sob condições anaeróbicas, por microrganismos no solo, mar, água de lagos e água de esgoto (REDDY et al., 2003).

2.2.1 Características e Propriedades

Os PHA's são substâncias naturais de reserva de carbono e de energia que são acumulados no interior das células na forma de grânulos por uma grande variedade de microrganismos, podendo chegar até o nível de 90% de sua massa seca, em condições particulares de crescimento: a imposição da limitação de um nutriente e a presença de excesso de carbono (MADISON e HUISMAN, 1999). Estudos com vários organismos têm mostrado que os grânulos típicos de P(3HB) possuem diâmetro na faixa de 0,2 a 0,7 μm e são circundados por uma membrana composta por cerca de 2% de proteínas e 0,5% de lipídios, cuja espessura é de 2 nm (YOO et al., 1997).

Os polihidroxicanoatos constituem uma classe geral de polímeros microbianos (ésteres poliméricos) da qual os mais estudados são o poli(3-hidroxi-butirato), P(3HB), e o poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato), P(3HB-co-3HV) (DOI, 1990). O P(3HB) é o polímero mais comum dos PHA's e historicamente o que tem sido mais estudado. Copolímeros de P(3HB) podem ser formados pela adição conjunta de substratos específicos como propionato ou valerato, levando à formação de polímeros contendo, como por exemplo, 3-hidroxi-valerato (3HV) ou 4-hidroxi-butirato (4HB), modificando e melhorando as propriedades do polímero produzido (MADISON e HUISMAN, 1999).

A estrutura química da unidade monomérica do PHA está apresentada na Figura 2.1. O tipo de radical R e o valor de n dão origem às diferentes unidades monoméricas que constituem os polímeros e co-polímeros. O radical R pode variar de um único átomo de H, até tridecil (C_{13}), podendo conter insaturações, grupos aromáticos ou ainda ligações a elementos como flúor, cloro e cromo. Os 3-hidroxicanoatos são os monômeros mais encontrados, porém 4, 5 e 6-hidroxicanoatos também têm sido incorporados (MADISON e HUISMAN, 1999).

$\left[\text{—O—CH—(CH}_2\text{)}_n\text{—C—} \right]_{100-3000}$ <div style="display: flex; justify-content: center; gap: 20px;"> <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \\ \text{R} \end{array}$ </div> <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \\ \text{O} \end{array}$ </div> </div>		
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)

Figura 2.1 – Estrutura geral dos PHA's para diferentes monômeros. Fonte: Lee, 1996a

A variação do comprimento e composição das cadeias é a base da diversidade de polímeros da família de PHA's e de seu vasto potencial de aplicação. Desde que o primeiro P(3HB) foi descoberto, em 1926, já foram detectados mais de 125 diferentes unidades monoméricas como constituintes de PHA's, em mais de 300 diferentes bactérias (LEE, 1996a; SUDESH et al., 2000).

Os PHA's podem ser classificados em dois grupos: os polímeros constituídos de unidades monoméricas de 5 carbonos ou menos, são denominados de cadeia lateral curta (*short-side-chain*) (PHA_{SSC}). Os polímeros com unidades monoméricas com mais de 6 carbonos são os de cadeia lateral média (PHA_{MSC}) ou cadeia lateral longa (PHA_{LSC}) (RAMSAY, 1994). Os PHA_{SSC} possuem características próximas às dos termoplásticos, enquanto que os PHA_{MSC} aproximam-se às de termofixos (TIM e STEINBÜCHEL, 1990).

Os PHA's são termoplásticos não-tóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis, que podem ser produzidos de fontes renováveis. Eles têm um alto grau de polimerização, são altamente cristalinos, opticamente ativos e insolúveis em água. Estas características os fazem altamente competitivos com o polipropileno, plástico derivado do petróleo (REDDY et al., 2003).

A massa molar dos polímeros depende do microrganismo que o produz e das condições de crescimento, mas varia normalmente de 1×10^5 a 3×10^6 Daltons (Da) (LEE,1996a). Melhorias nas propriedades do P(3HB) podem ser realizadas pela produção de um polímero com uma massa molar alta, excedendo a 3×10^6 Da. Um P(3HB) com uma massa molar muito alta é um material muito útil para a preparação de filmes e fibras fortes por extração quente ou fria (AGUS et al., 2006).

A família de PHA's possui grande variedade de propriedades mecânicas, do fortemente cristalino ao elástico, dependendo da composição das unidades monoméricas. A Tabela 2.1 apresenta uma comparação das propriedades físicas entre diferentes PHA's.

Tabela 2.1 - Comparação entre as propriedades dos polímeros.

Polímero	Temperatura de fusão (°C)	Módulo de Young (GPa)	Tensão de cisalhamento (MPa)	Resistência à ruptura (%)
P(3HB)	179	3,5	40	5
P(3HB-co-3HV)				
3 mol% 3HV	170	2,9	38	-
9 mol% 3HV	162	1,9	37	-
14 mol% 3HV	150	1,5	35	-
20 mol% 3HV	145	1,2	32	-
25 mol% 3HV	137	0,7	30	-
P(3HB-co-4HB)				
3 mol% 4HB	166	-	28	45
10 mol% 4HB	159	-	24	242
16 mol% 4HB	-	-	26	444
64 mol% 4HB	50	30	17	591
90 mol% 4HB	50	100	65	1080
P (4HB)	53	149	104	1000
P(3HHx-co-3HO)	61	-	10	300
Polipropileno	170	1,7	34,5	400
Polietileno-tereftalato	262	2,2	56	7300
Poliestireno	110	3,1	50	-

Fonte: Lee, 1996a.

O P(3HB) possui resistência aos raios ultravioleta (UV) superior ao polipropileno e apresenta excelente impermeabilidade ao oxigênio (HOLMES, 1985). É completamente estereoespecífico, com todos os átomos de carbono assimétricos na configuração D(-), o que o torna altamente cristalino (60-80%), e relativamente frágil. Sua temperatura de transição vítrea varia de -5°C a 5°C e apresenta temperatura de fusão em torno de 179°C (LEE, 1996a).

Ainda segundo Lee (1996a), existe dois grandes problemas no uso comercial de P(3HB). Primeiro, tem baixa estabilidade na fusão, pois se decompõe a aproximadamente 200°C, que é uma temperatura muito próxima à sua temperatura de fusão. Em segundo lugar, torna-se quebradiço em poucos dias quando estocado sob condições ambientes. Melhoramentos têm sido feitos para diminuir a fragilidade de P(3HB) através da incorporação de monômeros 3-hidroxivalerato ou por mistura com outros polímeros.

As propriedades mecânicas do P(3HB), incluindo o Módulo de Young e a tensão de cisalhamento, são similares às do polipropileno (PP), porém, sua resistência à ruptura (5%) é muito menor do que a do PP (400%). O P(3HB-co-3HV) tem melhores propriedades mecânicas. O copolímero é mais flexível que o P(3HB) e apresenta maior resistência à ruptura conforme aumenta a fração de 3-hidroxivalerato. Além disso, o decréscimo da temperatura de fusão com o aumento da fração 3HV, sem afetar a temperatura de degradação, permite melhor processamento térmico do copolímero, tornando-o mais atrativo para alguns usos especiais como moldagem por sopro, etc. Assim, as propriedades do P(3HB-co-3HV) podem ser controladas pelo ajuste da fração de 3HV durante a cultura (LEE, 1996a).

Durante o período de estocagem em temperatura ambiente, a rigidez do P(3HB) e seus copolímeros tende a se desenvolver (SCANDOLA et al., 1992 *apud* SAVENKOVA et al., 2000; LEE, 1996a). Savenkova et al., (2000) mantiveram P(3HB) e seu copolímero com 0-20 mol% de 3HV, durante 224 dias à temperatura ambiente. Relataram que os mesmos demonstraram, ao final, valores de resistência à ruptura de 5-10 vezes menores do que no início da estocagem, sendo que para o P(3HB) baixou de 5,6 para 3,3 % e para o copolímero P(3HB-co-20mol%3HV) baixou de 690 para 182%. Dessa forma, mesmo após esse período, a elasticidade do copolímero continuava muitas vezes maior que a do homopolímero, mesmo havendo diferença entre os valores obtidos nas diferentes amostras, dependendo da fração de 3HV existente.

2.3 Microrganismos produtores

Os microrganismos capazes de acumular PHA's são geralmente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BYROM, 1987), que podem ser encontradas na natureza, isto é, no solo, água do mar, efluentes, etc. A seleção do microrganismo e do substrato têm grande influência no custo de fabricação do PHA (ANDERSON e DAWES, 1990). É desejável que as cepas tenham velocidade específica de crescimento e de produção elevadas, que possam utilizar substratos de baixo custo, que apresentem uma porcentagem elevada de PHA's em relação à massa seca total e, finalmente, é importante que haja um fator de conversão de substrato em biopolímero bastante elevado (RAMSAY, 1994). O alto custo de produção de PHA's deve-se em grande parte ao processo de extração do polímero. Para que este seja rentável, é necessário que a cepa produtora seja capaz de acumular pelo menos 60% de sua massa celular em polímero. Este critério elimina da seleção todas as bactérias Gram-positivas e aquelas que não são capazes de acumular porcentagens elevadas de polímero (RAMSAY et al., 1990).

Os microrganismos usados para a produção de PHA's podem ser divididos em dois grupos, baseados nas condições de cultura requeridas para a síntese do polímero. O primeiro grupo requer a limitação de um nutriente essencial como N, P, Mg, K, O ou S para uma síntese eficiente de PHA's, paralelamente ao excesso da fonte de carbono. Desse grupo fazem parte *Ralstonia eutropha*, *Protomonas extorquens*, *Pseudomonas oleovorans*, entre muitos outros. O segundo grupo de microrganismos não requer a limitação de nutriente para a síntese de polímero, acumulando-o durante o crescimento. Estão incluídos neste grupo, *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes vinelandii* recombinante e *Escherichia coli* recombinante (LEE, 1996b).

Apesar de existir mais de 300 diferentes microrganismos que acumulam PHA's, somente alguns poucos podem ser utilizados para a produção industrial, entre eles *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, algumas espécies de metilotróficos e alguns outros microrganismos recombinantes como *R. eutropha* recombinante, *Escherichia coli* recombinante e *Klebsiella aerogenes* recombinante (LEE, 1996b).

Outro microrganismo que está sendo estudado para produção de PHA's é *Burkholderia sp.*, isolado do solo e que pode acumular PHA's 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). *Burkholderia sp.* IPT 101 apresenta boa produção de copolímero, entretanto, com baixa conversão de ácido propiônico em unidades 3HV (GOMEZ et al., 1997). Com o intuito de aumentar essa 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. Um grupo de pesquisadores brasileiros também está investigando a produção de P(3HB) por *B. sacchari*, a partir de hidrolisado de bagaço de cana, resíduo da indústria sucroalcooleira (VASCONCELOS, 2002).

Na Tabela 2.2 encontram-se destacados os principais microrganismos produtores de PHA's, os principais substratos utilizados por cada microrganismo e suas capacidades de produção.

Tabela 2.2 - Produção de PHA's em várias bactérias.

Microrganismo Produtor	PHA ^a	Fonte de Carbono	Tempo de Cultura (h)	Concentração de Células (g.L ⁻¹)	Concentração de PHA (g.L ⁻¹)	Conteúdo de PHA %	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
<i>Ralstonia eutropha</i>	P(3HB)	Glicose	50	164	121	76	2,42
<i>Ralstonia eutropha</i>	P(3HB)	CO ₂	40	91,3	61,9	67,8	1,55
<i>Ralstonia eutropha</i>	P(3HB)	Hidrolisado de mandioca	59	106	61,9	57,5	1,03
<i>Ralstonia eutropha</i>	P(3HB)- <i>co</i> -P(3HV)	Glicose + ácido propiônico	46	158	117	74	2,55
<i>Alcaligenes latus</i>	P(3HB)	Sacarose	18	146	71,4	50	3,97 ^b
<i>Alcaligenes latus</i>	P(3HB)	Sacarose	D= 0,16 h ⁻¹	^c	16,2	-	2,6
<i>Azotobacter vinelandii</i>	P(3HB)	Glicose ^e	47	40,1	32	79,8	0,68
<i>Chromobacterium violaceum</i>	P(3HV)	Ácido Valérico	-	39,5	24,5	62	-
<i>Methylobacterium organophilum</i>	P(3HB)	Metanol	70	250	130	52	1,86
<i>Protomonas extorquens</i>	P(3HB)	Metanol	170	233	149	64	0,88
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	P(3HHx- <i>co</i> -3HO)	n-Octano	D= 0,2 h ⁻¹	11,6	2,9	25	0,58
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	P(3HHx- <i>co</i> -3HO)	n-Octano	38	37,1	12,1	33	0,32
<i>Escherichia coli recombinante</i>	P(3HB)	Glicose ^e	39	101,4	81,2	80,1	2,08
<i>Klebsiella aerogenes recombinante</i>	P(3HB)	Melaços	32	37	24	65	0,75

^a Abreviações: P(3HB), poli(3-hidroxibutirato); P(3HB-*co*-3HV), poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato); P(3HV), poli(3-hidroxivalerato); P(3HHx-*co*-3HO), poli(3hidroxihexanoato-*co*-3-hidxiotanoato).

^b Nos experimentos foram usados inóculos a partir de 13,7 g DCW L⁻¹.

^c Dados não disponíveis.

^e Fonte de nitrogênio complexa, suplementada nos experimentos.

Fonte: Lee, 1996b.

A *Ralstonia eutropha* tem sido o microrganismo mais utilizado na produção industrial de polímero (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005a). Por possuir elevado rendimento e velocidade de produção, pode acumular mais de 80% de sua massa seca celular em polímero com uma alta massa molar (BYROM, 1987), utilizando diferentes tipos substratos como frutose, glicose e sacarose (espécies mutantes), soro de leite, etc.

2.4 Descrição geral de *Ralstonia eutropha*

A *Ralstonia eutropha* (conhecida atualmente como *Cupriavidus necator*), é um microrganismo procariótico, Gram-negativo, encontrado naturalmente no solo e na 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 peritriquiais. Na fase estacionária de crescimento, ou seja, no acúmulo de polímero, as células podem se tornar esféricas (BRAUNEGG et al., 1998). A Figura 2.2 apresenta a bactéria em fase de crescimento e em fase de acúmulo de polímero.

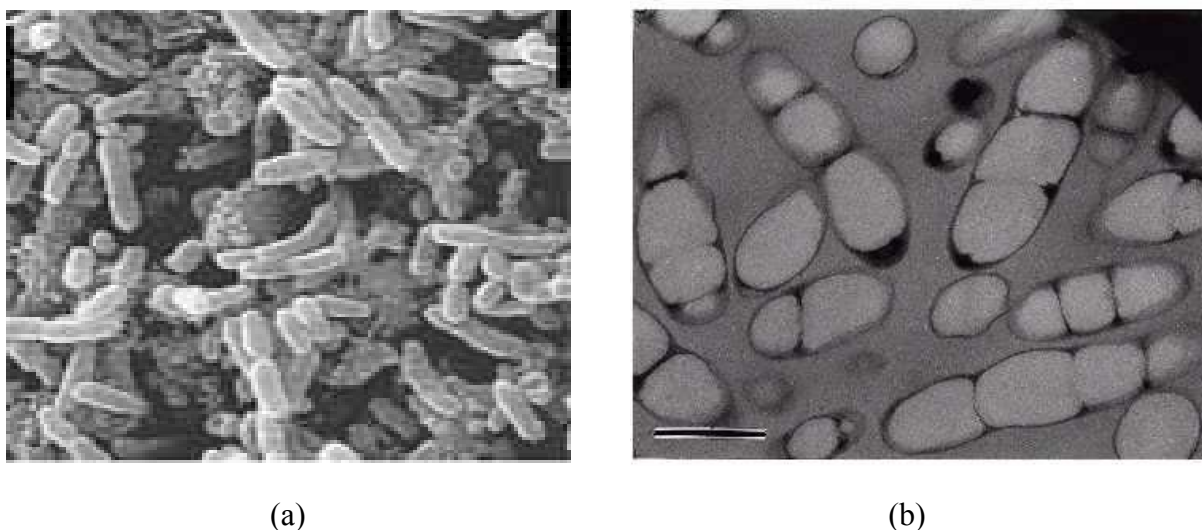


Figura 2.2 - *Ralstonia eutropha* em fase de crescimento (a), Fonte: Ampe, 1995; e fase de produção (b), Fonte: Sudesh et al., 2000, a barra representa 0,5 μm .

Ralstonia eutropha pode utilizar vários compostos orgânicos como fonte de carbono, entre os quais, frutose, glicose, acetato, propionato, lactato, gluconato e succinato. Não pode utilizar etanol, glicerol e dissacarídeos. Sua temperatura ótima de crescimento é 30°C. Pode crescer autotroficamente em atmosfera de gases contendo H_2 , O_2 e CO_2 . O pH na cultura de *R. eutropha* geralmente decresce devido à produção de subprodutos no ciclo de Krebs. Um pH ótimo para o crescimento e produção de P(3HB) é aproximadamente 6,9, sendo que em pH de 5,4 há inibição no crescimento (TANAKA et al., 1994).

Este microrganismo tem também como característica importante, do ponto de vista biotecnológico, a produção de PHA's relacionada à fonte de carbono utilizada para seu crescimento. Isto porque a via de degradação dos carboidratos (via Entner-Doudoroff), mais frequentemente utilizados em *R. eutropha*, leva à formação de piruvato, o qual é oxidativamente descarboxilado a acetil coenzima A (acetil-CoA). Assim, o monômero predominante encontrado em *R. eutropha* é o P(3HB), uma vez que é sintetizado a partir de acetil-CoA. Quando utiliza-se ácidos propiônico ou valérico como co-substratos da glicose e/ou frutose no meio de cultura, há a formação do copolímero P(3HB-co-3HV), cujas unidades (3HV) são formadas a partir de propionil-CoA, produto da degradação dos ácidos utilizados (ANDERSON e DAWES, 1990; FAVA, 1997).

2.5 Metabolismo em *Ralstonia eutropha*

2.5.1 Metabolismo durante o crescimento balanceado

Em condições de crescimento balanceado, *Ralstonia eutropha* cataboliza carboidratos, pela via Entner-Doudoroff, a piruvato, que pode então ser convertido, através de desidrogenação, a acetil-CoA. Durante o crescimento reprodutivo, a acetil-CoA entra no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) com a liberação da coenzima A (CoASH) e é terminalmente oxidado a CO₂ gerando energia, na forma de ATP, equivalentes redutores (NADH, NADPH e FADH₂) e precursores biossintéticos (2-oxoglutarato, oxaloacetato) (BRAUNEGG et al., 1998).

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 ciclo TCA é dependente da disponibilidade das fontes de nitrogênio, fósforo e outros elementos, além do potencial oxidativo do ambiente (BRAUNEGG et al., 1998).

2.5.2 Biossíntese de P(3HB)

Em condições balanceadas do meio, como visto anteriormente, o acetil-CoA segue pelo TCA gerando energia e material celular. Por outro lado, em condições de excesso de carbono e limitação de algum nutriente essencial, o acetil-CoA entra na via de biossíntese de P(3HB), conforme a Figura 2.3.

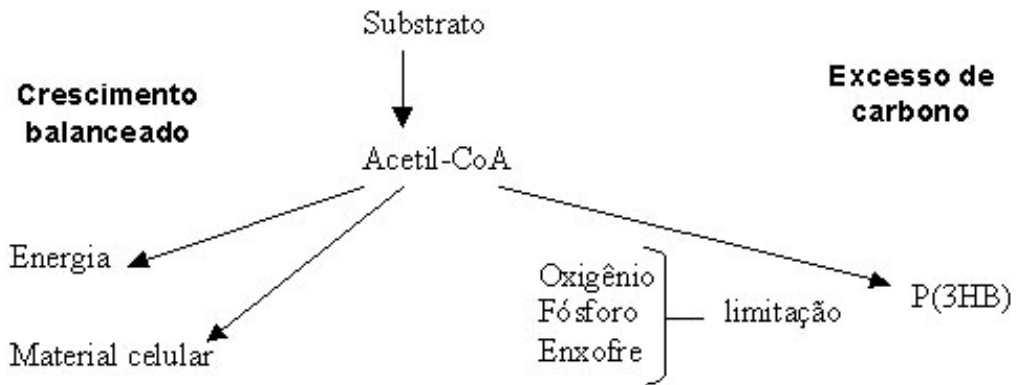
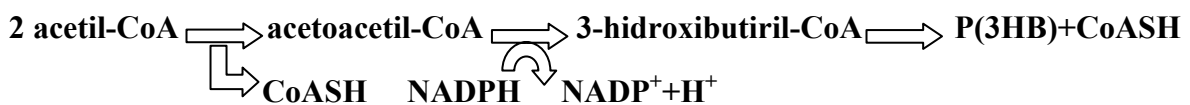


Figura 2.3 - Produtos do acetil-CoA em condições de crescimento balanceado e de excesso de carbono. Fonte: Byrom, 1987.

O P(3HB) é sintetizado em *R. eutropha*, e em muitos microrganismos, a partir do acetil-CoA, em condições de excesso da fonte de carbono e limitação de algum nutriente essencial, por uma sequência de 3 reações catalisadas pelas enzimas 3- β -cetotiolase, acetoacetil-CoA redutase e PHA sintase (OEDING e SCHLEGEL, 1973 *apud* SQUIO, 2003), segundo descrito abaixo:

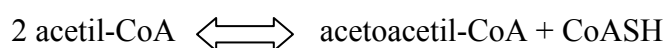
A enzima 3- β -cetotiolase condensa, reversivelmente, 2 moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA. A enzima acetoacetil-CoA redutase, por sua vez, reduz esse substrato a R-3-hidroxi-butiril-CoA, que é incorporado à cadeia de polímero pela ação da PHA sintase.



2.5.2.1 Enzimas envolvidas na biossíntese de P(3HB)

2.5.2.1.1 β -cetotiolase

A β -cetotiolase catalisa o primeiro passo na formação do PHA. Seu mecanismo de ação envolve duas reações parciais que resultam na condensação de duas moléculas de acetil-CoA, formando acetoacetil-CoA. Dois resíduos de cisteína fazem parte do sítio ativo da enzima e são responsáveis pela ligação da primeira molécula de acetil-CoA à enzima e pela ativação de uma segunda molécula de acetil-CoA, ocorrendo então, a condensação e formação de acetoacetil-CoA (MADISON e HUISMAN, 1999). A enzima catalisa a reação reversível:



A enzima β -cetotiolase, compete por acetil-CoA com várias outras vias metabólicas incluindo formação de acetato, formação de citrato e síntese de ácidos graxos. Essa enzima é inibida por moléculas de CoASH livres (LEE et al., 1995).

2.5.2.1.2 Acetoacetil-CoA redutase

Esta enzima catalisa o segundo passo na biossíntese de PHA, convertendo o acetoacetil-CoA em 3-hidroxiacetil-CoA (MADISON e HUISMAN, 1999):



Foram encontradas em *R. eutropha* dois tipos de acetoacetil-CoA redutases, possuindo diferentes especificidades a substratos e coenzimas. A enzima NADH dependente é ativa em substratos D(-) e L(+), enquanto a NADPH dependente é estereoespecífica, ativa só com substratos de cadeia C₄ a C₆ D(-)3-hidroxiacetil-CoA. Durante a síntese de P(3HB), acetoacetil-CoA é reduzido a D(-)3-hidroxiacetil-CoA, catalisado pela enzima NADPH dependente (STEINBUCHER, 1991).

2.5.2.1.3 PHA sintase

A PHA sintase é a enzima chave na biossíntese dos PHA's. Ela catalisa a formação de ligações ésteres entre as unidades D(-)3-hidroxiacil-CoAs, produzindo o polímero. A variedade dos monômeros constituintes dos PHA's é devido à grande especificidade de substratos das PHA sintase (PARK et al., 2005). Em *R. eutropha*, esta enzima é capaz de polimerizar 3-hidroxi, 4-hidroxi e 5-hidroxiálcanoatos a partir de D isômeros de 4 e 5 carbonos de hidroxiacil-CoA, que são substratos naturais para esta enzima (ANDERSON e DAWES, 1990; STEINBUCHER e LUTKE-EVERSLOH, 2003).

Esta enzima é isolada sob duas formas, uma solúvel e outra como grânulos associados. Durante o crescimento não limitado, a forma solúvel é predominante. Quando mudam as condições do meio com limitação de nutriente favorecendo a formação de PHA, há o aparecimento da forma associada ao grânulo de PHA, com rápido desaparecimento da forma solúvel (ANDERSON e DAWES, 1990).

2.5.3 Degradação intracelular de P(3HB)

A degradação intracelular de P(3HB) é efetuada através de uma seqüência de reações envolvendo, nesta ordem, PHA despolimerase, D(-)-3-hidroxi-butirato desidrogenase e acetoacetil sintetase para formar ácido D-3-hidroxi-butírico e acetil-CoA. O acetil-CoA é um intermediário comum para as vias de síntese e degradação de P(3HB) (DOI, 1990).

Sob condições de limitação de nitrogênio, em *R. eutropha*, ocorre o ciclo natural do metabolismo de PHA, onde a biossíntese de PHA procede concomitantemente com sua degradação (DOI et al., 1990). Doi et al., (1992) estudaram a cinética de acúmulo e degradação de P(3HB) em *R. eutropha* e descobriram que a degradação do polímero é dez vezes mais lenta do que sua síntese.

2.5.3.1 Regulação da síntese de PHA's

A síntese de P(3HB) é regulada em nível enzimático, sendo que as concentrações intracelulares de acetil-CoA e coenzima A livre, exerce papel principal nessa regulação (HAYWOOD et al., 1988). Uma alta concentração de acetil-CoA é necessária para a síntese do polímero. Entretanto, a alta concentração de CoA livre, liberada quando o acetil-CoA entra no TCA, inibe a ação da 3- β -cetotiolase (OEDING e SCHLEGEL, 1973), inibindo dessa forma a síntese do polímero. Por outro lado, a síntese de P(3HB) é estimulada pela alta concentração intracelular da enzima NADPH e pela alta razão NADPH/NADP obtidas em condições de limitação de nutrientes (LEE et al., 1995).

A limitação nutricional para produção de P(3HB) pode ser em oxigênio, nitrogênio, fosfato, entre outros, como já visto anteriormente. A limitação em oxigênio aumenta a relação NADH/NAD⁺ por não existir o aceptor final de elétrons na cadeia respiratória, levando à formação de P(3HB). Sob limitação em nitrogênio, as células não produzem mais proteínas e ocorre acúmulo de ATP. O excesso de ATP's provoca diminuição da fosforilação oxidativa, e assim, acúmulo das coenzimas reduzidas (NADH), que levam à formação de P(3HB), cuja via metabólica reoxida estas coenzimas (DAWES e SENIOR, 1973). O fosfato é um componente vital para muitas estruturas celulares como ácidos nucleicos e fosfolipídeos, além de estar envolvido em energética celular. O magnésio, por sua vez, é essencial para o crescimento da célula e tem várias funções como manter a integridade dos ribossomos, participar do mecanismo de controle de permeabilidade das membranas da célula, além de ser co-fator em muitas reações enzimáticas (ASENJO et al., 1995).

Dessa forma, as condições necessárias para a síntese dos PHA's são a elevada concentração de NADPH, a baixa concentração de CoA e a elevada concentração de acetil-CoA. Foi proposto por Dawes e Senior, (1973) que os polihidroxialcanoatos não servem apenas como reserva de carbono e energia, mas também como uma forma de diminuir o poder redutor, atuando como um regulador do poder redox da célula.

Um esquema simplificado do circuito de regulação do metabolismo de P(3HB) é mostrado na Figura 2.4. Onde duas moléculas de acetil-CoA são acopladas para formar acetoacetil-CoA em uma reação de condensação catalisada pela enzima 3- β -cetotiolase. Essa enzima é negativamente regulada pela coenzima A (CoASH), que também é um produto quando o acetil-CoA entra no TCA sob condições não limitadas. O produto é estereoseletivamente reduzido a (R)-3-hidroxi-butiril-CoA em uma reação catalisada pela enzima acetoacetil redutase NADPH-dependente. Altas concentrações de NADPH e NADH inibem a enzima citrato sintase, responsável pela entrada do acetil-CoA no TCA, que deixa o acetil-CoA disponível para a 3- β -cetotiolase. Finalmente, P(3HB) é sintetizado pela polimerização de moléculas de (R)-3-hidroxi-butiril-CoA pela enzima PHA sintase. As linhas pontilhadas indicam efeitos regulatórios negativos. Metabólitos e cofatores críticos estão escritos em negrito.

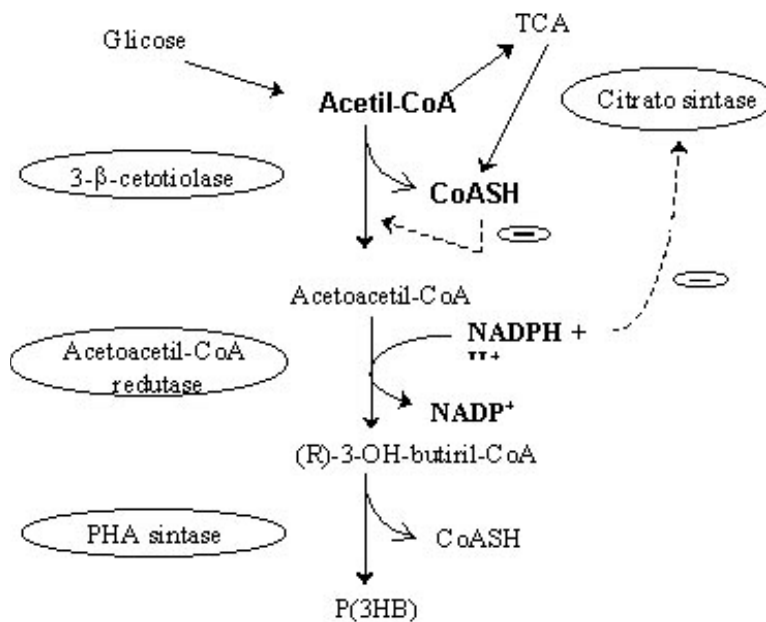


Figura 2.4 - Via de síntese de P(3HB) por *R. eutropha* e seu circuito regulatório. Fonte: Kessler e Witholt (2001).

2.6 Biodegradabilidade

A biodegradabilidade é a capacidade de decomposição de materiais, especialmente em produtos inócuos, pela ação de seres vivos como os microrganismos. Bactérias e fungos são os principais participantes do processo de biodegradação na natureza. A decomposição dos materiais fornece aos microrganismos, os precursores para os componentes celulares e energia. Dessa forma, a biodegradabilidade é nada mais que um processo catabólico (BRAUNEGG et al., 1998).

A propriedade que distingue os PHA's dos plásticos de origem petroquímica é sua biodegradabilidade, tornando-se uma importante característica comercial. Os PHA's são degradados em vários ambientes, como: solos, esgotos, água do mar e lagos. A biodegradação depende de vários fatores, tais como: atividade microbiana no ambiente, umidade, temperatura, pH e massa molar. Foi encontrado que a natureza das unidades do monômero também afetam a degradação. Os microrganismos excretam enzimas que quebram os polímeros em blocos moleculares, chamados hidroácidos, os quais são utilizados como uma fonte de carbono para o crescimento. A principal enzima para a degradação de P(3HB) e oligômeros derivados de polímeros é a PHB despolimerase (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005a).

P(3HB) e P(3HB-co-3HV) são degradados em sistemas biológicos tanto aeróbios quanto anaeróbios, sendo que a degradação ocorre mais rapidamente em despejos anaeróbios e mais lentamente no mar. Em ambientes aeróbios, os produtos finais são dióxido de carbono e água. Sob condições anaeróbias, metano também é produzido. Durante o processo de degradação, não há produção de intermediários nocivos (LUZIER, 1992). A Tabela 2.3 ilustra a degradação, em semanas de um filme de 1 mm de P(3HB-co-3HV) em diferentes ambientes.

Tabela 2.3: Biodegradação de um filme de 1mm de P(3HB-co-3HV) em diferentes ambientes.

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

Fonte: Luzier, 1992.

A Figura 2.5 representa o biociclo completo de produção e degradação de PHA's. Neste ciclo, através da fotossíntese, as plantas utilizam a luz solar, CO_2 e água para produzir carboidratos (1-2). Estes na forma de açúcares simples podem ser utilizados como substrato em um processo fermentativo com microrganismos específicos produzindo PHA's que serão purificados e processados formando os mais diversos artigos plásticos (3-6). Após seu uso, os PHA's podem ser depositados em ambientes microbianos ativos e a biodegradação deste polímero formará CO_2 e água (7-8). Uma rota direta através de plantas que produzem PHA's pode ser obtida (9).

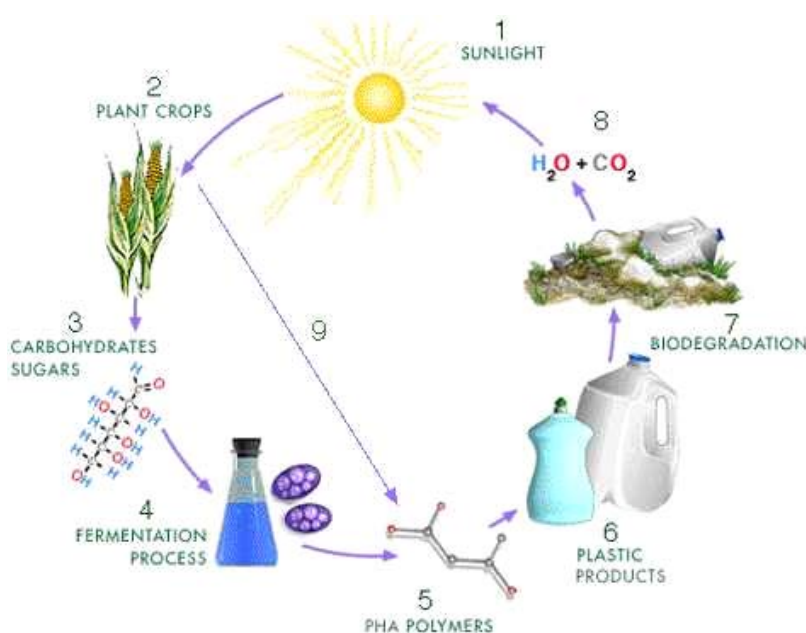


Figura 2.5 - Biociclo de polihidroxialcanoatos. Fonte: METABOLIX, 2004.

2.7 Aplicações

Os PHA's são considerados de grande interesse industrial, como polímeros biodegradáveis e/ou biocompatíveis, para diversas áreas de aplicação. O plástico biodegradável deve complementar o petroquímico, conquistando espaços específicos onde suas características de pureza e biodegradabilidade sejam necessárias.

Devido às características que possuem os polímeros P(3HB) e P(3HB-co-3HV), foram inicialmente utilizados na manufatura de garrafas, filmes e fibras para embalagens biodegradáveis e sacos de proteção para plantas. Além dessas utilizações, filmes de PHA's podem ser aplicados em papel ou papelão formando uma película impermeável e produzir um material composto completamente biodegradável, o que é uma alternativa aos materiais compostos não biodegradáveis preparados a partir de, por exemplo, papelão mais polietileno ou alumínio (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998). As aplicações similares aos produtos plásticos convencionais incluem os itens descartáveis, tais como navalhas, utensílios, fraldas, produtos de higiene feminina, recipientes de cosméticos-frascos de xampus e copos (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005a).

Os PHA's também têm suas aplicações na área médica, muitos estudos têm mostrado claramente que os biopolímeros possuem a biodegradabilidade, biocompatibilidade e termoprocessabilidade para não somente aplicações em implantes, mas também no uso da liberação controlada de drogas, sendo um atrativo material na aplicação em engenharia de tecidos e na medicina convencional. O P(3HB) tem sido usado como fio de suturas, enxertos cardiovasculares, pinos ortopédicos, projetos de regeneração e reparos de tecidos, reparo de cartilagem articular, reparo de tendão e limpezas de feridas (CHEN e WU, 2005).

2.8 Custos da produção de biopolímeros

Os PHA's são substitutos ideais dos plásticos derivados do petróleo por terem propriedades similares a vários termoplásticos e elastômeros, além de serem completamente biodegradáveis. Porém, o uso dos biopolímeros em uma faixa maior de aplicações é limitado principalmente pelo custo de produção deste polímero, quando comparado aos polímeros de origem petroquímica (LEE, 1996b).

Preço competitivo é o que o consumidor está disposto a pagar pelo produto e, geralmente, é menor ou igual ao preço do produto comparável. No caso dos PHA's, seu preço ainda é muito alto, se comparado aos plásticos convencionais e, enquanto seu custo de produção não puder ser substancialmente reduzido, ele precisa ser vendido não em substituição aos plásticos convencionais, mas sim, como um produto novo, com novas propriedades, utilizado para alguns fins mais específicos (HÄNGGI, 1995). O consumidor, em geral, não está disposto a pagar um prêmio pela biodegradabilidade e sustentabilidade de produtos (KESSLER et al., 2001).

Dessa forma, para que os PHA's possam ser substitutos pelos plásticos convencionais, é de extrema importância a redução de seus custos de produção. Muitos fatores influenciam nos custos dos processos de fermentação, entre eles, o rendimento do produto a partir do substrato, a produtividade, o conteúdo total de polímero acumulado, a complexidade da tecnologia empregada, o capital investido na planta de produção, a facilidade ou não do processo de separação, além da influência crítica do substrato utilizado (BYROM, 1987; CHOI e LEE, 1999b). Os principais fatores serão apresentados a seguir.

2.8.1 Produtividade de PHA's

A produtividade é definida como a quantidade de PHA's produzida por unidade de volume em uma unidade de tempo. Para a produção de uma mesma quantidade de PHA's por ano, um processo com menor produtividade requer equipamentos maiores. Então, os custos relacionados a equipamentos aumentam com o decréscimo da produtividade (CHOI e LEE, 1999b). A alta produtividade dos PHA's pode ser obtida por culturas em batelada alimentada ou contínua (DU et al., 2001).

KHANNA e SRIVASTAVA (2005b) realizaram a otimização do crescimento de *R. eutropha*, onde não somente diminuíram o custo de produção, mas também aumentaram a produtividade. Eles otimizaram a composição do meio de cultivo para maximizar a produtividade.

Comparando-se dois processos de produção de P(3HB) por *E. coli* recombinante com duas cepas de diferentes produtividades, para uma capacidade de produção estimada em 100.000 ton/ano, foi possível ver o efeito da produtividade sobre o custo de produção (CHOI e LEE, 1999a). Segundo estes autores, quando a produtividade aumentou de 1,98 g.L⁻¹h⁻¹ para 3,2 g.L⁻¹h⁻¹, os custos de produção decresceram de US\$ 5,37 para US\$ 4,91 Kg⁻¹ P(3HB). Uma avaliação econômica mostrou que o aumento da produtividade provocou a redução dos custos de capital fixo direto, mão-de-obra e equipamentos.

2.8.2 Conteúdo de PHA's nas células

O conteúdo de PHA's acumulado afeta a eficiência do processo de extração e o fator de conversão da fonte de carbono. O rendimento e a pureza do processo de extração são fortemente dependentes do conteúdo de PHA's. Uma quantidade menor de produto de digestão pode ser utilizada para separar os grânulos de PHA's de células com maior conteúdo de polímero. Por outro lado, baixo conteúdo de PHA's leva à grande quantidade de substrato desperdiçado em outros materiais celulares e/ou metabólicos (CHOI e LEE, 1999b).

Comparando uma cultura em batelada alimentada de *A. latus* com 50% de conteúdo de P(3HB) e rendimento de apenas 0,17 g P(3HB)/g sacarose, em um processo que resultou em 88% de polímero com 0,42 g P(3HB)/g sacarose em termos de custos de recuperação, Lee e Choi (2001), mostraram que, no primeiro caso, o custo de extração foi de US\$ 4,8/Kg P(3HB) contra apenas US\$ 0,92/Kg P(3HB) no segundo caso.

A *Ralstonia eutropha* é a bactéria mais estudada devido à sua habilidade em acumular grandes quantidades de P(3HB) a partir de fontes de carbono simples, podendo acumular mais de 80% de polímero em base seca, quando o nitrogênio ou fosfato é completamente esgotado (KIM et al., 1994).

2.8.3 Custo do substrato

Um dos problemas que impede as aplicações comerciais de PHA's é o seu alto custo de produção. Do ponto de vista econômico, o custo com substrato contribui significativamente para o custo total do processo, podendo atingir até 40% do custo total (KIM, 2000). Para reduzir os custos com substrato, cepas recombinantes utilizando fonte de carbono de baixo custo e correspondentes estratégias de cultivo têm sido desenvolvidas (LEE et al., 1999).

Pelo seu baixo custo, alguns substratos brutos como melaços de cana e beterraba, soro de leite, óleos vegetais, hidrolisados de amido podem ser excelentes substratos para a produção de PHA's. Porém, geralmente resultam 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).

Bacillus megaterium foi cultivado em várias fontes de carbono, tais como: xarope de tâmara, melão de beterraba, frutose, lactose, sacarose, glicose em meio com sais minerais. Os melhores resultados com considerações para o crescimento e produção de P(3HB) foram obtidos nas fontes de carbono de custo mais baixo, tais como o xarope de tâmara e melão de beterraba (OMAR et al., 2001).

A produção de PHA's por *Alcaligenes eutrophus* e uma linhagem recombinante, a partir de azeite de oliva foi avaliada por Fukui e Doi (1998). As cepas foram cultivadas em meio mineral limitado em nitrogênio, contendo azeite de oliva (1% v/v) como única fonte de carbono. Os resultados mostraram que como os açúcares, os óleos vegetais são excelentes fontes de carbono, tanto para o crescimento quanto para a biossíntese de PHA's por *Alcaligenes eutrophus*. Neste caso, os autores sugeriram que o microrganismo liberava lipase extracelular que hidrolisava os triglicerídeos do meio e que resultava na incorporação dos ácidos graxos pelas células e sua metabolização em Acetil-Coa via β -oxidação dos ácidos graxos.

2.8.3.1 Substratos de baixo custo

O alto custo de produção de PHA's pode ser minimizado usando resíduos orgânicos de baixo custo provenientes de plantas de processamento de alimentos.

2.8.3.1.1 Resíduo amiláceo (amido hidrolisado)

Uma fonte de carbono disponível em grandes quantidades é o amido. Amido e seus derivados são os principais componentes da demanda bioquímica de oxigênio de efluentes de indústrias têxteis, fermentativas e de processamento de alimentos e bebidas (YU, 2001). Nas indústrias de alimentos, o amido pode ser obtido de grãos como arroz, trigo e milho, e tubérculos como batata e mandioca (SARIKAYA et al., 2000). Determinados microrganismos não possuem capacidade de utilizar o amido como fonte de carbono. Para tanto, antes do processo fermentativo, o amido sofre uma hidrólise à glicose (KIM, 2000). Rusendi e Sheppard (1995) utilizaram resíduo da indústria processadora de batatas para a produção de P(3HB) e, através de uma hidrólise enzimática, foi possível a obtenção de glicose para utilização como fonte de carbono pelo microrganismo.

Rodrigues (2005) utilizou como fonte de carbono um meio sintético simulando resíduo amiláceo, para o cultivo de *R. eutropha*, com e sem suplementação do meio de cultura com ácido oléico e óleo de soja. Os conteúdos de P(3HB) e produtividade máxima em polímero, obtidos para as culturas sem suplementação, com suplementação de ácido oléico, e com suplementação de óleo de soja foram, respectivamente 46,0% e 0,22g.L⁻¹.h⁻¹; 50,5% e 0,37 g.L⁻¹.h⁻¹; 56,7% e 0,49 g.L⁻¹.h⁻¹. A utilização de resíduos das indústrias amiláceas para a produção de polihidroxialcanoatos promete ser uma alternativa potencial para redução dos elevados custos de produção dos biopolímeros.

Kim e Chang (1998) estudaram o uso de amido hidrolisado como fonte de carbono para as culturas de *Azotobacter chroococcum*, conseguindo, em batelada alimentada, uma concentração de 54 g.L⁻¹ com 46% de P(3HB) intracelular sob limitação em oxigênio. Eles atribuíram como vantagens neste experimento a capacidade do microrganismo não exigir grandes quantidades de sais e acumular P(3HB) em condições de limitação de oxigênio, o que, segundo os autores, ocorre freqüentemente em operações em larga escala. Ainda de acordo com estes pesquisadores, a otimização das condições de cultura para *A. chroococcum* pode tornar este microrganismo um bom candidato para a produção industrial de P(3HB), principalmente pela sua capacidade de consumir uma fonte de carbono de baixo custo como é o amido.

2.8.3.1.2 Gorduras e óleos

Outro estudo visando a redução de custos de produção de PHA's foi o uso de óleos vegetais, que são produtos agrícolas renováveis e de baixo custo, como fonte de carbono.

Fukui e Doi (1998) estudaram a capacidade de *R. eutropha* H16 crescer e produzir PHA's a partir de óleos vegetais como óleo de oliva, de milho, de palma e ácido oléico como únicas fontes de carbono. Os resultados mostraram que a bactéria cresceu muito bem nesses substratos, acumulando alto teor de P(3HB), entre 79-82 % de sua massa seca.

2.8.3.1.3 Soro de leite

O soro de leite é um subproduto da manufatura de queijos no qual mais de 50% dos ingredientes do leite estão presentes. Devido à alta concentração de matéria orgânica ainda presente neste resíduo, sua utilização como substrato é interessante do ponto de vista econômico (LUND et al., 1992). O soro de leite é o maior subproduto da manufatura de queijo e caseína, representando de 80 a 90% do volume de leite transformado.

Wong e Lee (1998) pesquisaram o uso de soro de leite como substrato para a cultura de *E. coli* recombinante para a produção de P(3HB). Quando alimentado com uma solução de soro de leite concentrada por evaporação com 210 g.L⁻¹ de lactose, conseguiram uma concentração celular seca de 87 g.L⁻¹ e uma concentração de P(3HB) de 69 g.L⁻¹ em regime batelada alimentada durante 49 horas. O conteúdo de P(3HB) foi de 80% da biomassa total seca e com uma produtividade em polímero de 1,4 g.L⁻¹.h⁻¹. Neste trabalho, os autores concluíram que foi possível aproveitar o soro de leite como fonte de carbono para as culturas de *E. coli* visando a produção de P(3HB). O soro de leite, dessa forma, deixaria de ser mais um resíduo causador de danos ao ambiente para passar a ser uma fonte de carbono aproveitável na produção de biopolímeros.

Marangoni (2000) com o objetivo de reduzir o custo de produção de P(3HB-co-3HV) por *R. eutropha*, estudou a utilização de soro de leite e a mistura de soro de leite e açúcar invertido como fonte de carbono. Quando o soro de leite foi usado como única fonte de carbono, o valor da velocidade específica máxima de crescimento foi de 0,20 h⁻¹. Quando foi utilizada a mistura de açúcar invertido e soro de leite, o valor de μ_{\max} foi de 0,23 h⁻¹. Comparando-se esses dois resultados, percebeu-se que tanto o soro de leite, quanto a mistura de soro e açúcar invertido eram alternativas atrativas para a utilização como fonte de carbono.

2.8.3.1.4 Melaço de cana-de-açúcar

Outro subproduto da indústria que vem sendo estudado como fonte alternativa de carbono na produção de biopolímero é o melaço de cana-de-açúcar. Este subproduto é largamente usado como fonte de carbono em fermentações envolvendo leveduras (PEPPLER, 1979, *apud* BEAULIEU et al., 1995). Além de ser mais barato que a glicose, o melaço contém elementos traços e vitaminas tais como a tiamina, riboflavina, piridoxina e niacinamida, que podem ser usados como potencializadores do crescimento (CRUEGER e CRUEGER, 1984, *apud* BEAULIEU et al., 1995).

No Instituto de Pesquisas Tecnológicas – IPT (IPT, 1993) foram realizados estudos com melaço invertido de cana-de-açúcar, que eles denominaram de HTM (*High Test Molasses*). A composição deste substrato é de 33% de sacarose, 33% de glicose e 33% de frutose. Os ensaios foram desenvolvidos usando nitrogênio como elemento limitante e utilizando, como cepa produtora de biopolímero, a *R. eutropha* DSM 545. Os resultados obtidos foram comparáveis àqueles obtidos para a glicose com um acúmulo de P(3HB) em biomassa seca de 74% e uma produtividade de $0,9 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

2.8.3.1.5 Bagaço de maçã

O bagaço de maçã é um resíduo da indústria processadora de maçã que apresenta problemas de despejo, causando danos ambientais. Este bagaço consiste na massa resultante da prensagem de maçãs para suco ou cidra (BEROVIC e OSTROVERSNIK, 1997). Devido ao fato de conter elevado teor de açúcares redutores, caracteriza-se como uma fonte de carbono interessante para o crescimento de microrganismos (STREIT, 2004). Assim, seu uso na produção de polihidroxialcanoatos torna-se muito atraente visto que é uma matéria-prima com baixo custo, contribuindo para a redução do preço final destes biopolímeros.

Rodrigues (2005) mostrou que é possível a produção de P(3HB) por *R. eutropha* utilizando bagaço de maçã como substrato. Embora a quantidade de polímero acumulado tenha sido baixa (14%), através da adição de suplementos nutricionais ao meio de cultura, obteve-se um aumento do conteúdo de P(3HB) acumulado, atingindo os valores de 34% com adição de ácido oléico e 22% com adição de óleo de soja. A suplementação não apenas favoreceu o aumento do conteúdo de polímero, como a produtividade e o fator de conversão de substrato em célula.

2.8.4 Custos de extração

Vários processos de extração de PHA's podem ser utilizados. Porém, o desenvolvimento de métodos eficientes, que possam ser diferentes para cada microrganismo empregado, é importante para o custo total da produção de PHA's (CHOI e LEE, 1999b).

Em um processo de extração, os grânulos de PHA's não devem conter muitos contaminantes (STEIBUCHEL et al., 1995). Um polímero altamente puro deve ser obtido pelo processo de lise da célula e solubilização de outros materiais celulares que não o PHA. Assim sendo, os métodos de digestão simples através de produtos químicos de baixo custo são os mais eficientes e econômicos para a extração de PHA's. Tais métodos são especialmente eficientes na extração de biopolímeros em células com elevado conteúdo de biopolímero e são aplicados na obtenção de PHA's de várias bactérias (CHOI e LEE, 1999b).

2.8.4.1 Extração de biopolímeros

Como o biopolímero é um produto intracelular, os métodos adotados para extração e purificação do P(3HB) contribuem significativamente para o desenvolvimento e economia global do processo (NANATO et al., 2001). Uma técnica que permita um processo simples, eficiente e menos poluente para a recuperação de P(3HB) é uma proposta necessária e atrativa.

Após o cultivo, as células contendo PHA's são separadas por processos convencionais, tais como centrifugação, filtração ou floculação-centrifugação. Em seguida, as células precisam ser rompidas para a extração do polímero. Há vários métodos desenvolvidos para essa extração, a maior parte aplicados à produção por *R. eutropha*.

A maioria dos processos utiliza solventes orgânicos como clorofórmio, carbonato de propileno e dicloroetano (KESSLER et al., 2001). Pela alta viscosidade de soluções contendo PHA's, são necessárias grandes quantidades de solvente tóxico e/ou volátil (aproximadamente 20 partes de solvente para 1 parte de polímero) (LEE, 1996a), o que não apenas aumenta o custo total de produção como também causa danos ao meio ambiente (CHOI e LEE, 1997).

Como uma alternativa para extração com solvente, um método diferente desenvolvido pela Imperial Chemical Industries (HOLMES e LIM, 1990 *apud* CHEN et al., 1999) envolveu um tratamento térmico da biomassa contendo P(3HB), seguido por digestão enzimática e lavagem com um surfactante aniônico para dissolver os materiais celulares não-PHB. Este processo é complicado, mesmo que os detalhes do processo de extração não estejam disponíveis, o custo relativamente alto das enzimas e o requerimento dos passos de digestão adicional para aumentar a pureza, resultaria em um custo alto de recuperação.

Outros métodos estudados envolveram o uso de hipoclorito de sódio para a digestão do material celular não-PHB. Entretanto, durante esta digestão houve grande degradação de P(3HB), podendo resultar em 50% de redução da massa molar. Porém, o uso de hipoclorito de sódio, juntamente com um surfactante reduziu significativamente esta degradação. Normalmente, obtém-se um polímero com pureza maior que 95% a partir deste processo (LEE, 1996a). No processo de extração de P(3HB) utilizando uma dispersão de hipoclorito de sódio e clorofórmio, Hahn et al., (1994) obtiveram 91% de recuperação de polímero com 97% de pureza utilizando uma solução de hipoclorito de sódio 30%, um tempo de tratamento de 90 minutos e utilizando metanol para precipitar o biopolímero.

A empresa ZENECA desenvolveu um processo de extração diferente, como uma alternativa à extração com solvente, para a produção industrial de P(3HB) e P(3HB-co-3HV). Nesse processo, primeiramente as células sofreram um tratamento térmico que provocava a lise celular e a desnaturação de ácidos nucléicos que poderiam interferir nos passos subsequentes. Na sequência, foram tratadas com uma mistura de várias enzimas hidrolíticas como lisoenzimas, fosfolipases, lecitinases, proteinases, entre outras. A maior parte do material celular foi hidrolisado por essas enzimas, enquanto o polímero permaneceu intacto. Após a lavagem e a floculação, o polímero foi extraído como um pó branco, que foi convertido em *chips* para ser comercializado (BYROM, 1987; KESSLER et al., 2001). Entretanto, o elevado custo das enzimas e a necessidade de passos adicionais de digestão resultaram em maior custo de extração por esse processo (CHOI e LEE, 1999a).

Choi e Lee, (1999a) desenvolveram um método simples de digestão alcalina para extrair P(3HB) a partir de *E. coli* recombinante. Quando as células de *E. coli*, contendo 77% de P(3HB), foram tratadas com NaOH 0,2 M a 30°C durante 1 hora, o P(3HB) foi extraído com uma pureza de 98,5%. Empregando o método de digestão alcalina, o custo de produção de P(3HB) foi 25% menor que o obtido empregando o método de digestão por surfactante-hipoclorito.

Chen et al., (1999) desenvolveram um processo que envolvia o uso de solução aquosa de surfactante-quelante. As condições de extração ótimas foram na razão de 0,12:1 surfactante-biomassa seca, razão de 0,08:1 quelante-biomassa seca. Sob tais condições, a pureza foi de 98,7%, taxa de recuperação de 93,3% e massa molar $3,1 \cdot 10^5$ Da, sendo a massa molar original de $4 \cdot 10^5$ Da. Apesar do método de surfactante e quelante apresentarem operação conveniente, aliado à alta qualidade do produto, um problema constatado foi o grande volume de líquido residual produzido durante a extração.

Devido às recentes vantagens na tecnologia de fermentações para a produção de P(3HB), densidades celulares mais altas que $100 \text{ g.célula seca.L}^{-1}$ podem ser desenvolvidas. Por isso, um método para a recuperação de culturas com alta densidade celular foi desenvolvido por Kim et al., (2003), consistindo em um método direto de digestão SDS (dodecil sulfato de sódio), com adição direta de SDS na cultura, agitação, tratamento com calor e passos de lavagem. A recuperação do P(3HB) obtida foi de 90%.

O trabalho mais recente em relação à recuperação de P(3HB) por *R. eutropha* foi desenvolvido por Kapritchoff et al., (2005) que testaram diferentes enzimas para a recuperação e purificação do biopolímero, o melhor resultado obtido foi utilizando pancreatina a 50°C e pH de 9,0, com obtenção de 90% de P(3HB) puro. O método para medir a pureza foi baseado na extração de P(3HB) de células usando dicloroetano, seguido de hidrólise e transesterificação dos produtos por propanólise.

A patente PI 9302312 apresentou o desenvolvimento de um método de extração em que as células, contendo o biopolímero, foram submetidas a um único solvente adequado, álcool isoamílico, e em que a insolubilização do polímero no solvente se verificou sem a presença de agente insolubilizante. A US-4101533 descreveu o processo que utiliza carbonatos cíclicos (1,2 carbonatos de propileno) como líquido de extração. No entanto, os carbonatos são relativamente caros e apresentam ponto de ebulição muito elevado, implicando em alto consumo energético na etapa de extração. A EP-24810 e 58480 e GB-21206741 descrevem um processo de separação de P(3HB) por resfriamento do líquido de extração (1,2 dicloroetano) até formação de géis. O solvente foi expelido e recuperado por prensagem dos géis de P(3HB). Estas técnicas requerem grande consumo de energia, pois envolvem etapas de congelamento e aquecimento e, além disso, a formação de géis pode ser lenta e incompleta (ROSSEL et al., 2002).

Um novo método *in situ* rápido e conveniente foi desenvolvido para isolamento de poli (3-mercaptopropionato) (poli (3MP)) das células de *E. coli* recombinante, aplicado em larga escala, diretamente no biorreator. Este método foi realizado pela adição de dodecilsulfato de sódio ao caldo de cultivo imediatamente após a fermentação, aquecido a 90⁰C por 20 min com intensa agitação por 2 horas. O poli (3MP) foi coletado por contínuas centrifugações e vários passos de lavagens foram realizados. O polímero foi então tratado com HCl para remover contaminantes, tais como proteínas, seguido de lavagem com água destilada e metanol. O polímero foi então submetido à extração com uma mistura de acetona: éter dietil a 60⁰C em um Soxhlet por 6 horas, para remover possíveis lipídios e, para obter um polímero altamente purificado. A pureza do poli (3-mercaptopropionato) isolado foi maior que 98% (THAKOR et al., 2005).

2.8.5 Estratégias de suplementação

Estratégias para a produção de PHA's com alta produtividade são necessárias para diminuir o custo total destes biopolímeros. Uma alternativa interessante é a utilização de suplementos ou indutores de produção de PHA's. Estes agentes podem interferir na via metabólica proporcionando maior produção de células e resultando em maior produtividade, mas também podem agir diretamente na síntese de PHA's.

A influência da utilização do ácido oléico como suplemento nutricional na produção de P(3HB-*co*-3HV) em culturas de *R. eutropha* DSM 545, a partir de açúcar invertido, foi estudada por Marangoni et al., (2000), onde obtiveram aumento da produtividade do polímero de 0,14 para 0,28 g.L⁻¹.h⁻¹ e também aumento de polímero acumulado, de 18,3 para 28,3 %, com a suplementação de ácido oléico.

Squio (2003) estudou o uso de suplementos nutricionais para a produção do copolímero, P(3HB-*co*-3HV). Foi testada a utilização dos ácidos graxos oléico, linoléico e uma mistura de ácidos linoléico/oléico (2:1 v/v), adicionados no início da fase de produção, em culturas de *R. eutropha*, tendo glicose/frutose como fonte de carbono. O uso dos ácidos graxos oléico e linoléico, como suplementos nutricionais nas culturas, aumentaram a produção de P(3HB-*co*-3HV) em cerca de 11%. A adição da mistura de ácidos linoléico/oléico mostrou-se um bom suplemento, tanto quanto o ácido oléico, obtendo-se resultados bastante próximos para as duas culturas.

Squio e Aragão (2003) estudaram a utilização de óleos vegetais como suplementos. Os ácidos oléico e linoléico fazem parte da composição de muitos óleos vegetais que são substratos de custo mais baixo que os ácidos graxos puros. Os resultados obtidos foram que o uso de óleos vegetais como suplementos nutricionais na produção de P(3HB) por *R. eutropha* levou a um aumento da produção de polímero. As melhores alternativas de substituição do ácido oléico foram os óleos de canola e oliva.

2.9 Modelagem matemática

Os microbiologistas de alimentos têm procurado modelos eficientes para o crescimento microbiano que possam permitir a previsão de conseqüências microbiológicas na estocagem de alimentos. Utiliza-se, de maneira clássica, três parâmetros na caracterização da curva de crescimento bacteriano: a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}), a duração da fase lag (λ) e o aumento logarítmico da população (A). Todos os parâmetros precisam ser estimados de forma exata em diversas áreas de conhecimento, em especial na microbiologia de alimentos (BATY e MULLER, 2004). Segundo Dalgaard e Koutsoumanis (2001), a estimativa destes parâmetros é essencial na caracterização de efeitos de antimicrobianos, otimização de meios microbiológicos e no desenvolvimento de modelos cinéticos utilizados nas tecnologias de alimentos e ferramentas.

Segundo Baranyi e Roberts (1994) *apud* Rodrigues (2005), o objetivo dos modelos preditivos em microbiologia de alimentos é minimizar ou prevenir o crescimento microbiano e não otimizá-lo, como em bioprocessos. Geralmente, a informação das características do meio é menor e menos exata que num biorreator, e os modelos são matematicamente mais simples e com maior conteúdo empírico. Embora os autores considerem que estes modelos não apresentem aplicação prática para Engenharia Bioquímica, o conhecimento ou previsão do crescimento microbiano pode ser fundamental para o estabelecimento de estratégias de cultura. Além disso, pesquisas vêm sendo realizadas com a utilização de modelos primários para a determinação de parâmetros cinéticos de culturas em batelada (WACHENHEIM et al., 2003).

Ambos modelos primários e secundários têm sido usados na microbiologia preditiva. Os modelos primários descrevem as mudanças na população microbiana em função do tempo, e os modelos secundários descrevem as respostas dos parâmetros obtidos pelos modelos primários para mudanças nas condições ambientais. As equações que representam os modelos primários e secundários utilizadas neste estudo serão apresentadas no Capítulo III - Material e Métodos.

2.9.1 Modelos primários

Os modelos primários descrevem mudanças no número de microrganismos ou nas respostas microbianas com o tempo, num ambiente específico. As respostas microbianas são: a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}), a duração da fase lag (λ) e o aumento logarítmico da população (A). Alguns dos modelos primários amplamente utilizados na literatura incluem: modelo de Gompertz, modelo de Gompertz Modificado e modelo Logístico (BUCHANAN et al., 1997; ERKMEN e ALBEN, 2002; FERREIRA, 2004).

O modelo de Gompertz tem sido utilizado com sucesso para descrever o comportamento microbiano em diferentes alimentos. Este modelo foi introduzido na microbiologia de alimentos com intuito de realizar a parametrização de uma curva de crescimento de *C. botulinum* (GIBSON et al., 1987 *apud* FERREIRA 2004).

Zwietering et al., (1991) propuseram a reparametrização da função de Gompertz para obter a representação direta dos parâmetros de interesse: λ , μ_{\max} e A , resultando no modelo de Gompertz Modificado. Isto facilitou o encontro de valores iniciais e o cálculo de intervalos de confiança durante o ajuste da curva. Concluíram também, que em todos os casos testados, o modelo de Gompertz Modificado foi estatisticamente suficiente para descrever dados de crescimento e também foi o mais simples de usar. Tanto o modelo de Gompertz original quanto o modificado, segundo Fu e Labuza (1993) têm sido testados em muitas espécies de microrganismos com bons ajustes.

Diversos autores reportaram o crescente uso de modelo Logístico para descrever o crescimento de microrganismos, assim como para prever inibição ou inativação do crescimento microbiano (TOBAJAS e GARCIA-CALVO, 2000; ERKMEN, 2001). Para culturas em que o acúmulo de produtos é verificado após a carência ou limitação de nutrientes, o modelo Logístico foi apropriado (WACHENHEIM et al., 2003).

Erkmen e Alben (2002) realizaram a modelagem matemática do crescimento microbiano e produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* cultivados em meios com diferentes pH. Os modelos analisados foram de Gompertz, Logístico, Schnute e Boltzman. O modelo que melhor ajustou os parâmetros de crescimento, μ , λ e A, foi o modelo de Gompertz.

2.9.2 Modelos Secundários

Os modelos secundários de crescimento descrevem as respostas de parâmetros primários às mudanças de condições ambientais como pH, temperatura e atividade de água. Quando a temperatura é o fator primário de interesse, como é freqüentemente o caso, estas equações podem ser baseadas nas equações de Arrhenius ou no modelo da Raiz Quadrada (Bélerádek) que são os dois principais modelos secundários que têm sido propostos para descrever o efeito da temperatura no crescimento microbiano (CAYRÉ et al., 2003).

Fu e Labuza (1993) mostraram que a lei de Arrhenius se aplicava para uma determinada faixa de temperatura, uma vez que o crescimento microbiano é um processo bioquímico. Deste modo, a influência da temperatura na velocidade específica de crescimento pode ser caracterizada pela energia de ativação, uma vez que todos os outros fatores são mantidos constantes. Embora a equação de Arrhenius seja empírica, ela também pode ser derivada de reações termodinâmicas. O modelo trabalha bem para uma faixa de temperatura limitada, mas extrapolações acima da temperatura ótima ou abaixo da temperatura mínima para o crescimento podem resultar em um ajuste pobre dos dados experimentais (SCHAFFNER e LABUZA, 1997).

O modelo da Raiz Quadrada é baseado na relação linear entre a raiz quadrada da velocidade específica máxima de crescimento e a temperatura. Este modelo foi inicialmente utilizado por Ratkowsky et al (1982) para modelar o efeito da temperatura na velocidade específica máxima de crescimento.

Outro modelo que tem chamado bastante atenção devido à sua simplicidade e flexibilidade é baseado na distribuição de Weibull, podendo descrever curvas de crescimento com concavidade para cima, concavidade para baixo e linear. Este modelo foi usado com sucesso para modelar inativação térmica de *Bacillus cereus*, *C. botulinum* e inativação com pressão de *L. monocytogenes* (CHEN e HOOVER, 2003). Guan et al., (2005), com o objetivo de estudar a cinética de inativação de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em diferentes temperaturas de processos, aplicaram o modelo de Weibull, pois identificaram que um modelo linear seria inadequado para descrever quaisquer curvas com resposta convexa (concavidade para cima ou para baixo), por isso foi aplicado o método de modelagem não-linear de Weibull.

2.10 Caracterização de biopolímeros

Dependendo de suas características, os biopolímeros podem ser aplicados em diversas áreas como, por exemplo, na indústria farmacêutica e de alimentos. Podem ser caracterizados pelas suas propriedades mecânicas, grau de cristalinidade, temperatura de transição vítrea, distribuição da massa molar, entre outras. Estas características são importantes de serem quantificadas, pois influem diretamente nas aplicações dos biopolímeros (DUARTE et al., 2004). A seguir, estão descritas algumas análises usadas para caracterização dos biopolímeros.

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica muito utilizada na caracterização do perfil de degradação de polímeros e outros tantos 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. A estabilidade térmica é definida como a capacidade da substância em manter suas propriedades o mais próximo possível de suas características iniciais (MOTHÉ, 2002 *apud* SPIER 2005). Em outras palavras a técnica de TGA pode ser definida como um processo contínuo que mede a variação da massa (perda ou ganho) de uma substância ou material como uma função da temperatura (LUCAS et al., 2001). A termogravimetria fornece as temperaturas de início de degradação (T_i) e temperatura máxima de degradação (T_{pico}), onde é possível avaliar a degradação térmica e a perda de massa dos polímeros.

Outra técnica utilizada para a caracterização é a calorimetria diferencial de varredura (DSC), na qual é medida a absorção ou liberação de calor em função da temperatura em que ocorrem as mudanças físicas ou químicas no polímero. Alterações de temperatura da amostra são devidas a variações de entalpia endotérmicas ou exotérmicas decorrentes de transições físicas ou de reações químicas. As variações de entalpia são chamadas transições de primeira ordem, como fusão, cristalização, vaporização, solidificação e adsorção (GALEGO et al., 2000).

A transição térmica dita de segunda ordem, conhecida como transição vítrea (T_g) é acompanhada pela variação da capacidade calorífica da amostra, juntamente com variações dimensionais e viscoelásticas, mas não apresentam variações de entalpia. Assim sendo, estas transições não geram picos nas curvas de DSC, manifestando-se na forma de uma alteração na linha de base (SPIER, 2005).

Uma das características do polímero que modificam a curva de DSC é a fusão. A fusão é uma característica dos polímeros semicristalinos. Polímeros amorfos não apresentam pico de fusão quando submetidos ao aquecimento em análises DSC, apresentam temperatura de transição vítrea (T_g), na qual se inicia o movimento de segmentos da cadeia polimérica, não é uma transição termodinâmica de fase e sim uma transição do tipo relaxação. A propriedade térmica básica na determinação da T_g é a capacidade calorífica do polímero. É uma transição de segunda ordem, ou seja, não envolve variação de entalpia (LUCAS et al., 2001).

Em amostras de polímeros, a técnica de DSC pode ser empregada na medição de temperaturas de transição vítrea (T_g), fusão (T_m) e cristalização (T_c), na determinação da entalpia de fusão e de cristalinidade, do grau de cristalinidade (através da entalpia de fusão), na influência de aditivos sobre as propriedades dos materiais resultantes, na medição de calor específico, no estudo de reações de polimerização e de cura e, ainda, na avaliação da degradação térmica e oxidativa (LUCAS et al., 2001).

A cromatografia de permeação em gel (GPC) é um dos métodos mais utilizados 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. Entre outros usos, quando aplicada a uma série homóloga de polímeros, como por exemplo, as proteínas, tendo densidade e formas semelhantes, podem fornecer um método rápido e útil de determinar a massa molar e a forma destas macromoléculas.

Esse tipo de cromatografia é também conhecida com os nomes de filtração em gel, permeação em gel, ou cromatografia em peneira molecular de difusão restrita. O GPC é uma técnica para determinação da completa distribuição de massa molar de um polímero, também oligômeros, monômeros e aditivos podem ser separados, contanto que exista uma significativa diferença de massa entre os componentes (SPIER, 2005). Utilizando esta técnica é possível a determinação simultânea da massa molar numérica média, da massa molar ponderal média e também da distribuição de massa molar.

A massa molar de um polímero é a principal propriedade que confere a um material polimérico propriedades mecânicas interessantes e úteis. Muitas propriedades mecânicas importantes dependem consideravelmente da massa molar da cadeia polimérica. Muitas vezes, há uma faixa de massa molar na qual uma determinada propriedade do polímero terá uma aplicação ótima (NOGUEIRA et al., 2002).

Durante a produção de um polímero são formadas cadeias com diversos tamanhos. Desta forma, não tem sentido falar em massa molar do polímero. Os polímeros apresentam, na realidade, uma distribuição de massa molar. Assim, quando se diz massa molar do polímero, na realidade fala-se de um valor médio. A polidispersidade dos polímeros é oriunda das variações estatísticas presentes nos processos de polimerização. A caracterização completa de um polímero só é possível após a determinação da massa molar e da exata distribuição das massas molares presentes no polímero (NOGUEIRA et al., 2002).

2.11 Produção de polímero biodegradável no Brasil

No Brasil, em meados da década de 90, deu-se início ao desenvolvimento de tecnologia para a produção de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, empregando-se matéria-prima renovável pela agricultura, em especial derivados da cana-de-açúcar. Após um levantamento de oportunidades, selecionou-se um grupo de polímeros da família dos polihidroxicanoatos por serem produzidos por bactérias em biorreatores a partir de carboidratos (COUTINHO et al., 2004).

O projeto para a produção do plástico biodegradável com a utilização da cana-de-açúcar teve seu desenvolvimento inicial através da parceria da COPERSUCAR (CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR - CTC) / USINA DA PEDRA / INSTITUTO DE PESQUISA TECNOLÓGICA DO ESTADO DE SÃO PAULO - IPT / UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP. Esse desenvolvimento teve início em 1992, com os estudos de fermentação realizados pelo IPT objetivando a produção de um polímero biodegradável e depois foi desenvolvida pelo CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR - CTC uma tecnologia de extração e purificação do polímero com a utilização de um álcool superior que foi empregado como solvente. Em 1995, foi instalada a planta piloto de produção na Usina da Pedra, em Serrana, no Estado de São Paulo. Nesta fase, foram realizados os primeiros testes para a produção do plástico biodegradável: P(3HB) e P(3HB-co-3HV). A capacidade nominal da planta era da ordem de 1,5 a 2,0 ton./mês, sendo que o importante era testar com equipamentos industriais a rota de produção desenvolvida laboratorialmente (ORTEGA FILHO, 2003).

Em 2000, com a criação da empresa PHB Industrial S/A, a planta piloto foi remodelada e adequada, operando com capacidade de 60 ton/ano. Com a conclusão da rota de produção através da planta piloto e a obtenção de um produto economicamente viável, a próxima etapa será o desenvolvimento e a implantação de uma planta comercial de produção com capacidade de 2000 ton/ano, que deverá entrar em produção no ano de 2006 (ORTEGA FILHO, 2003).

CAPÍTULO III

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentadas as descrições dos equipamentos e metodologias utilizadas para realização dos experimentos.

3.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a cepa de *Ralstonia eutropha* DSM 545 (atualmente *Cupriavidus necator*, VANDAMME e COENYE, 2004) por sua grande capacidade de acúmulo de polímero e crescimento em glicose como fonte de carbono (mutante espontâneo).

A cepa de *R. eutropha* foi mantida sob refrigeração, em meio ágar nutriente (NA) composto de 5,0 g.L⁻¹ de peptona de carne, 3,0 g.L⁻¹ de extrato de carne e 1,5 % de ágar, com repiques periódicos a cada 15 dias.

3.2 Meios de cultura

Os experimentos foram realizados utilizando-se duas pré-culturas. Como primeira pré-cultura, foi utilizado meio nutriente (NB) possuindo a seguinte composição: peptona de carne, 5,0 g.L⁻¹ e extrato de carne, 3,0 g.L⁻¹.

O meio mineral (MM) foi utilizado como segunda pré-cultura (sem limitação de nitrogênio) e como meio final (com limitação de nitrogênio). Este meio foi baseado em Aragão (1996) e sua composição, sem limitação, utilizada na segunda pré-cultura, está apresentada na Tabela 3.1.

Para a realização das culturas em frascos agitados e biorreator, utilizou-se o mesmo meio da Tabela 3.1, porém limitado em nitrogênio, com concentração final da fonte de nitrogênio ((NH₄)₂SO₄) no meio de 2,3 g.L⁻¹, suficiente para a obtenção de 5,0 g.L⁻¹ de biomassa no momento da limitação, baseado em um fator de conversão de nitrogênio em biomassa (Y_{N/X}) de 7,3 g.g⁻¹ (ARAGÃO, 1996).

Tabela 3.1 – Composição do meio MM.

	Componente	Solução Conc.(g.L ⁻¹) ^a	Volume adic. (mL.L ⁻¹ de meio)	Conc. no meio (g.L ⁻¹)
SOLUÇÃO 1	Ácido nitrilotriacético	19,1	10	0,19
	Citrato ferroso 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) ₂ SO ₄	200	25	5
	Solução de oligoelementos ^b		1	(1mL.L ⁻¹)
	Água deslilada ^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 concentrações das soluções estoque.

^b a composição da solução concentrada de oligoelementos é demonstrada na Tabela 3.2.

^c o volume de água é calculado em função do volume de soluções adicionado ao meio.

^d a composição da fonte de carbono depende do estudo realizado.

Tabela 3.2 - Composição da solução concentrada de oligoelementos.

Elemento	Concentração (g.L ⁻¹)
H ₃ BO ₃	0,30
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,20
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,10
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,03
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,03
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,02
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01

Fonte: Aragão (1996)

Cada uma das soluções concentradas apresentadas na Tabela 3.1 foram preparadas separadamente e armazenadas como soluções estoque. O pH da solução 1 foi ajustado a 7,0 com NaOH 10% (m/v) ou HCl 10% (v/v). Em seguida, as soluções 1, 2 e 3 foram autoclavadas separadamente durante 15 minutos a 121°C e adicionadas asépticamente para compor o meio final.

3.3 Condições de cultura

3.3.1 Pré-culturas

Duas pré-culturas foram necessárias para o cultivo de *R. eutropha*. A primeira foi realizada em frasco erlenmeyer aletado de 500 mL contendo 150 mL de meio NB, inoculado com alçadas da cepa mantida em meio ágar. Esta pré-cultura foi incubada em shaker a 30°C e 150 rpm por 24 h. Após esse período, iniciou-se a segunda pré-cultura em frasco aletado de 1000 mL contendo 300 mL de meio MM não limitado para os cultivos em frascos agitados e contendo 400 mL para o cultivo em biorreator. As condições em que foram mantidos o MM não limitado, MM limitado e a fonte de carbono foram dependentes dos ensaios realizados.

3.3.2 Culturas em frascos agitados

A maioria dos cultivos foi realizada em frascos agitados. Nestes casos, as culturas foram realizadas em frascos erlenmeyer aletados de 1000 mL, contendo 300 mL de meio MM limitado, inoculados com a segunda pré-cultura (MM) na quantidade de 10% de seu volume final. Nos casos em que a fonte de carbono foi o resíduo amiláceo, o MM não limitado foi incubado em shaker a 30°C e 150 rpm por 24 h. Nos experimentos, em que foi utilizada a glicose como fonte de carbono, o MM não limitado foi incubado em *shaker* na temperatura correspondente a cada cultivo a 150 rpm por 20 h. Os frascos de MM limitado foram incubados a 30, 35 e 40°C sob agitação de 150 rpm durante o tempo necessário para cada experimento. Foi realizado o controle manual do pH (7,0) durante a cultura com adição de NaOH 10% (m/v) e HCl 10% (v/v).

A Figura 3.1 mostra o equipamento utilizado para as culturas em frascos agitados.



Figura 3.1 - Shaker Certomat BS-1 utilizado nas culturas de *R. eutropha* em frascos agitados.

3.3.3 Cultura em Biorreator

Foi realizada uma cultura em biorreator de 5 L (BIOFLO 110, New Brunswick Scientific CO), utilizando-se o volume útil de 4 L. O biorreator, contendo a solução 1 do meio MM (Tabela. 3.1), foi autoclavado durante 15 min a 121°C. No início da cultura, adicionou-se a solução de glicose com concentração de 500 g.L⁻¹ para compor o meio inicial com 30 g.L⁻¹ de açúcar, e a solução de fosfato. O inóculo, proveniente da segunda pré-cultura (MM), foi adicionado na quantidade de 10% do volume final de meio no biorreator. Este cultivo em biorreator foi limitado em nitrogênio.

Durante a cultura, a temperatura foi mantida em 30°C e o pH ajustado a 7,0 com soluções de NaOH 10% (m/v) ou HCl 10% (v/v). Como antiespumante foi utilizado polipropilenoglicol Mn.ca. 2000 (Sigma-Aldrich). As condições iniciais de agitação e aeração foram de 400 rpm e 0,12 vvm respectivamente e aumentadas gradualmente até 900 rpm e 1,5 vvm, mantendo-se a concentração de oxigênio dissolvido superior a 20%.

A Figura 3.2 ilustra o equipamento utilizado no experimento.



Figura 3.2 - Biorreator Bioflo 110 utilizado no experimento.

3.3.4 Fontes de carbono

Foram utilizadas duas fontes de carbono nos cultivos e preparadas de acordo com o estudo realizado.

3.3.4.1 Glicose

Foram realizadas culturas em frascos agitados e uma cultura em biorreator, utilizando glicose como fonte de carbono. A utilização deste substrato deve-se ao fato de ser considerado meio padrão. Uma solução de glicose foi preparada e adicionada ao meio para proporcionar uma concentração final de 30 g.L^{-1} .

3.3.4.2 Meio sintético simulando resíduo amiláceo

Para este estudo, foi preparada uma solução simulando resíduo da indústria amilácea. Preparou-se uma solução a partir de arroz branco polido. O arroz foi quebrado em liquidificador (doméstico) e depois cozido em água destilada com agitação para obtenção de uma solução concentrada em amido. Como a bactéria *Ralstonia eutropha* não possui a capacidade de assimilar o amido como fonte de carbono, foi necessário hidrolisar o mesmo para a obtenção de glicose. Para isso foi realizada uma hidrólise ácida, com adição de HCl (10%) na proporção de 1:10 (ácido:solução com amido). A solução para hidrólise foi aquecida a 110°C por 2,5 h. Após, resfriou-se à temperatura ambiente e neutralizou-se a solução com adição de NaOH (10%). O meio foi decantado e centrifugado para a retirada de resíduos sólidos. A solução de amido hidrolisado foi autoclavada novamente e adicionada ao meio de cultivo para se obter uma concentração final de açúcar de 30 g.L^{-1} .

3.3.5 Alimentação com óleo de soja

Para verificar a influência do óleo de soja sobre a produção de biopolímeros, foi adicionado o óleo que contém aproximadamente 25% de ácido oléico, previamente esterilizado, na forma de pulsos no momento da limitação, a fim de se obter uma concentração equivalente a $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido oléico no meio, nos experimentos utilizando como fonte de carbono o resíduo amiláceo e a concentração de 0,3 e $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido oléico no meio, utilizando a glicose como substrato. Todos esses cultivos foram realizados em frascos agitados e para cada experimento suplementado foi realizado um experimento sem suplementação, considerado padrão.

3.4 Técnicas analíticas

3.4.1 Amostragem

A amostragem, nos ensaios em frascos agitados, foi realizada em menores proporções, devido ao menor volume de amostra disponível. Neste caso, a amostragem foi realizada a cada 2 h, por um tempo determinado devido à quantidade de substrato, onde não foi realizada alimentação em açúcar e a concentração mínima para manter o cultivo foi de aproximadamente 10 g.L⁻¹. Foram retiradas amostras de 2 mL para leitura de absorbância em espectrofotômetro e pH; 6 mL para determinação de substrato e polímero e no último ponto 6 mL para determinação da concentração celular por gravimetria. A amostra foi centrifugada em tubos *ependorf* de 2 mL cada, sendo que do sobrenadante foram realizadas as análises de substrato e nitrogênio durante e após o cultivo. O sobrenadante foi congelado e o precipitado foi lavado duas vezes com água destilada, e após a última centrifugação, foi congelado para posterior análise de polímeros. Os tubos *ependorf* para análise gravimétrica foram armazenados em estufa por 24 horas.

No ensaio em biorreator, a amostragem também foi realizada a cada 2 horas, por um tempo de 30 h, tempo necessário para se atingir aproximadamente 10 g.L⁻¹ de açúcar, sendo retirado um volume de 2 mL para leitura em espectrofotômetro, 14 mL foram centrifugados em tubos *ependorf*, sendo que o sobrenadante e precipitado sofreram o mesmo tratamento dos cultivos em frascos agitados.

3.4.2 Determinação da concentração de biomassa

3.4.2.1 Medida por espectrofotometria

A concentração de biomassa das amostras coletadas foi avaliada em um espectrofotômetro (modelo GENESYS 10 Vis, marca Spectronic Unicam, USA) medindo-se a absorbância a 600 nm. Para manter uma precisão adequada (região linear), a faixa de absorbância utilizada foi entre 0,0 e 0,8. A partir deste valor, foram feitas diluições para manter a linearidade.

3.4.2.2 Medida por gravimetria

Nos cultivos em frascos agitados e biorreator, a determinação por gravimetria foi realizada apenas no final da cultura. A concentração celular por gravimetria foi obtida a partir de um volume conhecido de cultura, 2 mL. O meio de cultura foi centrifugado em tubos *ependorf* de 2 mL cada, previamente secos e pesados, a 14000 rpm, e o precipitado foi ressuspenso com água destilada e centrifugado duas vezes para a lavagem, seguido de secagem em estufa a 90°C por 24 h. Após esse tempo, as amostras foram deixadas em dessecador por 20 min e pesadas. A amostragem foi realizada em triplicata.

3.4.3 Dosagem de açúcares

A dosagem de açúcares foi determinada pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), que determina a concentração de açúcares redutores. O reativo foi preparado da seguinte forma:

- 300 g de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e 16 g de NaOH foram dissolvidos em água destilada;
- aos poucos foi adicionado 10 g de ácido dinitrosalicílico;
- o volume foi completado para 1 L com água destilada.

Após o preparo do reagente, seguiu-se a seguinte metodologia: um volume de 400 μL de sobrenadante, previamente diluído, foi adicionado a 400 μL de reativo DNS e depois deixando em ebulição durante 5 minutos (banho-maria). Após esse período, fez-se o resfriamento em banho de gelo e adicionou-se 4 mL de água destilada. Após 15 minutos em repouso para estabilização da temperatura, foi realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm contra um branco de água destilada que passou pela mesma reação. A curva de calibração expressa a concentração de glicose (g.L^{-1}) *versus* absorbância em uma escala compreendida entre 0 e 3 g.L^{-1} de glicose. Um exemplo de curva de padrão é apresentada no Anexo I - Figura A.1.

3.4.4 Determinação de Nitrogênio

O nitrogênio determinado no meio de cultura foi o nitrogênio amoniacal. A dosagem do nitrogênio amoniacal foi realizada utilizando-se o *kit* Uréia ES, que determina uréia pelo método enzimático-colorimétrico. A uréia, através da ação enzimática, foi decomposta em nitrogênio amoniacal, que foi determinado por colorimetria.

Os reativos usados são os seguintes:

- tampão: tampão fosfato 20 mmol.L⁻¹, salicilato de sódio 62 mmol.L⁻¹, nitroprussiato de sódio 3,4 mmol.L⁻¹;
- oxidante: hipoclorito de sódio 7 mmol.L⁻¹ e NaOH 150 mmol.L⁻¹;
- enzima: solução de urease > 500 U.mL⁻¹;
- padrão: solução aquosa de uréia 50 mg.dL⁻¹;
- reagente de trabalho: mistura do conteúdo dos frascos de tampão e enzima.

O procedimento adotado para a determinação do nitrogênio amoniacal é apresentado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Procedimento de determinação de nitrogênio amoniacal.

	Branco	Padrão	Teste
Padrão	-	10 µL	-
Amostra	-	-	10 µL
Reagente de trabalho	1 mL	1 mL	1 mL
	Agitar e incubar por 10 min a 15-30°C. Adicionar		
Oxidante	1 mL	1 mL	1 mL
	Agitar e incubar por 10 min a 15-30°C		
Ler absorbância a 600 nm, zerando o aparelho com o branco			

A reação é estável por 2 horas. O cálculo para a determinação do nitrogênio amoniacal foi realizado conforme a equação 3.1:

$$NH_4^+ = \frac{abs.teste}{abs.padrão} \times 0,5 \quad (g.L^{-1}) \quad (3.1)$$

3.4.5 Dosagem de P(3HB)

O P(3HB) foi dosado por cromatografia gasosa, conforme o método de metanólise baseado em Braunegg et al., (1978), com as modificações propostas por Brandl et al. (1988).

As amostras, com volume conhecido de meio de cultura, foram centrifugadas a 14000 rpm por 3 minutos. O precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e congelado para posterior análise. Após descongelamento, o precipitado foi ressuspenso em um volume de 2 mL de clorofórmio e 2 mL de metanol acidificado (H_2SO_4 15%), contendo ácido benzóico $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ como padrão interno, com agitação em vórtex e a mistura foi então aquecida a 100°C durante 140 minutos. Depois de 1 h de aquecimento, a mistura foi agitada durante alguns segundos e devolvida ao aquecimento. Após resfriamento em banho de gelo, adicionou-se 1 mL de água destilada e as amostras foram agitadas durante 30 segundos, seguido de decantação. A fase orgânica (inferior) foi retirada com uma pipeta Pasteur e armazenada sob refrigeração para posterior análise em cromatografia gasosa. A curva padrão foi feita utilizando-se o poli(3-hidroxitirato) (Sigma), como padrão externo, com massa variando entre 0,0010 g a 0,03 g. A curva padrão foi estabelecida através da relação das áreas de P(3HB)/padrão interno pela massa de polímero. Submeteu-se os padrões à mesma metanólise que as amostras, a curva se encontra no Anexo I - Figura A.2.

Cromatografia gasosa:

A coluna utilizada para dosagem do P(3HB) foi de sílica fundida ($\varnothing 0,53\text{mm X } 30\text{m}$) modelo Supercowax-10. O cromatógrafo foi um CG-90 equipado com um detector de ionização de chama (DIC ar-hidrogênio). O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio a 30 mL.min^{-1} e as temperaturas de injeção, detecção e coluna foram respectivamente de 190°C , 230°C e 90°C , essa condição de coluna foi usada para os cultivos em resíduo amiláceo. Para os cultivos utilizando como fonte de carbono a glicose, foi utilizada uma rampa de aquecimento com as seguintes condições: temperatura inicial da coluna de 60°C , temperatura final de 110°C , taxa de aquecimento de 7°C.min^{-1} e taxa de resfriamento de $35^\circ\text{C.min}^{-1}$. O volume injetado foi de $2 \mu\text{L}$. As diferentes condições utilizadas para análise cromatográfica se deve exclusivamente às condições do aparelho utilizado. A integração e os cromatogramas foram obtidos através do *software* Clarity Lite (DataApex[®]). Um exemplo de cromatograma pode ser visto no Anexo I – Figura A.3.

3.5 Extração e caracterização de P(3HB)

3.5.1 Extração de P(3HB)

Como um novo método de extração de P(3HB) foi estudado, a metodologia se encontra em resultados e discussão.

3.5.2 Determinação da porcentagem de pureza e porcentagem de recuperação de P(3HB)

Uma massa conhecida do filme formado pelo novo método de extração foi submetida à metanólise e posterior dosagem de P(3HB) por cromatografia gasosa como descrito no item 3.4.5. A equação 3.2 determina a porcentagem de pureza do filme.

$$\%pureza = \frac{m_{PHB}}{m_{filme}} 100 \quad (3.2)$$

onde: m_{PHB} é a massa de biopolímero detectada por cromatografia (g) e m_{filme} é a massa total do filme utilizada para a análise cromatográfica.

A partir da porcentagem de pureza conhecida do filme, foi possível determinar a porcentagem de recuperação através da equação 3.3:

$$\%recuperação = \frac{m_p}{m_i} 100 \quad (3.3)$$

$$\text{sendo } m_p = m_f \cdot \%pureza \quad (3.4)$$

onde: m_p é a massa de filme puro após o processo de extração, ou seja, é a massa de filme obtida após extração (m_f) pela sua respectiva pureza (equação 3.4) e m_i é a massa total de P(3HB) nas células antes da extração.

3.5.3 Caracterização de P(3HB)

As análises de caracterização dos filmes de P(3HB) foram realizadas pela Central de Análises Químicas da Universidade Federal de Santa Catarina. A caracterização dos polímeros obtidos dos cultivos foi comparada ao P(3HB) fornecido pela PHB Industrial.

3.5.3.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Foram realizadas análises de DSC para caracterizar o grau de cristalinidade através da entalpia de fusão, temperatura de fusão (T_m) e temperatura de transição vítrea (T_g) das amostras.

As análises foram realizadas utilizando-se equipamento DSC-50 Shimadzu. As amostras foram aquecidas sob atmosfera inerte (nitrogênio) de -30°C a 200°C a $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ no primeiro aquecimento e o segundo aquecimento foi realizado de -50°C a 200°C a $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Para a determinação da T_g o resfriamento entre as duas corridas foi com choque térmico. Para a determinação da cristalinidade, o resfriamento foi realizado no próprio aparelho e também com choque térmico.

O grau de cristalinidade foi calculado a partir da equação 3.5.

$$\chi_c = \frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{\Delta H_m^0} 100 \quad (3.5)$$

onde: ΔH_m é a entalpia de fusão da amostra ($\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$), ΔH_c é a entalpia de cristalização da amostra ($\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$), ΔH_m^0 é a entalpia de fusão considerando polímero 100% cristalino ($\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$), para P(3HB) $\Delta H_m^0 = 142 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$.

3.5.3.2 Termogravimetria (TGA)

As amostras foram avaliadas por análise termogravimétrica onde foram monitoradas as temperaturas de início de degradação (T_i) e temperatura máxima de degradação (T_{pico}), obtidas através da primeira derivada das curvas de TGA, para avaliar a degradação térmica e perda de massa dos polímeros.

As análises foram realizadas em um equipamento TGA-50 Shimadzu. As amostras foram aquecidas de 25°C a 500°C a uma taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹, sob atmosfera de nitrogênio.

3.5.3.3 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

Foi realizada a análise de GPC para determinar a massa molar dos filmes de P(3HB). O equipamento utilizado para a análise foi um HPLC Shimadzu, modelo LC10AD, coluna: ProgelTM TSK, G600 HXL, 30cm x 78mm ID. A coluna foi mantida a 40°C, o volume de injeção de 50µL e utilizando o clorofórmio como solvente na fase móvel, sendo a vazão da fase móvel de 1,0 mL.min⁻¹

3.6 Modelagem do crescimento microbiano

3.6.1 Modelos Primários

Os modelos primários utilizados para o ajuste das curvas de crescimento foram: modelo de Gompertz, modelo de Gompertz Modificado e modelo Logístico. Os modelos foram usados para obtenção de uma equação para a curva de crescimento e foram comparados estatisticamente. Os parâmetros, velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max} (h⁻¹)), duração da fase lag (λ (h)) e o aumento logarítmico da população (A), que são mostrados na Figura 3.3, foram calculados para o modelo que melhor se ajustou às curvas de crescimento de *R. eutropha*. Os modelos primários utilizados para o ajuste são descritos a seguir.

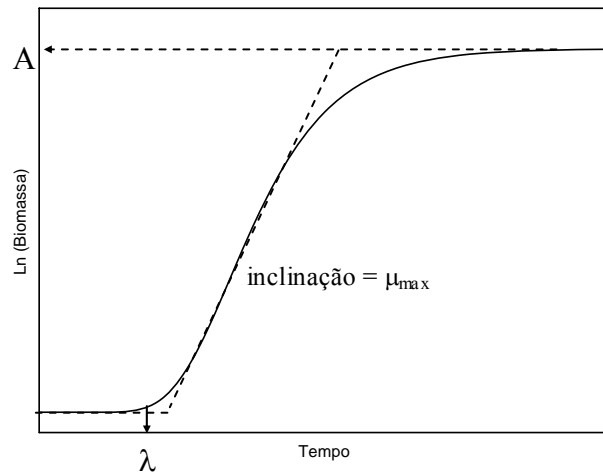


Figura 3.3 – Curva típica de crescimento microbiano em função do tempo, apresentando os parâmetros biológicos de crescimento.

3.6.1.1 Modelo de Gompertz

O ajuste do modelo de Gompertz aos dados experimentais foi realizado pela equação 3.6, segundo Erkmen, (2000):

$$\text{Ln}(X/X_0) = A \cdot \exp\{-\exp[-B \cdot (t - M)]\} \quad (3.6)$$

onde: $\text{Ln}(X/X_0)$ é o logaritmo neperiano do aumento da densidade celular no tempo t , t é o tempo em horas, sendo que X_0 é a concentração celular no tempo zero (g.L^{-1}) e X é a concentração celular no tempo t (g.L^{-1}), A é $\text{Ln}(X_\infty/X_0)$ onde X_∞ é a concentração celular máxima atingida no tempo $t = \infty$, B é a velocidade relativa máxima de crescimento no tempo M (h^{-1}), e M é o tempo necessário para atingir a velocidade máxima de crescimento (h).

Através destes parâmetros, foram calculadas a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{max}} = B \cdot A / e$ (h^{-1}), onde $e = 2,7182$) e a duração da fase lag ($\lambda = M - (1/B)$ (h)). Os dados experimentais foram ajustados segundo o modelo de Gompertz por um programa desenvolvido no PROFI (EQA-UFSC).

3.6.1.2 Modelo de Gompertz Modificado

O modelo de Gompertz Modificado é a reparametrização do modelo apresentado no item 3.6.1.1 e para a conclusão direta dos parâmetros de crescimento é expresso pela equação (3.7) (Erkmen, 2001):

$$\ln(x/x_0) = A \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_{\max} \cdot e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (3.7)$$

onde: $\ln(X/X_0)$ é o logaritmo neperiano do aumento da densidade celular no tempo t , t é o tempo em horas, sendo que X_0 é a concentração celular no tempo zero (g.L^{-1}) e X é a concentração celular no tempo t (g.L^{-1}), A é $\ln(X_\infty/X_0)$ onde X_∞ é a concentração celular máxima atingida no tempo $t = \infty$, μ_{\max} é a velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}) e λ é a duração da fase lag (h). Os dados experimentais foram ajustados segundo o modelo de Gompertz modificado pelo programa *Statistica 6.0*.

3.6.1.3 Modelo Logístico

O modelo Logístico foi aplicado de acordo com a equação (3.8) (Erkmen, 2000):

$$\ln(x/x_0) = \frac{A}{[1 + \exp(D - B \cdot t)]} \quad (3.8)$$

onde: $\ln(X/X_0)$ e A possuem o mesmo significado que os do modelo de Gompertz, D é um parâmetro adimensional e B é o crescimento relativo na metade do tempo da fase exponencial (h^{-1}). Destes parâmetros foram obtidos: a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max} = A \cdot B/4$ [h^{-1}]) e a duração da fase lag ($\lambda = (D-2)/B$ [h]). Os dados experimentais foram ajustados segundo o modelo Logístico por um programa desenvolvido no PROFI (EQA-UFSC).

Estes modelos foram numericamente ajustados às curvas de crescimento de *R. eutropha* nas diferentes fontes de carbono testadas.

3.6.2 Modelos Secundários

Os modelos secundários descrevem como os parâmetros obtidos no modelo primário mudam com parâmetros ambientais, como a temperatura. Neste estudo, foram analisados quatro modelos secundários: modelo Linear, modelo da Raiz Quadrada, equação de Arrhenius e modelo de Weibull, todos em relação aos três parâmetros obtidos no modelo primário.

3.6.2.1 Modelo Linear

A equação do modelo Linear está expressa na equação (3.9) (SPENDER e BAINER, 1964 *apud* ERKMEN 2001):

$$k = k_0 + rT \quad (3.9)$$

onde: k é o parâmetro de crescimento do modelo (μ , λ ou A) numa determinada T ($^{\circ}\text{C}$); k_0 é o parâmetro inicial de crescimento, r é a constante de regressão linear ($\text{dias}^{-1} \cdot ^{\circ}\text{C}^{-1}$), ambos obtidos pelo ajuste do modelo aos dados experimentais.

3.6.2.2 Modelo da Raiz Quadrada

O modelo da Raiz Quadrada é um modelo empírico para descrever a dependência do parâmetro de crescimento bacteriano com a temperatura. O modelo foi sugerido primeiramente por Ratkowsky et al., (1982) e pode ser expresso pela equação 3.10.

$$\sqrt{k} = b(T - T_{\min}) \quad (3.10)$$

onde: k é o parâmetro de crescimento do modelo (μ , λ ou A); b representa o coeficiente de regressão (h^{-1})^{-1/2} $^{\circ}\text{C}^{-1}$ e T_{\min} é a temperatura mínima teórica para o crescimento, ambos obtidos pelo ajuste do modelo aos dados experimentais.

3.6.2.3 Equação de Arrhenius

A equação de Arrhenius é representada pela equação 3.11 (FU e LABUZA, 1993).

$$k = A \cdot \exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) \quad (3.11)$$

onde: k é o parâmetro de crescimento do modelo (μ , λ ou A), A é um parâmetro obtido pelo ajuste do modelo (h^{-1}), T é a temperatura absoluta (K), Ea é a energia de ativação para crescimento bacteriano ($kJ \cdot mol^{-1}$) e R é a constante universal dos gases ($8,314 J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$).

3.6.2.4 Modelo de Weibull

O modelo de Weibull apresenta a seguinte equação (3.12) (PELEG e COLE, 1998):

$$k = b \cdot T^n \quad (3.12)$$

onde: k é o parâmetro de crescimento do modelo (μ , λ ou A); b é o parâmetro de escala e n é o parâmetro de forma, ambos obtidos pelo ajuste do modelo aos dados experimentais. Quando $n < 1$ a concavidade da curva é para cima, $n > 1$ concavidade da curva para baixo e se $n = 1$ é linear.

3.6.3 Análises Estatísticas

Os seguintes índices foram utilizados para comparação dos modelos conforme apresentado por Sutherland e Bayliss (1994) e Ferreira (2004): erro médio quadrático (MSE), coeficiente de correlação (R^2), fator bias e fator de exatidão.

Quanto menor o valor de MSE (equação 3.13), melhor é o ajuste do modelo aos dados experimentais.

$$MSE = \frac{RSS}{n} = \frac{\sum (\text{Valor}_{\text{observado}} - \text{Valor}_{\text{predito}})^2}{n} \quad (3.13)$$

onde: RSS é a soma dos quadrados residuais e n é o número de graus de liberdade (número de pontos experimentais - número de parâmetros do modelo).

O fator bias representa a diferença média entre os valores observados e preditos. Pode ser calculado através da equação (3.14):

$$\text{fator bias} = 10^{\left(\frac{\sum \log(\text{Valor}_{\text{observado}} / \text{Valor}_{\text{predito}})}{n} \right)} \quad (3.14)$$

O fator bias procura dar o mesmo peso na média dos valores que sobreestimam e subestimam a média, ou seja, é um desvio relativo médio. Se bias igual 1, a resposta observada é igual à resposta predita. No entanto, quando bias maior 1, significa que o valor predito é maior que o observado. Quando bias menor 1, significa que o valor predito é menor que o observado (ROSS, 1996).

O fator de exatidão (equação 3.15) é uma medida da diferença média absoluta entre os valores preditos e observados.

$$\text{fator de exatidão} = 10^{\left(\frac{\sum |\log(\text{Valor}_{\text{observado}} / \text{Valor}_{\text{predito}})|}{n} \right)} \quad (3.15)$$

Conforme aumenta o valor deste fator, o modelo é menos exato na média, ou seja, no cálculo do fator bias como se obtém uma média dos valores, os com sinais opostos, tendem a se cancelar, já no cálculo do fator de exatidão, por se tratar de valores absolutos será sempre maior que 1. Quanto maior seu valor, menor a exatidão da estimativa da média.

CAPÍTULO IV

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Modelagem do crescimento de *Ralstonia eutropha* em resíduo amiláceo e glicose para produção de polihidroxialcanoatos

A modelagem matemática do crescimento microbiano foi utilizada para estimar parâmetros como: velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}), tempo de fase lag (λ) e aumento logarítmico da população (A), necessários para o estudo do crescimento da bactéria sob diferentes condições. Os modelos foram aplicados para descrever o crescimento de *Ralstonia eutropha* nas diferentes fontes de carbono, com e sem suplementação de óleo de soja, em diferentes temperaturas de cultivo.

Estratégias de produção de P(3HB) para elevar o conteúdo de biopolímero e diminuir o custo total dos bioplásticos são necessárias. Uma alternativa interessante é a utilização de suplementos nutricionais ou indutores de produção de P(3HB) em cultivos utilizando um substrato de baixo custo, como um resíduo da indústria amilácea. O estudo da temperatura de cultivo de *R. eutropha* também é um parâmetro importante pois, se houver a possibilidade de operação a temperaturas mais altas que a utilizada (30°C) em níveis industriais, é interessante em virtude da economia em algumas etapas de resfriamento.

4.1.1 Modelagem do crescimento de *R. eutropha* cultivada em resíduo amiláceo

Para melhor descrever o crescimento de *R. eutropha* em resíduo amiláceo foram testados os modelos de Gompertz, Gompertz Modificado e Logístico, e comparados pelos índices estatísticos. Os resultados das análises estatísticas realizadas para comparação dos modelos primários aplicados às curvas de crescimento de *R. eutropha* utilizando como fonte de carbono o resíduo amiláceo, nas temperaturas de cultivo de 30, 35 e 40°C, estão apresentados na Tabela 4.1. As curvas de crescimento de *R. eutropha* às temperaturas de cultivo de 30, 35 e 40°C, obtidas pelos três modelos testados, estão no Anexo I - Figuras A.4, A.5 e A.6, respectivamente.

Tabela 4.1 - Valores dos índices estatísticos para os modelos de Gompertz, Gompertz Modificado e Logístico, aplicados às curvas de crescimento de *R. eutropha* em resíduo amiláceo.

Índices	Modelos matemáticos								
	Resíduo amiláceo								
	30°C			35°C			40°C		
	GP ^c	GM ^d	LO ^e	GP ^c	GM ^d	LO ^e	GP ^c	GM ^d	LO ^e
MSE ^a	0,0144	0,0069	0,0281	0,0136	0,0126	0,0308	0,0003	0,0003	0,0015
Fator bias	0,9293	0,8877	0,8685	0,9885	0,9898	0,9777	1,0001	1,0001	1,0074
F.exatidão	1,2001	1,1839	1,3214	1,0644	1,0600	1,1052	1,0001	1,0091	1,0229
R ² ^b	0,9963	0,9948	0,9882	0,9929	0,9934	0,9825	0,9994	0,9993	0,9962

^aMSE: erro médio quadrático; ^bR²: coeficiente de correlação; ^cGP: Gompertz; ^dGM: Gompertz Modificado; ^eLO: Logístico.

O erro médio quadrado, MSE, representa a adequação dos modelos aos dados experimentais. Quanto menor o valor do MSE, melhor o ajuste do modelo. Comparando os valores dos MSE da Tabela 4.1, observa-se que o modelo que obteve a melhor predição dos dados de crescimento de *Ralstonia eutropha* às temperaturas de 30°C e 35°C foi o modelo de Gompertz Modificado e para a temperatura de 40°C tanto o modelo de Gompertz Modificado quanto o modelo de Gompertz apresentaram o mesmo valor. Os coeficientes de correlação obtidos nos modelos de GM e GP estiveram todos acima de 0,99, indicando que estes modelos apresentaram um bom ajuste aos dados experimentais, podendo desta forma serem utilizados para a predição do crescimento da bactéria. Cabe ressaltar que, embora a literatura compare frequentemente estes dois modelos, Gompertz e Gompertz Modificado (ERKMEN 2000; ERKMEN 2001), eles sempre fornecem valores de ajustes próximos, pois o modelo de GM é apenas uma reparametrização do modelo de GP. Para o modelo Logístico, somente no cultivo a 40°C obteve-se o coeficiente de correlação acima de 0,99 e nas outras temperaturas esse coeficiente esteve acima de 0,98, mostrando desse maneira que o modelo LO apresenta um bom ajuste aos dados, sendo entretanto, inferior aos outros modelos testados.

O fator bias e de exatidão fornecem uma indicação objetiva da performance do modelo. Os valores do fator bias na temperatura de 40°C para os três modelos mostram que a resposta observada é igual à resposta predita. Para a temperatura de 35°C, os valores estiveram próximos de 1,0 e para o cultivo a 30°C, os valores foram inferiores a 1, indicando que o valor predito é menor que o observado.

Os valores do fator de exatidão representam quanto os preditos diferem dos observados em média. Conforme aumenta esse valor, o modelo é menos exato na média, isto é, menor a exatidão da estimativa. Os valores do fator de exatidão obtidos estão próximos de 1, para os três modelos a 40°C e para os modelos de GM e GP a 35°C. Já para 30°C, esses valores são bastante superiores a 1, mostrando que os modelos aplicados nos cultivos a 30°C apresentam menor exatidão da estimativa da média, sendo no modelo LO o maior valor observado, 1,32.

Pode-se dizer que, para as três temperaturas testadas nos cultivos, o modelo GM foi o que apresentou os melhores resultados para a predição do crescimento de *Ralstonia eutropha*, por isso este modelo foi escolhido para o cálculo dos parâmetros de crescimento.

A Figura 4.1 apresenta o ajuste do modelo GM aos dados experimentais do crescimento de *R. eutropha* cultivada em resíduo amiláceo, às temperaturas de 30, 35 e 40°C.

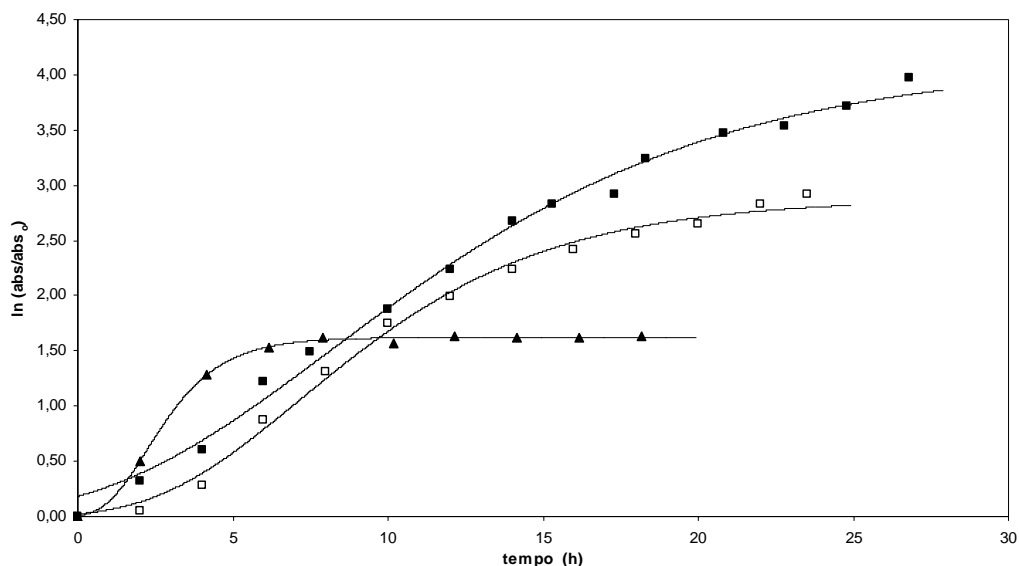


Figura 4.1- Curvas de crescimento de *R. eutropha* em resíduo amiláceo expressa em $\ln (\text{abs}/\text{abs}_0)$ pelo tempo nas temperaturas de 30°C (\square), 35°C (\blacksquare) e 40°C (\blacktriangle). As linhas representam o modelo de Gompertz Modificado ajustado aos dados experimentais.

A partir das curvas ajustadas na Figura 4.1 obtiveram-se os parâmetros μ_{\max} , λ e A , para as três temperaturas de cultivo em resíduo amiláceo que estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Parâmetros obtidos pelo ajuste do modelo de Gompertz Modificado para o crescimento de *R. eutropha* em resíduo amiláceo.

Parâmetro	Resíduo amiláceo		
	30°C	35°C	40°C
μ_{\max}^a (h ⁻¹)	0,23	0,21	0,45
λ^b (h)	2,6	0,9	0,9
A ^c	2,88	4,12	1,62

^a μ_{\max} : velocidade específica máxima de crescimento; ^b λ : duração da fase lag;

^c A: aumento logarítmico da população.

Os resultados apresentados na Figura 4.1 e na Tabela 4.2 mostram que a bactéria *Ralstonia eutropha* possui capacidade de crescimento nas diferentes temperaturas de cultivo em resíduo amiláceo. Os valores de μ_{\max} para as temperaturas de 30°C e 35°C estão de acordo com os valores encontrados na literatura, onde a faixa de crescimento se encontra em torno de 0,22 h⁻¹ (KOYAMA e DOI, 1995). Porém, no cultivo a 40°C, o valor da velocidade específica máxima de crescimento foi aproximadamente o dobro das outras culturas testadas. Analisando-se a Figura 4.1, percebe-se que a duração da fase exponencial é de aproximadamente 5 horas, seguida de uma fase estacionária, resultando em um A baixo, quando comparado aos outros cultivos. Com isso pode-se dizer que, apesar de apresentar velocidade específica máxima de crescimento bastante superior aos outros dois cultivos, o cultivo a 40°C apresenta a menor concentração celular, que não é interessante para a produção de P(3HB).

A maior fase de adaptação da célula ao meio de cultivo foi de 2,6 h para o cultivo a 30°C e para os outros experimentos, foi menor que 1 h. Entretanto, era de se esperar que esse comportamento fosse contrário, pois todos os pré-inoculados foram conduzidos a 30°C e, no momento do cultivo, houve a troca de temperatura para 35°C e 40°C, e a 30°C, manteve-se a temperatura do pré-inoculo.

O aumento logarítmico da população a 35°C foi 43,34% superior ao cultivo a 30°C demonstrando dessa maneira que provavelmente a produção de P(3HB) tenha sido maior, já que a limitação do crescimento ocorreu com a mesma biomassa em 12 horas de cultivo. A 40°C, o valor do A obtido foi bem inferior às outras temperaturas, indicando uma menor produção de biomassa nesta temperatura.

4.1.2 Modelagem do crescimento de *R. eutropha* cultivada em resíduo amiláceo com suplementação nutricional

Foi estudado o crescimento de *R. eutropha* utilizando o resíduo amiláceo como fonte de carbono, suplementado com óleo de soja. Estudos preliminares mostraram que a adição de 0,3 g. L⁻¹ de ácido oléico aumenta a produção de P(3HB). Como o óleo de soja possui aproximadamente 25% de ácido oléico, a quantidade equivalente a 0,3 g.L⁻¹ de ácido oléico foi adicionada no momento da limitação.

Os experimentos foram realizados às temperaturas de 30, 35 e 40°C. Os resultados das análises estatísticas realizadas para comparação dos modelos primários aplicados às curvas de crescimento *R. eutropha* utilizando como fonte de carbono o resíduo amiláceo com adição de óleo de soja, estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Valores dos índices estatísticos para os modelos de Gompertz, Gompertz Modificado e Logístico, aplicados as curvas de crescimento de *R. eutropha* em resíduo amiláceo com suplementação de óleo.

Índices	Modelos matemáticos								
	Resíduo amiláceo com suplementação								
	30°C			35°C			40°C		
	GP ^c	GM ^d	LO ^e	GP ^c	GM ^d	LO ^e	GP ^c	GM ^d	LO ^e
MSE ^a	0,0127	0,0051	0,0249	0,0103	0,0094	0,0253	0,0045	0,0039	0,0085
Fator bias	0,9099	0,9525	0,8556	0,9896	0,9911	0,9733	1,000	0,9958	1,0078
F.exatidão	1,1257	1,0860	1,0487	1,0612	1,0566	1,1029	1,0390	1,0340	1,0544
R ^{2b}	0,9961	0,9964	0,9872	0,9959	0,9954	0,9867	0,9936	0,9900	0,9857

^aMSE: erro médio quadrático; ^bR²: coeficiente de correlação; ^cGP: Gompertz; ^dGM: Gompertz Modificado; ^eLO: Logístico.

Observando-se os valores obtidos de MSE na Tabela 4.3, nota-se que o modelo que obteve a melhor predição dos dados de crescimento de *Ralstonia eutropha* nas três temperaturas foi o modelo de Gompertz Modificado. Os coeficientes de correlação obtidos nos modelos de GM e GP estiveram todos acima de 0,99, indicando que estes modelos apresentaram um bom ajuste aos dados experimentais, podendo desta forma serem utilizados para a predição do crescimento da bactéria *R. eutropha*. No caso do modelo Logístico, os coeficientes de correlação estiveram acima de 0,98, sendo inferiores aos outros modelos testados.

Os valores do fator bias na temperatura de 40°C estão bem próximos a 1 para os três modelos, mostrando que a resposta observada é igual à resposta predita. Para os cultivos a 35°C e 30°C o modelo de GM foi o que apresentou os valores mais próximos a 1,0.

Conforme aumenta o valor do fator exatidão, o modelo é menos exato na média, isto é, menor a exatidão da estimativa. Os valores do fator de exatidão obtidos estão próximos de 1, para os três modelos a 40°C, para os modelos de GM e GP a 35°C e para os modelos GM e LO a 30°C.

Como nos cultivos realizados sem suplementação de óleo, pela proximidade dos valores obtidos para os diferentes índices calculados, em geral, o modelo de Gompertz Modificado foi o que forneceu os melhores resultados para a predição do crescimento de *Ralstonia eutropha* nas diferentes temperaturas de cultivo, com suplementação nutricional.

A Figura 4.2 apresenta o ajuste do modelo GM aos dados experimentais do crescimento de *R. eutropha* cultivada em resíduo amiláceo com suplementação de óleo de soja. A adição de óleo foi realizada com 12 horas de cultivo, momento este do início da fase de produção de P(3HB).

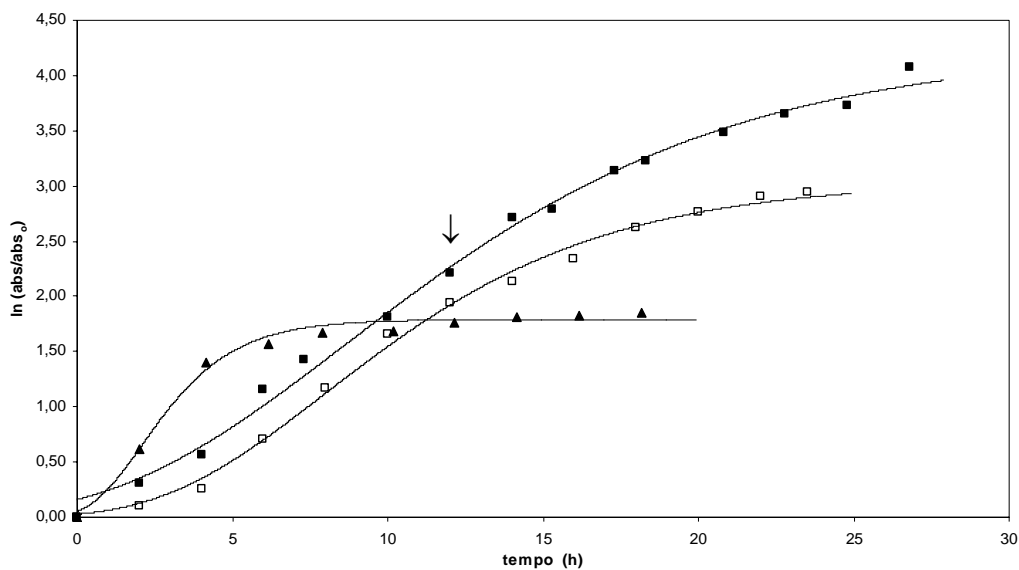


Figura 4.2 - Curvas de crescimento de *R. eutropha* em resíduo amiláceo com suplementação de óleo de soja expressa em $\ln(\text{abs}/\text{abs}_0)$ pelo tempo nas temperaturas de 30°C (□), 35°C (■) e 40°C (▲). As linhas representam o Modelo de Gompertz Modificado ajustado aos dados experimentais. (↓) representa o momento da suplementação com óleo de soja.

A partir das curvas ajustadas na Figura 4.2, obtiveram-se os parâmetros μ_{max} , λ e A , para as três temperaturas de cultivo em resíduo amiláceo com suplementação que estão apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Parâmetros de crescimento obtidos do modelo de Gompertz Modificado para os cultivos em resíduo amiláceo com suplementação de óleo de soja.

Parâmetro	Resíduo amiláceo com suplementação		
	30°C	35°C	40°C
μ_{\max} (h ⁻¹) ^a	0,22	0,21	0,40
λ (h) ^b	2,8	1,4	0,4
A ^c	3,04	4,25	1,80

^a μ_{\max} : velocidade específica máxima de crescimento; ^b λ : duração da fase lag;

^c A: aumento logarítmico da população.

Os resultados apresentados na Figura 4.2 e na Tabela 4.4 mostram que a bactéria *Ralstonia eutropha* possui capacidade de crescimento nas diferentes temperaturas de cultivo em resíduo amiláceo com suplementação de óleo de soja. As velocidades específicas máximas de crescimento para as três temperaturas apresentaram o mesmo comportamento observado nas culturas sem suplementação, com velocidades de cultivos próximas a 30°C e 35°C, e a 40°C o valor da velocidade foi aproximadamente o dobro das outras culturas testadas. Porém, como mostra a Figura 4.2, a cultura apresenta um aumento logarítmico da população (A) baixo, representando 59% da concentração celular final quando comparado ao cultivo a 30°C e de 42% ao cultivo a 35°C.

A maior fase de adaptação da célula ao meio de cultivo foi a 30°C, apresentando a duração da fase lag de 2,8 horas, para o cultivo 35°C a adaptação foi de 1,4 horas e para 40°C a fase lag foi menor que 1 hora.

O comportamento do crescimento observado com suplementação é bem próximo ao obtido sem suplementação, o que era de se esperar, porque a adição de óleo só foi realizada no início da fase de produção.

4.1.3 Modelagem do crescimento de *Ralstonia eutropha* cultivada em glicose

Foi estudado o crescimento de *R. eutropha* utilizando glicose como fonte de carbono, às temperaturas de cultivo de 30, 35 e 40°C. Os resultados das análises estatísticas realizadas para comparação dos modelos primários aplicados às curvas de crescimento estão apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Valores dos índices estatísticos para os modelos de Gompertz, Gompertz Modificado e Logístico, aplicados as curvas de crescimento de *R. eutropha* em glicose.

Índices	Modelos matemáticos								
	Glicose sem suplementação								
	30°C			35°C			40°C		
	GP ^c	GM ^d	LO ^e	GP ^c	GM ^d	LO ^e	GP ^c	GM ^d	LO ^e
MSE ^a	0,0043	0,0043	0,0136	0,0119	0,0119	0,0235	0,0061	0,0061	0,0147
Fator bias	1,0067	1,0058	0,9888	0,9956	0,9956	0,9834	1,0105	1,1118	1,0177
F.exatidão	1,0304	1,0286	1,0753	1,0743	1,0743	1,0112	1,0349	1,0349	1,0529
R ² ^b	0,9956	0,9974	0,9873	0,9920	0,9934	0,9835	0,9954	0,9942	0,9885

^aMSE: erro médio quadrático; ^bR²: coeficiente de correlação; ^cGP: Gompertz; ^dGM: Gompertz Modificado; ^eLO: Logístico.

Observando-se os valores de MSE obtidos na Tabela 4.5, nota-se que em todos os modelos estes valores são baixos. Entretanto, o ajuste dos modelos de Gompertz e Gompertz Modificado apresentaram os mesmos valores, sendo que nos cultivos a 30°C e 40°C esses valores apresentaram melhor predição dos dados de crescimento de *Ralstonia eutropha*. Os coeficientes de correlação obtidos nos ajustes dos modelos de GM e GP estiveram todos acima de 0,99, indicando que os modelos testados apresentaram um bom ajuste aos dados experimentais. No modelo Logístico, os coeficientes de correlação estiveram acima de 0,98, mostrando que o modelo não apresenta um ajuste tão bom aos dados experimentais, quando comparado aos outros modelos testados.

Em geral, os valores do fator bias nos modelos de GP e GM estão bem próximos a 1, já para o modelo LO nos cultivos a 30°C e 35°C esses valores se encontram em torno de 0,98, indicando que o valor predito é menor que o observado. Os valores do fator de exatidão obtidos estão próximos de 1 para os três modelos testados.

Pela proximidade dos valores obtidos para os diferentes índices calculados, em geral, o modelo de Gompertz Modificado foi o que apresentou os melhores resultados para a predição do crescimento de *Ralstonia eutropha* nas diferentes temperaturas de cultivo.

A Figura 4.3 apresenta o ajuste do modelo GM aos dados experimentais do crescimento de *R. eutropha* cultivada em glicose.

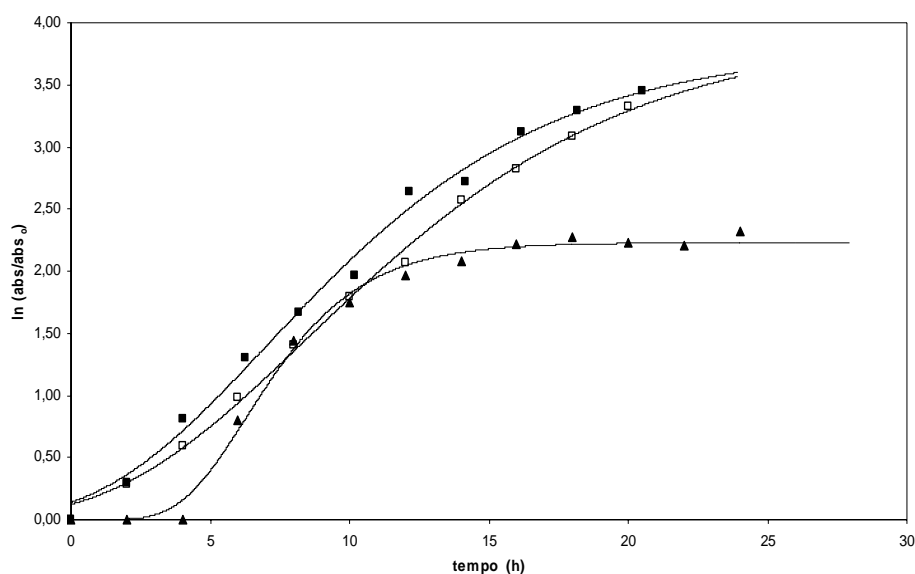


Figura 4.3 - Curvas de crescimento de *R. eutropha* em glicose expressa em $\ln(\text{abs}/\text{abs}_0)$ pelo tempo nas temperaturas de 30°C (\square), 35°C (\blacksquare) e 40°C (\blacktriangle). As linhas representam o modelo de Gompertz Modificado ajustado aos dados experimentais.

A partir das curvas ajustadas na Figura 4.3 pelo modelo de Gompertz Modificado, obtiveram-se os parâmetros μ_{max} , λ e A, para as três temperaturas de cultivo em glicose que estão apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Parâmetros obtidos pelo modelo de Gompertz Modificado para os cultivos em glicose.

Parâmetro	Glicose sem suplementação nutricional		
	30°C	35°C	40°C
$\mu_{\text{max}} (\text{h}^{-1})^{\text{a}}$	0,21	0,24	0,35
$\lambda (\text{h})^{\text{b}}$	1,7	1,2	4,0
A^{c}	3,95	3,80	2,23

^a μ_{max} : velocidade específica máxima de crescimento; ^b λ : duração da fase lag;

^c A: aumento logarítmico da população.

Quando se compara as Figuras 4.1 (em resíduo amiláceo) e 4.3 (em glicose) observa-se que a bactéria apresenta o mesmo comportamento nos dois substratos em relação à temperatura. Analisando a Tabela 4.6, pode-se perceber que as velocidades específicas máximas de crescimento para as temperaturas de 30°C e 35°C estão dentro da faixa normalmente encontrada (KOYAMA e DOI, 1995). O μ_{\max} a 40°C se apresenta bastante superior quando comparado aos outros cultivos. Entretanto, a duração da fase exponencial é de apenas 5 horas de cultivo. Depois desse tempo, a bactéria entra em fase estacionária e estabiliza seu crescimento até o final da cultura, apresentando um aumento logarítmico da população baixo, representando aproximadamente 58% da concentração celular final quando comparado aos cultivos de 30°C e 35°C.

Quando se compara os valores de λ desses cultivos em glicose com os cultivos em resíduo amiláceo, percebe-se que adaptação a 30°C no meio em glicose foi mais rápida, a 35°C foi praticamente os mesmos valores, mesmo com variação dos meios, já a 40°C os valores foram muito diferentes, enquanto que o cultivo em resíduo amiláceo teve $\lambda < 1$ hora, em glicose esse valor chegou a quase 4 horas. Além do substrato ser diferente, o pré-inóculo para as culturas em glicose foi conduzido com as temperaturas que seriam realizadas o crescimento e produção de P(3HB), não precisando se adaptar à troca de temperatura quando fossem realizadas as culturas, porém a 40°C a fase lag foi bastante superior.

O aumento logarítmico da população a 30°C e 35°C foram praticamente os mesmos, sendo que a 30°C esse valor foi ligeiramente superior. Enquanto que na temperatura de 40°C esse valor foi bastante inferior quando comparado com as outras temperaturas.

4.1.4 Modelagem do crescimento de *R. eutropha* cultivada em glicose com suplementação nutricional

Nesta etapa, foi estudado o crescimento de *R. eutropha* utilizando glicose como fonte de carbono e adição de óleo de soja, com suplementação no início da fase de produção, a fim de se obter o equivalente a 0,3 g.L⁻¹ de ácido oléico no meio, na temperatura de 35°C e de 0,6 g.L⁻¹ de ácido oléico no meio, a 30°C e 40°C. Os resultados das análises estatísticas realizadas para comparação dos modelos primários aplicados às curvas de crescimento, estão apresentados no Anexo II - Tabela A.1.

Como nas análises realizadas nas outras condições de cultivo já apresentadas, também para o cultivo em glicose suplementado com óleo de soja, o modelo de Gompertz Modificado foi o que apresentou o melhor ajuste para prever o crescimento de *Ralstonia eutropha*.

A Figura 4.4 apresenta o resultado do acompanhamento do crescimento, medido em absorbância, de *R. eutropha* em glicose, mesmo sendo cultivos com diferentes quantidades de suplemento, as curvas ajustadas pelo modelo de Gompertz Modificado, são coincidentes. Este fato permite a comparação das curvas de crescimento em diferentes temperaturas, mesmo com suplementações diferentes, conforme apresentado na Figura 4.5.

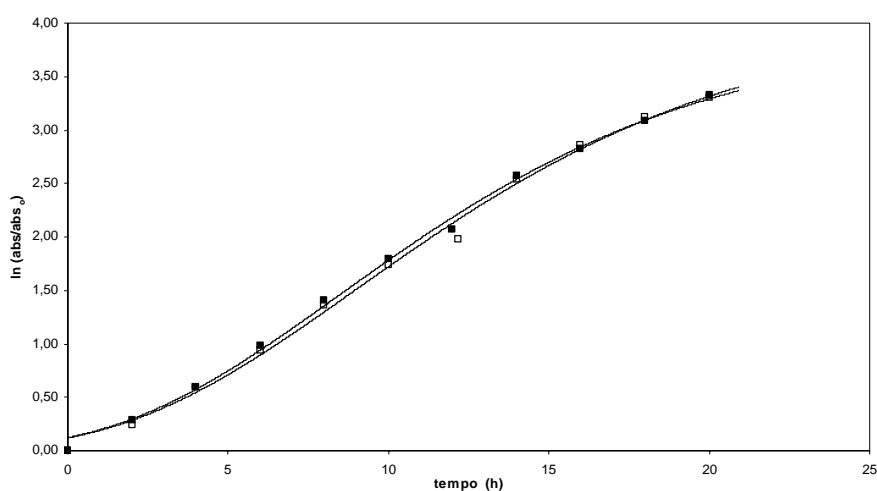


Figura 4.4 - Curvas de crescimento de *R. eutropha* cultivadas em glicose a 30°C, sem suplementação de óleo de soja (■) e com suplementação de óleo de soja, equivalente a 0,6 g.L⁻¹ em ácido oléico (□). As linhas representam o modelo de Gompertz Modificado ajustado aos dados experimentais.

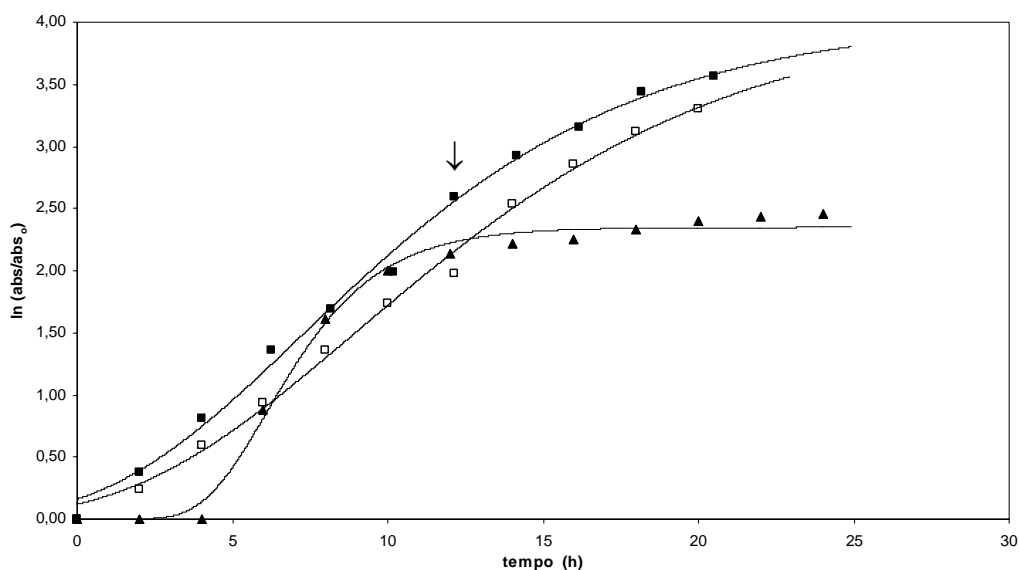


Figura 4.5 - Curvas de crescimento de *R. eutropha* em glicose com suplementação de óleo de soja expressa em $\ln(\text{abs}/\text{abs}_0)$ pelo tempo nas temperaturas de 30°C (\square), 35°C (\blacksquare) e 40°C (\blacktriangle). As linhas representam o modelo de Gompertz Modificado ajustado aos dados experimentais. A suplementação com óleo de soja foi realizada com 12 horas de cultivo (\downarrow).

A partir das curvas ajustadas na Figura 4.5 pelo modelo de Gompertz Modificado obteve-se os parâmetros μ_{max} , λ e A , que estão apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Parâmetros obtidos do modelo de Gompertz Modificado para os cultivos em glicose com adição de óleo de soja.

Parâmetro	Glicose com suplementação		
	30°C*	35°C	40°C*
$\mu_{\text{max}} (\text{h}^{-1})^a$	0,21	0,24	0,42
$\lambda (\text{h})^b$	1,9	1,1	4,1
A^c	4,10	4,03	2,35

^a μ_{max} : velocidade específica máxima de crescimento; ^b λ : duração da fase lag;

^c A : aumento logarítmico da população. *cultivo com suplementação de 0,6 g.L⁻¹ de ácido oléico no meio.

Como a suplementação se dá no início da fase de produção, os valores dos parâmetros de crescimento com suplementação, apresentados na Tabela 4.7, são próximos aos apresentados nos cultivos sem suplementação, Tabela 4.6.

Com base nos dados discutidos e analisando a Figura 4.5 e a Figura 4.3 (sem suplementação), pode-se dizer que o cultivo a 35°C foi o que apresentou melhores respostas para o cultivo de *R. eutropha* em glicose com e sem suplementação nutricional.

Rodrigues (2005) aplicou os três modelos para ajustar as curvas de crescimento de *R. eutropha*, demonstrando que os modelos não apresentaram diferenças significativas entre si na descrição do crescimento. Entretanto o modelo Logístico foi o que apresentou os melhores resultados nos índices estatísticos calculados. Já para os ajustes aplicados no presente estudo, o modelo Logístico não apresentou um bom ajuste quando comparado com os modelos de Gompertz Modificado e Gompertz.

4.2 Utilização do modelo de Gompertz Modificado para prever o momento da limitação da cultura

Como mostrado nos itens anteriores, o modelo de Gompertz Modificado foi o que apresentou os melhores ajustes para descrever os parâmetros de crescimento (μ_{\max} , λ e A) de *R. eutropha* em todas as condições de estudo testadas. Como a produção de P(3HB) está relacionada à limitação do crescimento, utilizou-se as equações do modelo para a definição do momento da limitação do crescimento. No modelo de Gompertz Modificado, considera-se que há um ponto na fase exponencial em que a velocidade específica de crescimento é máxima. Para conhecer esse tempo, se fez à derivada da equação fornecida pelo modelo de GM, onde foi possível definir o momento em que a velocidade específica de crescimento é máxima e relacionar esse dado com o momento da limitação de nitrogênio para que haja a produção de P(3HB).

A derivada da equação de Gompertz Modificado é representada pela equação 4.1:

$$\frac{dy}{dt} = a(\exp(-\exp(b-ct)))(-\exp(b-ct))(-c) \quad (4.1)$$

onde: $a=A$; $b = \frac{\mu_{\max}e}{A}\lambda + 1$; $c = \frac{\mu_{\max}e}{A}$

Os dados da Tabela 4.8 apresentam os parâmetros de crescimento de *Ralstonia eutropha* nos cultivos em glicose a 30 e 35°C, com e sem suplementação de óleo de soja.

Tabela 4.8 - Parâmetros de crescimento de *Ralstonia eutropha* utilizando glicose como fonte de carbono, com e sem suplementação de óleo de soja.

Culturas	Parâmetros de crescimento		
	μ_{\max} (h ⁻¹)	λ (h)	A
30°C sem óleo	0,21	1,7	3,95
35°C sem óleo	0,24	1,2	3,80
30°C com óleo	0,21	1,9	4,10
35°C com óleo	0,24	1,1	4,03

A Figura 4.6 apresenta o gráfico da derivada da equação de GM em função do tempo (equação 4.1) e o consumo de nitrogênio ao longo da cultura, para os experimentos utilizando a glicose como fonte de carbono, nas temperaturas de 30°C e 35°C, com e sem suplementação de óleo de soja (Tabela 4.8). Os cultivos a 40°C não foram comparados, pois não ocorreu a limitação do nitrogênio nesta temperatura (Anexo I - Figura A.7).

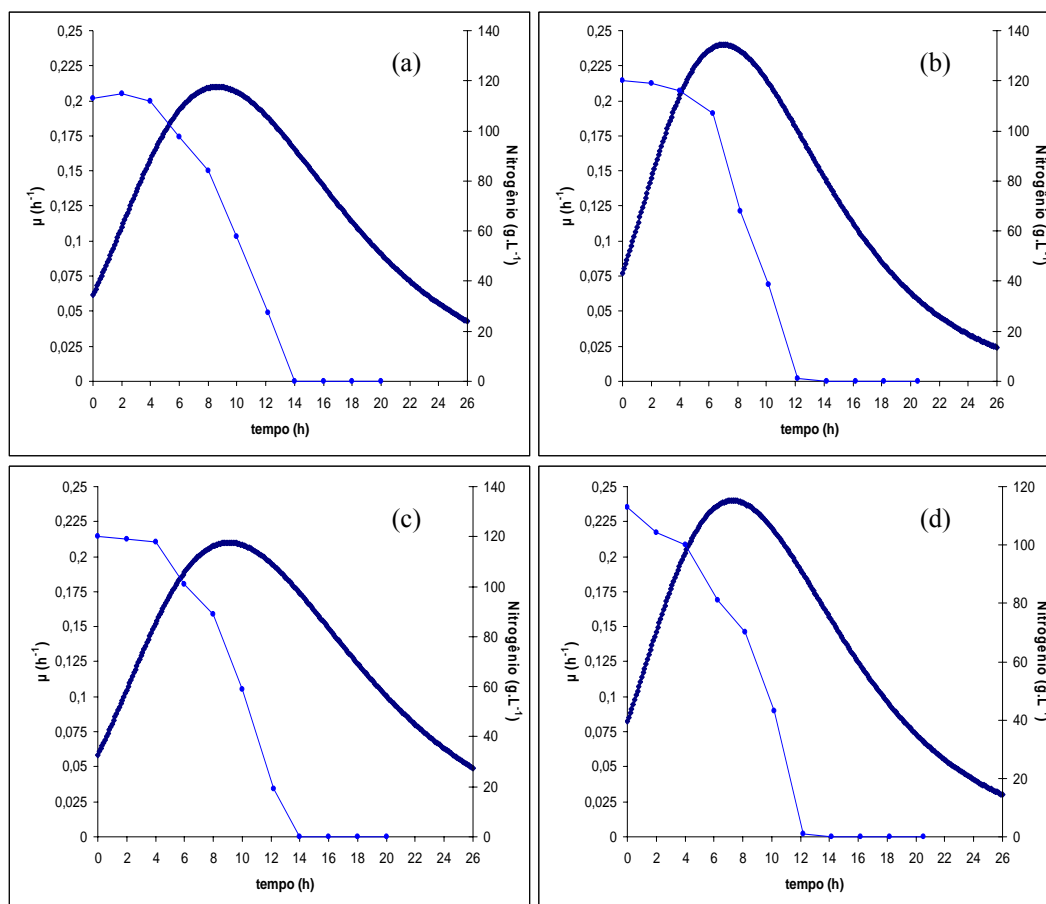


Figura 4.6 - Acompanhamento do μ pelo tempo (—) e consumo de nitrogênio pelo tempo (---) nos cultivos utilizando a glicose como fonte de carbono, nas seguintes condições: (a) cultivo a 30°C; (b) cultivo a 35°C; (c) cultivo a 30°C com suplementação de óleo de soja; (d) cultivo a 35°C com suplementação de óleo de soja.

A partir da Figura 4.6 é possível observar o momento em que derivada é máxima, correspondendo à velocidade específica máxima de crescimento em cada cultivo, ou seja, onde ocorre o pico na curva, e compará-lo ao momento em que cessa o nitrogênio. Os dados obtidos pela Figura 4.6 estão apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 - Valores de tempo, onde a velocidade específica de crescimento é máxima e onde ocorre a limitação de nitrogênio, nas culturas utilizando glicose como fonte de carbono, em diferentes temperaturas, com e sem suplementação de óleo de soja.

Culturas	Tempo (h) onde μ_{\max}	Limitação de N (h)
Glicose 30°C- sem óleo	8,6	14
Glicose 30°C- com óleo	7,0	12
Glicose 35°C- sem óleo	9,0	14
Glicose 35°C- com óleo	7,3	12

Avaliando os dados da Tabela 4.9, pode-se relacionar o momento em que a velocidade específica de crescimento é máxima e o momento em que a concentração de nitrogênio é nula, ou seja, o momento do início da fase de produção de biopolímeros. A partir do momento em que a bactéria atinge seu μ_{\max} , a fase de produção de biopolímero inicia-se logo depois de 5,04 ($\pm 0,27$) horas. Esse comportamento foi observado em todos os cultivos apresentados na Figura 4.6, nos quais foram variadas as temperaturas de cultivo, com e sem suplementação de óleo de soja. Com essas respostas, pode-se prever o momento da limitação de nitrogênio a partir do momento em que a velocidade específica de crescimento é máxima.

Não foram apresentados os dados dos cultivos em resíduo amiláceo, pois a resposta do *kit* enzimático que analisa o nitrogênio durante a cultura não se mostra eficaz em resíduo amiláceo, havendo alguma interferência do mesmo.

4.3 Influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento: μ_{\max} , λ e A

Os modelos secundários são aqueles que descrevem como os parâmetros do modelo primário mudam com os fatores ambientais, como o pH, temperatura, atividade de água, etc. Serão avaliados quatro modelos secundários: modelo Linear, modelo da Raiz Quadrada, modelo da equação de Arrhenius e modelo de Weibull. Estes modelos foram aplicados para os parâmetros obtidos a diferentes temperaturas, nos meios usando resíduo amiláceo e glicose, com e sem suplementação de óleo.

Quando o substrato utilizado foi resíduo amiláceo, com e sem suplementação, não houve ajuste de nenhum dos modelos secundários aos parâmetros de crescimento, μ e A , como pode ser observado na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 - Coeficiente de Correlação (R^2) obtidos pelos modelos: Linear, Raiz Quadrada, Equação de Arrhenius e Weibull, para os parâmetros de crescimento μ e A obtidos pelo modelo GM nos cultivos em resíduo amiláceo, sem e com suplementação.

Parâmetros de crescimento	Coeficiente de Correlação (R^2) obtidos pelos modelos:			
	Linear	Raiz Quadrada	Eq. Arrhenius	Weibull
$\mu (h^{-1})^1$	0,6775	0,6616	0,5630	0,6034
$\mu (h^{-1})^2$	0,7424	0,7411	0,6644	0,7025
A^1	0,2519	0,3105	0,2938	0,3317
A^2	0,2605	0,3149	0,2936	0,2605

¹cultivo sem suplementação; ²cultivo com suplementação.

Como se pode observar na Tabela 4.10, os coeficientes de correção para o μ variaram de 0,5630- 0,7424 e para o A de 0,2519-0,3317, mostrando que não descrevem o efeito da temperatura sobre estes parâmetros de crescimento neste substrato. As curvas com os modelos são apresentadas no Anexo I- Figura A.8, A.9, A.10 e A.11.

Quando o substrato foi a glicose, a mesma falta de ajuste foi observada, como pode ser observado na Tabela 4.11. Não foi realizada a modelagem secundária para os cultivos em glicose com suplementação de óleo de soja, pois não apresentam as mesmas condições de cultivo, variando a concentração de óleo de soja no momento da limitação.

Tabela 4.11 - Coeficiente de Correlação (R^2) obtidos pelos modelos: Linear, Raiz Quadrada, Equação de Arrhenius e Weibull, para os parâmetros de crescimento μ e A obtidos pelo modelo GM nos cultivos em glicose.

Modelos	Coeficiente de Correlação (R^2)	
	μ (h^{-1})	A
Linear	0,8799	0,8111
Raiz Quadrada	0,8927	0,8040
Eq. Arrhenius	0,8522	0,7276
Weibull	0,8801	0,7632

Os coeficientes de correlação para os cultivos em glicose foram maiores do que os coeficientes de correlação para os cultivos em resíduo amiláceo. Mesmo assim não descreveram bem o efeito da variação da temperatura sobre estes parâmetros de crescimento, onde o R^2 variou de 0,8522-0,8927 para o parâmetro de crescimento μ e de 0,7276-0,8111 para A.

Em relação ao parâmetro λ , no meio utilizando-se resíduo amiláceo como substrato, suplementado com óleo, foi possível modelar o efeito da variação da temperatura sobre este parâmetro, como pode ser observado na Figura 4.7.

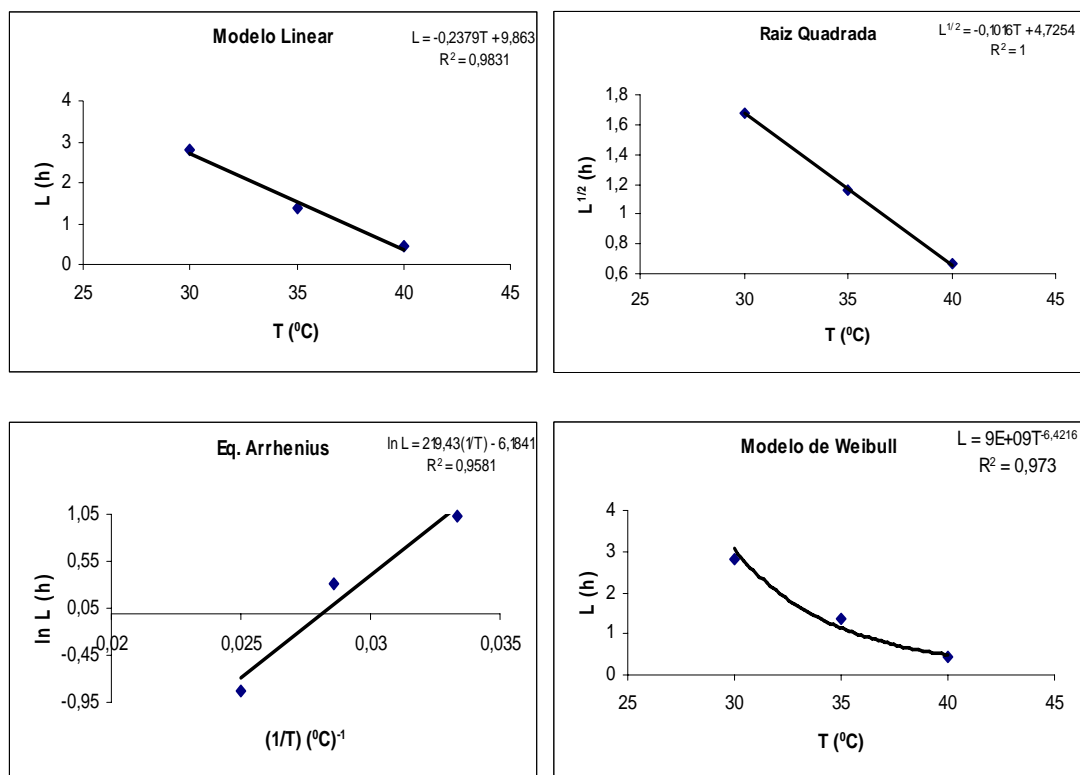


Figura 4.7 - Efeito da temperatura na duração da fase lag para os modelos: Linear, Raiz Quadrada, Equação de Arrhenius e Weibull nos cultivos em resíduo amiláceo com suplementação nutricional.

Todos os valores de R^2 foram superiores a 0,95, como mostra a Figura 4.7, por isso foram realizadas as análises estatísticas para a escolha do melhor modelo secundário. Os valores obtidos dessas análises estão apresentados na Tabela 4.12

Tabela 4.12 - Valores dos índices estatísticos para os modelos secundários: Modelo Linear, Modelo da Raiz Quadrada, Modelo da Equação de Arrhenius e Modelo de Weibull.

Índices	Modelos secundários			
	Linear	Raiz Quadrada	Eq. Arrhenius	Weibull
MSE ^a	0,0242	0,0000	0,0367	0,0431
Fator bias	1,0743	0,9991	1,9696	1,0599
F.exatidão	1,2155	1,0026	2,1494	1,1715
R^2 ^b	0,9831	1,0000	0,9581	0,9730

^aMSE: erro médio quadrático; ^b R^2 : coeficiente de correlação; ^cGP: Gompertz; ^dGM: Gompertz Modificado; ^eLO: Logístico.

Observando a Tabela 4.12 notou-se claramente que as melhores respostas para a análise estatística foi do modelo da Raiz Quadrada, onde o coeficiente de regressão foi de 1,0 e com isso os índices estatísticos apresentaram valores muito próximos dos ideais. Os modelos de Weibull e Linear também apresentaram um bom ajuste. O modelo da Equação de Arrhenius foi o que apresentou os valores do fator de bias e exatidão superiores aos necessários para um bom ajuste.

O modelo secundário que se ajustou ao efeito da temperatura na duração da fase lag foi o modelo da Raiz Quadrada. Nota-se claramente pela Figura 4.7 que o aumento da temperatura leva a uma diminuição do valor de λ . A equação (4.2) descreve a dependência de λ com a temperatura nos cultivos em que se utilizou o resíduo amiláceo como fonte de carbono, suplementados com óleo de soja.

$$\sqrt{\lambda} = -0,1016.T + 4,7254 \quad (4.2)$$

O mesmo comportamento não foi observado na cultura não suplementada, onde o coeficiente de correlação para os modelos foi aproximadamente 0,8, sendo o melhor ajuste no modelo da Equação de Arrhenius com R^2 de 0,8852 (Anexo I- Figura A.12). Como estas culturas são idênticas na fase de crescimento, nota-se que a modelagem pode não representar bem este comportamento, muito provavelmente devido ao baixo número de pontos para a modelagem.

Em função dos resultados obtidos decidiu-se, então, realizar experimentos com outras temperaturas para tornar a modelagem do efeito da temperatura sobre os parâmetros de crescimento mais confiável. O crescimento foi feito em glicose, para se evitar variações provenientes do substrato.

Foram realizadas culturas às temperaturas de 30, **32,5**, 35, **37,5** e 40°C, que estão apresentadas na Figura 4.8. Como nos outros cultivos, o modelo de GM foi o que melhor descreveu o crescimento da bactéria em glicose nas diferentes temperaturas. A comparação dos modelos se encontra no Anexo II- Tabela A.2.

A Figura 4.8 apresenta o ajuste do modelo GM aos dados experimentais do crescimento de *R. eutropha* cultivada em glicose nas cinco temperaturas de cultivo. Os cultivos com as temperaturas complementares apresentaram comportamento parecido com os cultivos anteriores, a 30°C e 35°C.

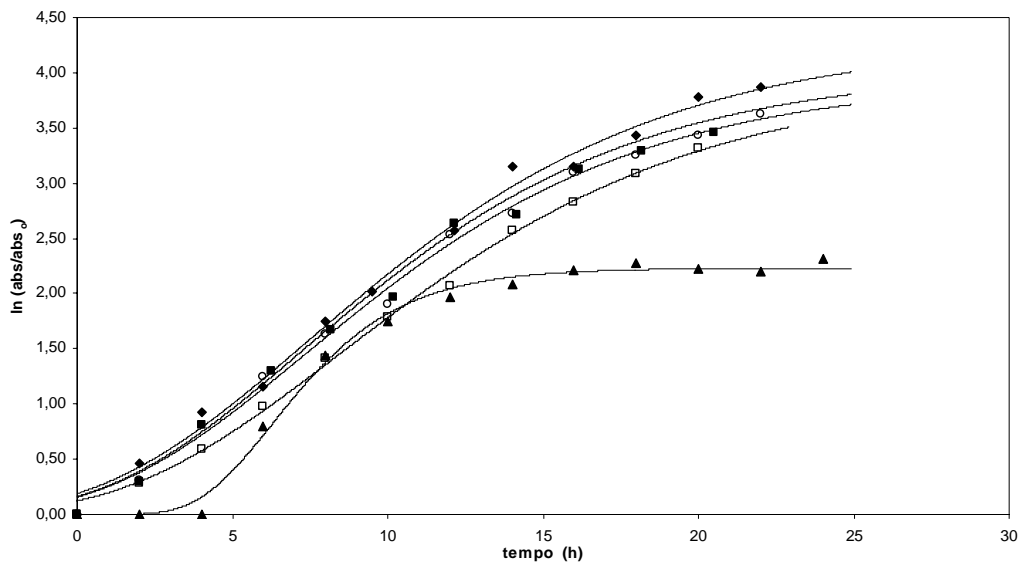


Figura 4.8 - Curvas de crescimento de *R. eutropha* em glicose expressa em $\ln(\text{abs}/\text{abs}_0)$ pelo tempo nas temperaturas de 30°C (\square), 32,5°C (\blacklozenge), 35°C (\blacksquare), 37,5°C (\circ) e 40°C (\blacktriangle). As linhas representam o modelo de Gompertz Modificado ajustado aos dados experimentais.

A partir das curvas ajustadas na Figura 4.8 pelo modelo de Gompertz Modificado, obtiveram-se os parâmetros μ_{max} , λ e A, para as cinco temperaturas de cultivo em glicose que estão apresentados na Tabela 4.13.

Tabela 4.13 - Parâmetros obtidos do modelo de Gompertz Modificado para os cultivos em glicose em cinco temperaturas.

Parâmetro	Glicose sem suplementação nutricional				
	30°C	32,5°C	35°C	37,5°C	40°C
$\mu_{\text{max}} (\text{h}^{-1})^a$	0,21	0,24	0,24	0,23	0,35
$\lambda (\text{h})^b$	1,7	0,9	1,2	1,1	3,9
A ^c	3,95	4,30	3,80	3,94	2,23

^a μ_{max} : velocidade específica máxima de crescimento; ^b λ : duração da fase lag; ^c A: aumento logarítmico da população.

Os valores de duração da fase lag variaram de 0,9 a 3,9. Os valores de A no intervalo de 30°C a 37,5°C são muito próximos, sendo ligeiramente superior a 32,5°C (4,3). Os valores de μ_{max} são bastante próximos e inferiores ao apresentado a 40°C.

A aplicação dos modelos Linear, Raiz Quadrada, Equação de Arrhenius e Weibull aos dados experimentais sobre a influência da variação de μ com a temperatura estão apresentados na Figura 4.9.

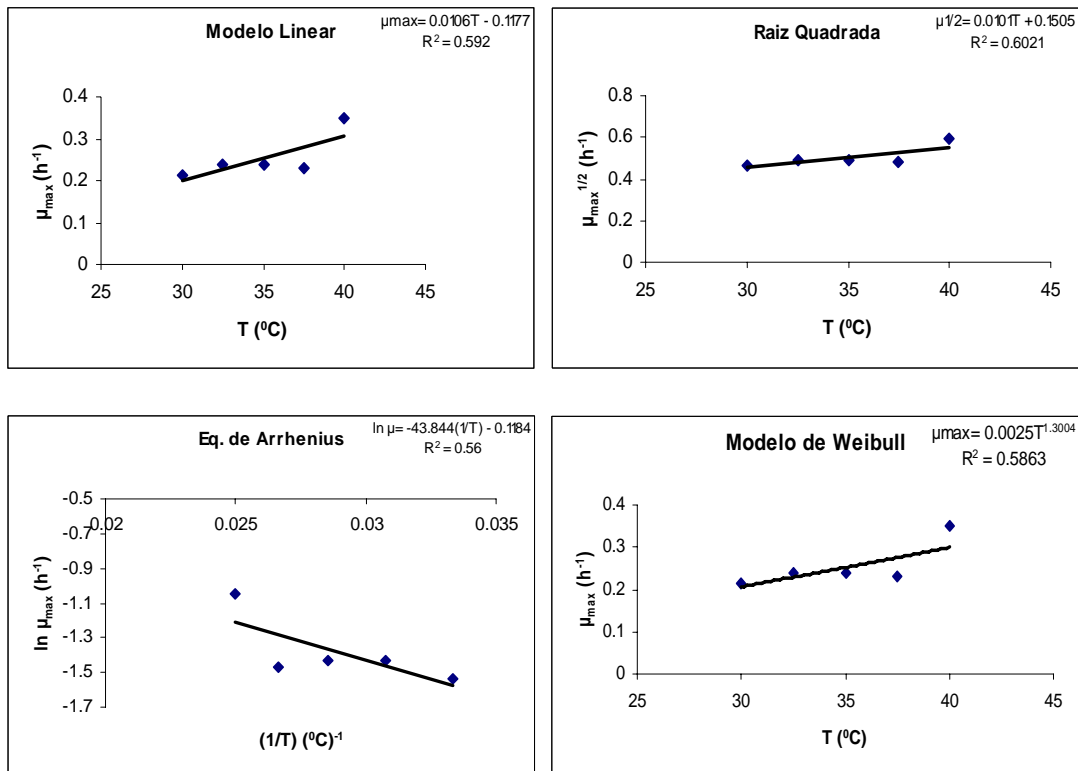


Figura 4.9 - Efeito da temperatura na velocidade específica máxima de crescimento para os modelos: Linear, Raiz Quadrada, Equação de Arrhenius e Weibull nos cultivos em glicose com cinco temperaturas de cultivo.

Como pode ser observado na Figura 4.9, o maior coeficiente de correlação foi de 0,60 para o modelo da Raiz Quadrada. Como esse coeficiente é muito baixo, não se pode escolher um modelo que descreva a variação de μ com a temperatura. Isso acontece porque o comportamento da bactéria *R. eutropha* é muito parecido nas temperaturas de 30, 32,5, 35 e 37,5°C, mostrando pouca influência da temperatura nos parâmetros de crescimento, nesta faixa de temperatura. A maior mudança ocorreu em 40°C.

Também não foi possível ajustar λ e A em função da temperatura, pois os coeficientes de regressão foram muito baixos. Os valores encontrados foram inferiores aos coeficientes de correlação para o ajuste da velocidade específica máxima de crescimento em função da temperatura.

Os resultados mostram que, na fase de crescimento, não há muita diferença de comportamento entre 32,5 e 37,5°C, o que pode ser interessante em nível industrial para a diminuição dos custos de produção.

4.4 Produção de P(3HB) utilizando como fonte de carbono resíduo amiláceo e glicose em meios com e sem suplementação de óleo de soja em diferentes temperaturas de cultivo

Há raros dados na literatura sobre o cultivo de *R. eutropha* em temperaturas diferentes de 30°C, mas devido a estudos prévios em nosso laboratório mostrou-se importante estudar esse parâmetro, pois se houver a possibilidade de operação a temperaturas mais altas em níveis industriais é interessante em virtude da economia em algumas etapas de resfriamento.

Neste estudo, a síntese de P(3HB) por *Ralstonia eutropha* utilizando como fonte de carbono o resíduo amiláceo foi estudada tendo o óleo de soja como suplemento nutricional nas diferentes temperaturas de cultivo. Estratégias de produção de P(3HB) para elevar o conteúdo de biopolímero produzido e diminuir o custo total destes plásticos são necessárias. Uma alternativa interessante é a utilização de suplementos ou indutores de produção de P(3HB). Estes agentes podem interferir na via metabólica proporcionando maior produção de células e resultando em maior produtividade, mas também podem agir diretamente na síntese de P(3HB) (MARANGONI et al., 2000; KAHAR et al., 2004).

Nessa etapa, foram realizadas culturas sem adição e com adição de óleo de soja na forma de pulsos, no momento da limitação, a fim de se obter o equivalente a 0,3 g.L⁻¹ de ácido oléico no meio. Esta concentração de ácido oléico já havia sido estudada anteriormente por Marangoni et al., (2000). A temperatura de cultivo padrão é de 30°C. Como o intuito é diminuir custos foram realizados cultivos com temperaturas superiores à padrão, a 35°C e 40°C.

A Figura 4.10 a, b e c apresenta a evolução do conteúdo de P(3HB) nas culturas sem suplementação e com suplementação de óleo nas temperaturas de 30, 35 e 40°C.

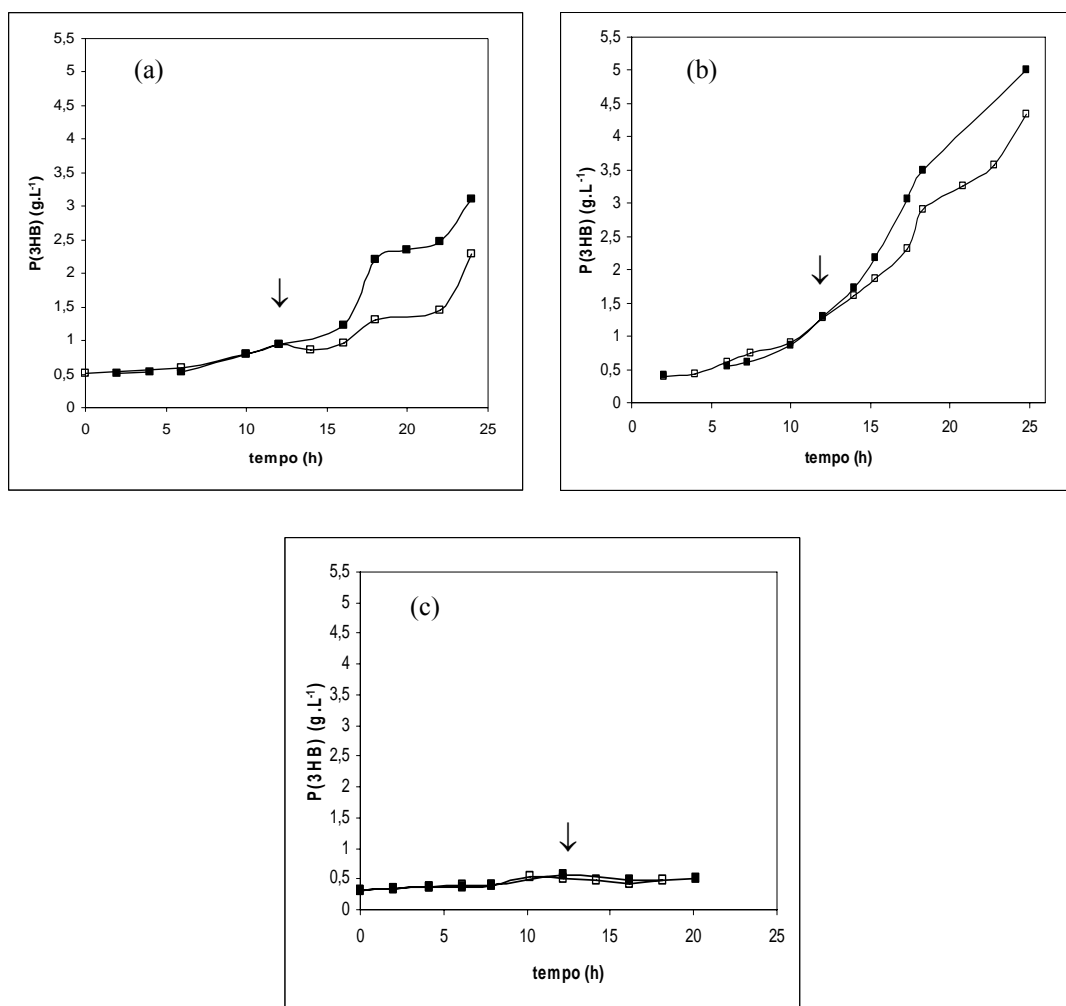


Figura 4.10 - Evolução da produção de P(3HB) em função do tempo de cultivo para a cultura com suplementação de óleo (■) e sem suplementação de óleo (□) nas temperaturas de cultivo de 30°C (a), 35°C (b) e 40°C (c). (↓) representa o momento da adição do óleo de soja.

Analisando a Figura 4.10, percebe-se que os cultivos a 30°C e 35°C após a adição de óleo de soja aumentaram a concentração de P(3HB). A Figura 4.10 (a) mostra a concentração de biopolímero obtida nos cultivos a 30°C, apresentando uma concentração final de P(3HB) de 2,3 e 3,09 g.L⁻¹ nos cultivos sem suplementação e com suplementação de óleo de soja, respectivamente. Já para o cultivo realizado a 35°C, a concentração sem suplementação foi de 4,34 g.L⁻¹ e com suplementação de 5,0 g.L⁻¹, mostrando claramente pela Figura 4.10 (b) que a maior concentração de P(3HB) obtida nos experimentos foi a 35°C, resultando em aproximadamente o dobro da concentração de P(3HB) quando comparado ao cultivo a 30°C sem suplementação de óleo e um aumento de 62% com a cultura suplementada.

O cultivo com a temperatura mais elevada, 40°C, apresentou uma concentração de biopolímero bastante baixa, com valores de 0,46 g.L⁻¹ e 0,5 g.L⁻¹ na cultura sem e com suplementação, respectivamente. No cultivo realizado com essa temperatura, a bactéria teve uma velocidade específica máxima de crescimento superior às culturas nas temperaturas inferiores como descrito no item 4.1, porém seu metabolismo pára antes da limitação do nutriente essencial para que haja a produção de P(3HB). Sendo que a concentração final de polímero obtida nesses experimentos foi praticamente a mesma do início da cultura. Provavelmente esse conteúdo de P(3HB) tenha vindo do pré-inoculo, como pode ser observado na Figura 4.10 (c). Também pode ter ocorrido uma pequena produção de biopolímero durante o cultivo, pois na fase exponencial pode ser produzido de 10% a 15% de P(3HB) (ARAGÃO, 1996).

O mesmo comportamento de baixa produção de biopolímero na temperatura de 40°C foi observado no experimento utilizando a glicose como fonte de carbono, considerada como cultivo padrão. A curva de crescimento em glicose teve o mesmo comportamento que a do resíduo amiláceo.

Com base na concentração final de P(3HB) e na massa seca final de cada cultura foi possível obter a porcentagem de biopolímero para cada experimento. Como a quantidade de P(3HB) na temperatura de 40°C foi muito pequena e o metabolismo da bactéria não se adaptou a esta temperatura, os valores não foram comparados com os outros experimentos. A porcentagem de P(3HB) obtida para o cultivo a 30°C foi de 30,0% e 36,1% para os experimentos sem e com suplementação, respectivamente. Para o cultivo a 35°C, este acúmulo foi de 35,0% sem suplementação e 43,0% com suplementação de óleo. Representando um aumento de 6,1% quando o cultivo foi suplementado com óleo de soja na temperatura de 30°C e um aumento de 8,0% na cultura a 35°C. Cabe ressaltar que, embora a diferença entre as porcentagens não seja elevada, a quantidade de P(3HB) e de células produzidas a 35°C foram bem superiores que a 30°C.

Foram realizados mais alguns cultivos com a fonte de carbono glicose para comparar os resultados com os cultivos em resíduo amiláceo, esses dados estão ilustrados na Figura 4.11.

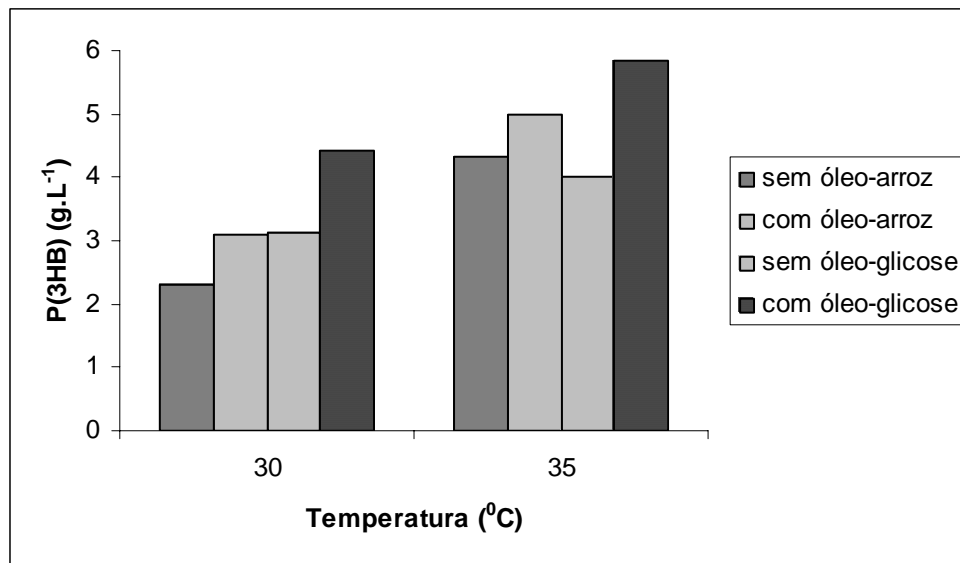


Figura 4.11 - Concentração final de P(3HB) para os cultivos realizados em resíduo amiláceo e glicose nas temperaturas de 30°C e 35°C. No cultivo realizado em glicose com suplementação a 30°C foi adicionado o dobro da quantidade de óleo em relação aos outros experimentos.

A Figura 4.11 apresenta a comparação entre os experimentos realizados em dois substratos diferentes. Os melhores resultados obtidos para produção de P(3HB) em resíduo amiláceo foram os cultivos a 35°C, esses resultados se confirmaram com os cultivos em glicose. A concentração de P(3HB) acumulado nessa temperatura nos dois substratos foi próxima, sendo que no cultivo em glicose com suplementação foi ligeiramente superior, com 0,85 g.L⁻¹ a mais.

A porcentagem de P(3HB) acumulada nos cultivos a 35°C em glicose foi de 32,0% sem suplementação e de 45,7% com suplementação de óleo de soja, representando um aumento de 13,7% no acúmulo de P(3HB) quando o cultivo foi suplementado. Nos cultivos em resíduo amiláceo, nessa temperatura, o aumento foi de 8,0% com a suplementação, demonstrando um aumento de 5,8% a mais em glicose quando o cultivo foi suplementado. Esses dados mostram que a bactéria se adaptou melhor em glicose do que no resíduo amiláceo nessas condições de cultivo, apesar da concentração final de P(3HB) ser praticamente a mesma, o conteúdo de células contendo o biopolímero foi maior, resultando em maior produção de P(3HB).

A maior concentração observada nos cultivos em glicose a 30°C foi praticamente a mesma obtida para as menores concentrações nos cultivos a 35°C, como pode ser observado na Figura 4.11. Confirmando assim que os cultivos na temperatura de 35°C acumulam maior quantidade de P(3HB) do que na menor temperatura testada.

O cultivo em glicose a 30°C sem suplementação apresentou aproximadamente 1,0 g.L⁻¹ a mais que o cultivo realizado em resíduo amiláceo, mostrando que o resíduo amiláceo é um bom substrato para cultivo de *R. eutropha*. Como a suplementação de óleo no cultivo em glicose foi com uma concentração diferente que no outro substrato, não foi realizada a comparação entre os dois. O que se pode dizer é que a porcentagem de P(3HB) acumulada em glicose a 30°C foi de 32,7% e 44,4% sem e com suplementação, respectivamente, resultando em um aumento de 11,7% quando houve a suplementação com o dobro de óleo de soja, valor este dentro do apresentado na literatura (SQUIO, 2003) apesar da suplementação ter sido com a quantidade de óleo duas vezes maior.

A Tabela 4.14 apresenta um resumo dos dados gerais obtidos nas diferentes culturas, para uma melhor comparação desses dados. Apresentando a biomassa total obtida em cada cultivo, a concentração de P(3HB) em cada cultura e conseqüentemente a porcentagem de biopolímero acumulado em cada condição de estudo.

Tabela 4.14 - Dados gerais obtidos nas culturas.

Culturas	Tempo (h) ^a	Xt (g) ^b	P(3HB) (g.L ⁻¹)	% P(3HB) ^c
Resíduo s/o-30°C	24,0	7,69	2,30	30,0
Resíduo c/o-30°C	24,0	7,80	3,09	39,0
Resíduo s/o-35°C	26,8	12,40	4,34	35,0
Resíduo c/o-35°C	26,8	11,64	5,00	43,0
Glicose s/o-30°C	20,0	9,58	3,13	32,7
Glicose c/o-30°C	20,0	9,98	4,43	44,4
Glicose s/o-35°C	20,5	12,50	4,00	32,0
Glicose c/o-35°C	20,5	12,80	5,85	45,7

^a tempo total de cultura; ^b biomassa total; ^c conteúdo de P(3HB) no Xt.

Os dados apresentados na Tabela 4.14 mostram um resumo dos resultados obtidos nesse estudo para a produção de P(3HB). Como já citado anteriormente, os cultivos suplementados com óleo de soja apresentaram maior produção de biopolímero. A concentração de P(3HB) foi maior a 35°C, porém o acúmulo de biopolímero foi muito próximo nas duas temperaturas, nos cultivos com e sem suplementação de óleo de soja.

Squio (2003) demonstrou que o uso de ácidos linoléico e oléico como suplemento nutricional em culturas de *R. eutropha* utilizando como fonte de carbono glicose + frutose aumenta a produção de polímero em até 11%, indicando que esses ácidos são bons suplementos nutricionais na produção de P(3HB-co-3HV). Também foram realizados cultivos com óleo de canola e oliva como suplementos nutricionais e esses demonstraram um aumento na produção de polímero. Marangoni et al., (2000) obtiveram um aumento de 15% no conteúdo de polímero acumulado quando *R. eutropha* cresceu em açúcar invertido e ácido propiônico suplementando com ácido oléico (0,3 g.L⁻¹).

Rodrigues (2005) estudou a produção de P(3HB) a partir de resíduos de indústrias amiláceas, com suplementação do meio de cultura com ácido oléico e óleo de soja. A adição de ácido oléico ao meio de cultivo causou um aumento de 4,5% no conteúdo de polímero nas células e a suplementação com óleo de soja levou à produção de mais de 10% de polímero em relação à cultura sem suplementação. O valor obtido nesse estudo utilizando como fonte de carbono o resíduo amiláceo, suplementado com óleo de soja, na temperatura de 30°C foi inferior aos obtidos pelos autores citados anteriormente, onde obtiveram aproximadamente 10% de aumento na produção de biopolímero.

São raros os estudos sobre produção de P(3HB) por *R. eutropha* a temperaturas diferentes de 30°C. Marangoni (2000) não observou diferenças significativas nos ensaios em que se aplicaram as temperaturas de 30°C e 34°C. Schneider (2005) observou que nos cultivos realizados em erlen, utilizando como fonte de carbono glicose/frutose sem suplementação de óleo de soja a concentração de polímero a 37°C foi 25% maior que ao acúmulo a 30°C. Também concluiu que a adição de óleo de soja permitiu um incremento na concentração de P(3HB) de 18% e 42% para as temperaturas de 30°C e 37°C, respectivamente. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que o aumento da temperatura de 30°C para 35°C dobra a concentração de polímero obtido.

A suplementação com óleo de soja elevou o conteúdo de P(3HB), tanto no meio padrão, quanto no meio simulando resíduo industrial, mostrando dessa maneira a importância desse estudo, já que o substrato representa 40% do custo de produção de biopolímeros (CHOI e LEE, 1999a). Neste estudo, além de se usar um substrato de baixo custo se fez a suplementação com óleo de soja, sendo este um dos óleos vegetais de menor custo.

4.5 Desenvolvimento de um método de extração de P(3HB) de células de *R. eutropha*

A técnica utilizada no laboratório ENGEBIO (EQA) para a extração intracelular de P(3HB) é baseada em Hahn et al., (1994). Primeiramente, as células são separadas do caldo fermentativo por floculação, seguida de centrifugação. A extração era efetuada através das seguintes etapas:

- 8 g de células eram ressuspensas em uma dispersão de 100 mL de clorofórmio e 100 mL de uma solução de hipoclorito de sódio 30% (esta solução pura contém 5,68 g de cloro ativo, 7,8 g de NaOH e 32 g de Na₂CO₃ por 100 mL);
- a mistura era mantida a 30°C por 90 minutos;
- centrifugação a 3900 rpm por 25 minutos;

Ao final obtinha-se três fases distintas: fase superior: solução de hipoclorito; fase intermediária: células e outros materiais que não o polímero; e fase inferior: clorofórmio com P(3HB). Na seqüência, a parte superior era removida e a parte inferior era separada por filtração. O P(3HB) era obtido através de precipitação com não-solvente na razão 1:1 (clorofórmio:não-solvente). O não-solvente utilizado era uma mistura de metanol e água (7:3 v/v). Após evaporação obtinha-se o polímero.

No intuito de diminuir a quantidade de solventes, tornar o processo mais simples, menos poluente e sem geração de resíduos líquidos, se fez necessária a pesquisa por uma técnica que pudesse suprir essas necessidades. Dessa maneira, foi desenvolvida uma nova técnica de extração de biopolímeros de células de *Ralstonia eutropha*.

4.5.1 Método de extração - testes preliminares

O método foi baseado em Vanin et al., (2004) para preparação das blendas P(3HB)/PLLA (poli L-ácido láctico), onde as blendas eram preparadas empregando-se a técnica de solubilização seguida de evaporação do solvente. Foi realizada a adaptação do mesmo para a extração de P(3HB) a partir de células de *Ralstonia eutropha* cultivadas em vários substratos, conforme o método descrito a seguir:

Os polímeros foram solubilizados em hexafluorisopropanol (HFIP), em frasco fechado sob agitação magnética, obtendo-se uma solução polimérica a 7% (m/v). Após a solubilização dos polímeros no solvente, a solução foi vertida numa placa de vidro e colocada em uma cuba de vidro totalmente fechada para a lenta evaporação do solvente, por 48 horas. O filme obtido era seco em estufa a 60°C por 8 horas.

O HFIP é um solvente orgânico agressivo e bastante utilizado para a preparação de blendas poliméricas, porém ele é um solvente de alto custo, por isso, optou-se por outro solvente orgânico, o clorofórmio, pelo fato do P(3HB) ser solúvel no mesmo e ser um dos solventes mais utilizados para a extração de biopolímeros. Passou-se então, a utilizar este solvente para a extração. Baseando-se no método descrito acima, foi possível extrair o biopolímero das células cultivadas em glicose/frutose, como mostra a Figura 4.12.



Figura 4.12 - Filme de P(3HB) extraído do cultivo em glicose/frutose a partir do método baseado em preparação de blendas poliméricas.

Com o resultado positivo para extração de P(3HB) a partir de células de *R. eutropha*, foram realizadas variações em algumas condições do método para a extração. Foram feitos testes com diferentes massas de células contendo P(3HB), tempos de extração e modos de evaporação do solvente para a formação do filme. Para isso, foram fixadas algumas condições, como: temperatura utilizada para a extração de 60°C, não podendo ser superior a esse valor, pois o ponto de ebulição do solvente é de aproximadamente 61,3°C e fixou-se a velocidade da agitação magnética.

Os primeiros testes realizados foram em relação à quantidade de células utilizadas para a extração, mantendo o volume de clorofórmio constante. Foram feitas extrações com 7, 6, 5, 4, 3 e 2g de células contendo o P(3HB). Como os testes foram realizados em cultivos em erlenmeyer, o conteúdo de P(3HB) produzido foi em torno de 45%, com isso cada massa de célula testada correspondia a ao conteúdo interno de P(3HB) de 45%. Como resultados foram obtidos filmes de todas as massas consideradas nesses primeiros testes.

Sabendo-se que utilizando pequena quantidade de célula foi possível a formação dos filmes, foram testados então o tempo necessário para que houvesse a extração do polímero. Partiu-se do princípio de 3 horas de extração, com diminuição desse tempo a cada 30 minutos até 1 hora de extração. Foram obtidos filmes com todos os tempos testados.

Um fator que se mostrou importante para as características finais do filme foi o modo de evaporação do solvente. Foram testados três diferentes modos de evaporação, onde a solução contendo P(3HB) e o solvente era vertida em: placa de Petri fechada deixada na bancada, placa de Petri aberta que era colocada em uma cuba de vidro fechada e placa de Petri aberta à temperatura ambiente deixada na bancada. Com base nas características visuais, optou-se pelo modo de evaporação mais lento, que foi a evaporação em placa fechada, pois na placa aberta à temperatura ambiente a evaporação foi muito rápida, deixando o filme com uma característica rugosa, apresentando encolhimento. Na placa colocada na cuba de vidro, o filme também ficou com uma característica um pouco rugosa, sendo que o filme evaporado na placa fechada ficou mais liso.

Os testes preliminares para a extração foram realizados em diversas condições de cultivo, utilizando como fonte de carbono a glicose/frutose, resíduo amiláceo e somente glicose, sendo que nos cultivos em resíduo amiláceo pode haver interferência dos resíduos quando comparados com os cultivos em meio padrão. Também foram realizadas culturas suplementadas com óleo de soja e com adição de antiespumante, onde o antiespumante e quantidades elevadas de óleo de soja mostraram interferências no processo da extração.

Como os testes preliminares foram realizados em diferentes condições, se fez necessária a padronização do método em um meio padrão. Para isso foi realizada uma cultura em batelada em biorreator, com glicose como substrato. Depois da extração, foram determinadas as porcentagens de recuperação e de pureza do método e analisadas as caracterizações dos filmes pelas análises: DSC, TGA e GPC, resultados que serão apresentados a seguir.

4.5.2 Cultura em biorreator para a extração das células contendo P(3HB)

A cultura em biorreator, para obtenção de massa celular com P(3HB) para os testes de extração, foi realizada utilizando-se como fonte de carbono a glicose. Foram realizadas as análises estatísticas para comparação dos modelos primários aplicados à curva de crescimento *R. eutropha* em biorreator e os dados estão apresentados no Anexo II - Tabela A.3. O modelo de Gompertz Modificado foi o que apresentou os melhores resultados para a descrição do crescimento de *R. eutropha* no cultivo em biorreator.

A Figura 4.13 apresenta o ajuste do modelo GM aos dados experimentais do crescimento de *R. eutropha* cultivada em glicose em biorreator.

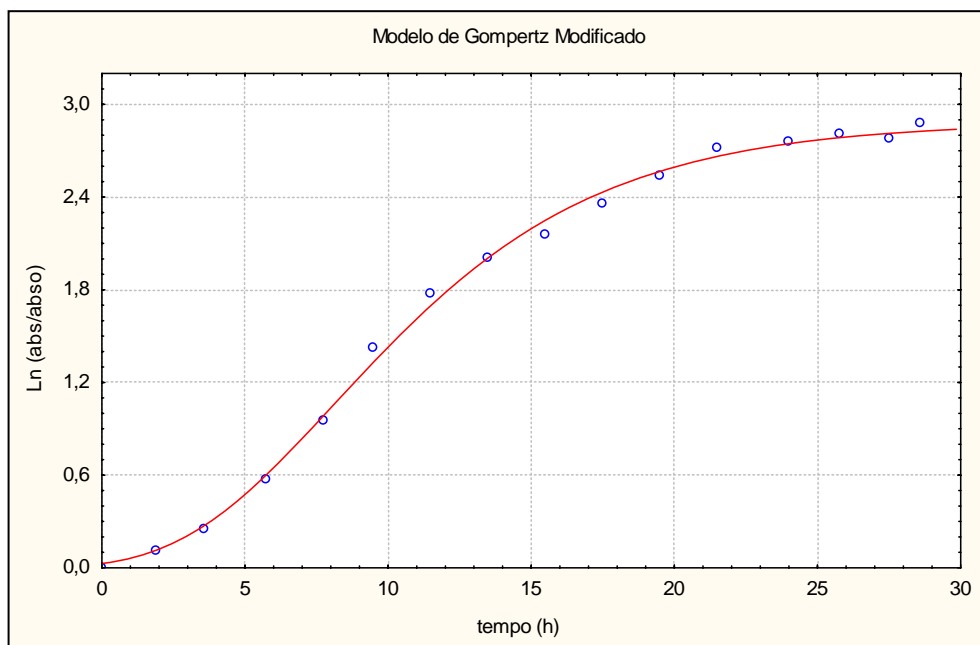


Figura 4.13 - Ajuste do modelo de Gompertz Modificado à curva de crescimento de *R. eutropha* em glicose, expressa em Ln (Abs/Abs₀) pelo tempo em biorreator.

A Tabela 4.15 apresenta os parâmetros μ_{\max} , λ , e A obtidos a partir da curva ajustada pelo modelo de Gompertz Modificado da Figura 4.13.

Tabela 4.15 - Parâmetros obtidos pelo modelo de Gompertz Modificado para o cultivo em biorreator, utilizando glicose como fonte de carbono.

Parâmetros do Modelo de Gompertz Modificado	
μ_{\max}^a (h^{-1})	0,20
λ^b (h)	2,9
A^c	2,84

^a μ_{\max} : velocidade específica máxima de crescimento; ^b λ : duração da fase lag;

^c A: aumento logarítmico da população.

O conteúdo final de P(3HB) acumulado foi de 75%. A partir deste material, foram realizadas as extrações variando-se o tempo de extração e mantendo-se fixo todos os outros parâmetros.

4.5.3 Padronização do novo método de extração

Ao término do cultivo, as células foram separadas por centrifugação. O precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e congelado para posterior extração do polímero. A Figura 4.14 apresenta o esquema do novo método de extração de P(3HB) onde foi variado o tempo necessário para se obter o filme de P(3HB). Os resultados foram comparados pela porcentagem de recuperação, porcentagem de pureza, e caracterização dos filmes obtidos.

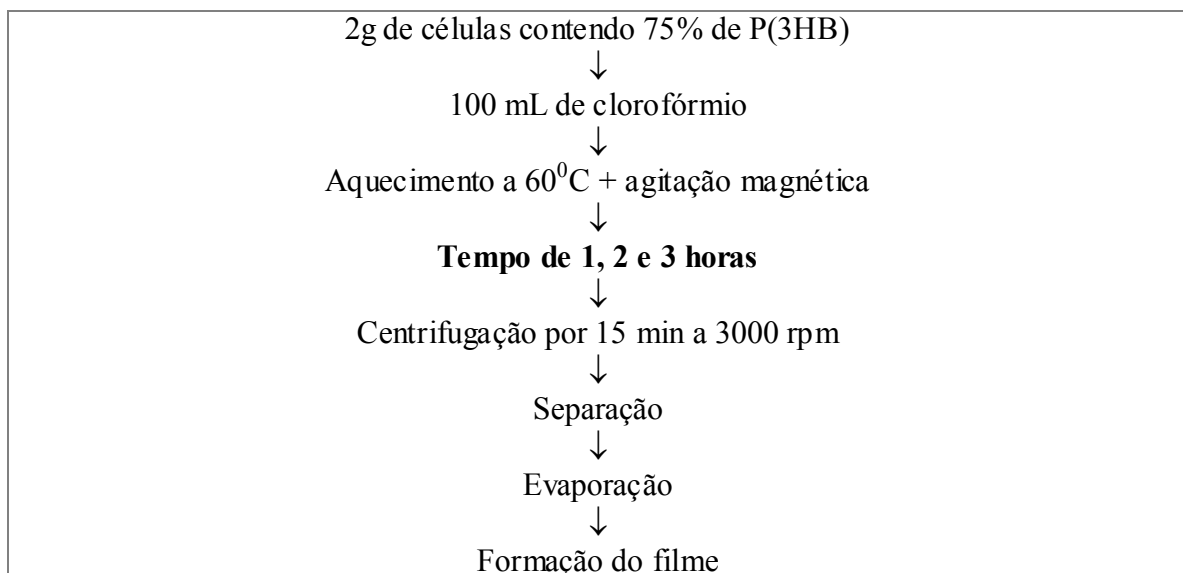


Figura 4.14 - Esquema do novo método de extração de P(3HB) variando o tempo de extração.

A Figura 4.15 a, b e c apresenta os filmes obtidos a partir do novo método de extração esquematizado na Figura 4.14 com obtenção dos filmes em 1 hora, 2 horas e 3 horas de extração.

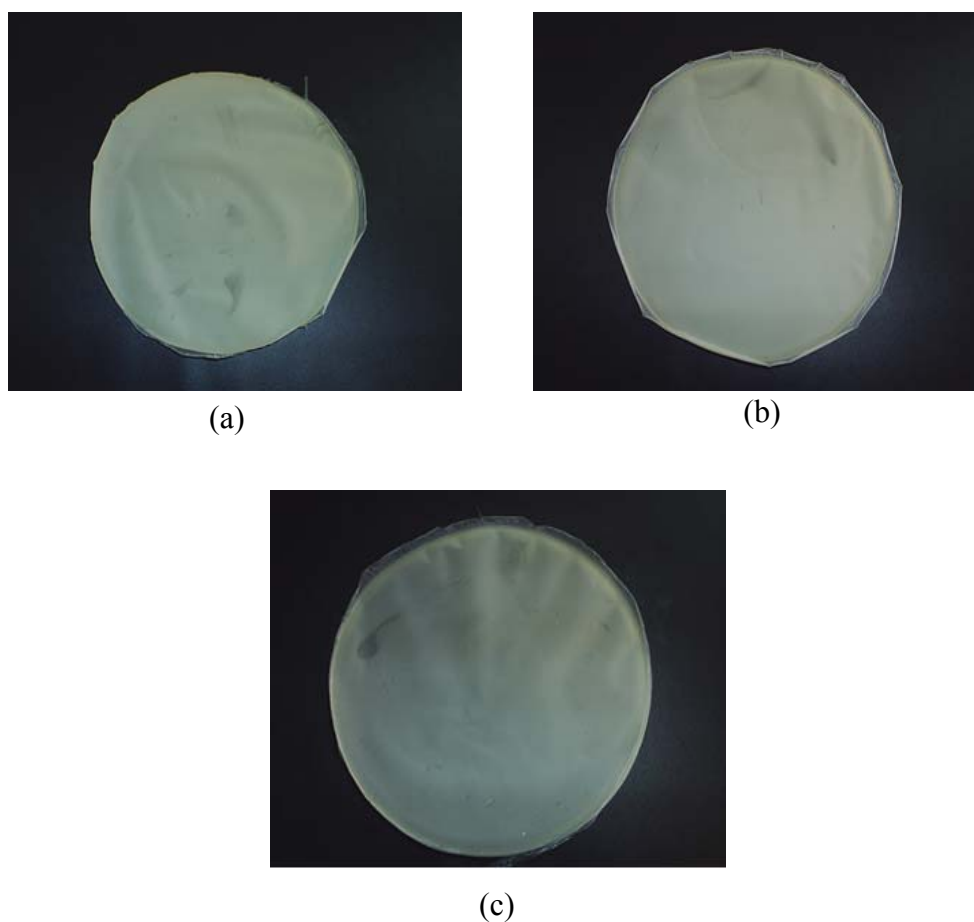


Figura 4.15 - Filmes de P(3HB) extraídos a partir do novo método de extração em 1 hora (a), 2 horas (b) e 3 horas de extração (c).

Após a obtenção dos filmes nos três tempos testados, como pode ser visualizado na Figura 4.15, foi possível determinar as porcentagens de pureza e conseqüentemente as porcentagens de recuperação dos filmes de P(3HB), como mostra a Tabela 4.16.

Tabela 4.16 - Porcentagens de pureza e porcentagens de recuperação dos filmes de P(3HB) obtidos a partir do novo método de extração.

Amostras de P(3HB)	% de pureza	% de recuperação
1h de extração	94	86
2h de extração	98	94
3h de extração	95	84

A partir da análise cromatográfica, foi possível obter a porcentagem de pureza (equação 3.2- material e métodos) dos filmes obtidos nos três tempos de extração, onde o P(3HB) extraído por 2 horas foi o que apresentou a maior porcentagem de pureza (98%). Para os outros tempos, essa porcentagem foi aproximadamente a mesma (94% e 95%), como pode ser observado na Tabela 4.16. Sabendo-se a pureza de cada filme, foi possível determinar a porcentagem de recuperação (equação 3.3- material e métodos) pela massa de filme obtida após a extração, onde o tempo de extração de 2 horas foi o que obteve a maior recuperação, com 94% de P(3HB) recuperado, sendo que os outros experimentos recuperaram aproximadamente 10% a menos que o filme obtido por 2 horas. Analisando-se os filmes pelas porcentagens de pureza e porcentagens de recuperação, pode-se dizer que o filme extraído por 2 horas obteve as melhores respostas.

Pelo processo de extração utilizado rotineiramente em nosso laboratório, baseado em Hahn et al., (1994), como descrito no item 4.5, os autores obtiveram 91% de recuperação de polímero com 97% de pureza. Choi e Lee, (1999a) desenvolveram um método simples de digestão alcalina para recuperar P(3HB) a partir de *E. coli* recombinante, onde o P(3HB) foi recuperado com uma pureza de 98,5%. Chen et al., (1999) desenvolveram um processo que envolve o uso de solução aquosa de surfactante-quelante e obtiveram uma pureza de 98,7% com uma porcentagem de recuperação de 93,3%. Com diferentes modos de extração de P(3HB), os autores citados encontraram valores próximos, onde os resultados obtidos nesse estudo também se encontram dentro da mesma faixa, sendo que o novo processo de extração utilizou apenas um solvente, sem geração de resíduos líquidos.

A análise de TGA, além de determinar a temperatura de decomposição dos filmes, também é importante para caracterizar o grau de pureza de um polímero, porque rastreia possíveis impurezas que surgem durante o processo de extração de P(3HB) do interior das células e até mesmo no processo de cultivo da bactéria (CAMARGO, 2003). A Tabela 4.17 apresenta a porcentagem de perda de massa obtida para cada condição de filme testada, onde os dados obtidos foram comparados com os resultados da cromatografia gasosa. O gráfico correspondente a essa perda de massa está apresentado no item 4.5.4.2- Figura 4.16.

Tabela 4.17 - Porcentagem de perda de massa obtida pela análise de TGA para os filmes obtidos pelo novo método de extração.

Amostras de P(3HB)	% de perda de massa
1h de extração	97
2h de extração	97
3h de extração	93

A porcentagem de perda de massa observada na Tabela 4.17 representa a degradação total do filme de P(3HB), sendo que a parte não degradada é referente às impurezas. Os dados obtidos de porcentagem de pureza por cromatografia apresentados na Tabela 4.16 apresentam uma variação média de 2% das respostas obtidas pela análise de TGA, confirmando dessa maneira os resultados obtidos.

As impurezas são responsáveis por muitas propriedades finais dos produtos acabados, entre as quais destacam-se: coloração ou grau de transparência, odor e brilho (CAMARGO, 2003). Os filmes obtidos pelo novo método de extração apresentam poucas impurezas, sendo que o filme extraído por 3 horas apresentou a maior porcentagem.

4.5.4 Caracterização dos filmes obtidos pelo novo método de extração de P(3HB)

Os filmes obtidos pelo novo método de extração foram caracterizados por calorimetria diferencial de varredura (DSC), análise termogravimétrica (TGA) e cromatografia em permeação em gel (GPC). As características do filme do P(3HB) fornecido pela PHB Industrial foram utilizadas para comparação com os filmes obtidos nos diferentes tempos de extração.

4.5.4.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As determinações realizadas pelo método de calorimetria diferencial de varredura foram: temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e porcentagem de cristalinidade (χ_c). Os resultados da análise térmica por DSC dos filmes nos diferentes tempos de extração e do filme da PHB Industrial encontram-se na Tabela 4.18. Dois exemplos de curvas de DSC estão no anexo I – Figura A.13.

Tabela 4.18 - Dados da T_g , T_m e χ_c obtidos pelo DSC para os filmes de P(3HB) nos diferentes tempos de extração, juntamente com o filme da PHB Industrial.

Amostras	T_g (°C)	T_m (°C)	χ_c^1 (%)	χ_c^2 (%)
1 h de extração	3,96	175,0	59,4	58,6
2 h de extração	0,83	176,3	55,5	54,3
3 h de extração	4,56	175,8	60,1	57,8
PHB Industrial	3,16	176,3	60,2	60,2

¹determinação de % de cristalinidade no primeiro aquecimento; ²determinação de % de cristalinidade no segundo aquecimento.

Observando a Tabela 4.18, percebe-se que a temperatura de fusão do filme padrão (PHB Industrial) e do filme obtido no tempo de extração de 2 horas foram as mesmas. Os métodos utilizando 1 e 3 horas de extração também apresentaram valores muito próximos, com aproximadamente um grau a menos quando comparado com a extração realizada no tempo de 2 horas. Todos os valores obtidos para as temperaturas de fusão estão dentro do intervalo encontrado na literatura que é de 174°C – 180°C (ANDERSON e DAWES, 1990; GOMEZ e BUENO NETO, 1997).

As temperaturas de transição vítrea, encontradas nos diferentes tempos de extração, estão de acordo com os dados pesquisados na literatura, que se encontram entre -5°C a 5°C para o P(3HB) (ANDERSON e DAWES, 1990). Segundo Lucas et al., (2001) quando mais baixa for a temperatura de transição vítrea, mais flexível é o material em análise, com isso pode-se dizer que o filme extraído em 2 horas é o mais flexível, em relação à extração nos outros tempos.

Os graus de cristalinidade foram calculados a partir dos valores de entalpia de fusão e entalpia de cristalização, considerando que a entalpia de fusão para o PHB 100% cristalino é de $\Delta H_m^0 = 142 \text{ J.g}^{-1}$ (TSUJI e IKADA, 1996). O grau de cristalinidade foi avaliado de duas formas pela análise de DSC. No primeiro aquecimento foi avaliada a determinação da cristalinidade real da amostra, ou seja, mostra realmente como se encontra a amostra depois dos diferentes tempos de extração. Para o segundo aquecimento, o grau de cristalinidade é determinado a partir de um tratamento térmico em que todas as amostras se encontram nas mesmas condições.

Observando os dois modos de determinação do grau de cristalinidade, na Tabela 4.18, pode-se dizer que há pouca diferença nas determinações da cristalinidade pelas duas varreduras de temperatura e que a % de cristalinidade do filme obtido após a extração é semelhante ao observado depois que a amostra sofreu tratamento térmico, sendo que a cristalinidade χ_c^2 é ligeiramente inferior a χ_c^1 . A cristalinidade também foi determinada no segundo aquecimento quando as amostras foram resfriadas no próprio equipamento, os valores obtidos para a cristalinidade com 1, 2, 3 horas de extração e do filme da PHB Industrial foram de 57, 57,8, 56,5 e 59,5%, respectivamente. Os valores foram próximos aos obtidos pelas outras duas análises.

O P(3HB) é definido como um material rígido e quebradiço, o que limita suas aplicações, pois apresenta um grau de cristalinidade na faixa de 60% a 80 % (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005a). Analisando a Tabela 4.18, percebe-se que o polímero da PHB Industrial foi o que apresentou maior cristalinidade, estando esse valor no menor grau de cristalinidade apresentado na literatura, que é normalmente próximo a 60%. O filme extraído em 2 horas apresentou a menor cristalinidade, sendo esta uma característica muito importante, pois dos três tempos testados para extração, o tempo de 2 horas apresenta o P(3HB) com maior flexibilidade.

Uma forma muito estudada para diminuir os níveis de cristalinidade é a incorporação de unidades de 3HV ao P(3HB), pois isto acarreta uma diminuição da rigidez assim como um aumento da resistência ao impacto, onde o P(3HB-co-3HV) apresenta um grau de cristalinidade variando de 50-70% (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005a). Segundo Agus et al., (2006), a incorporação de unidades de HV diminuiu a cristalinidade do polímero. Os autores obtiveram 57,8% de cristalinidade no P(3HB-co-22%3HV), comparado com 62,1% de cristalinidade para o P(3HB). Esse resultado demonstra que o HV diminui a cristalinidade, resultando assim em maior aplicabilidade quando comparado com o P(3HB). O filme obtido com 2 horas de extração apresentou um grau de cristalinidade menor que o copolímero, mostrando dessa forma, que o P(3HB) apresenta uma boa cristalinidade e aplicabilidade.

4.5.4.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

Pela análise de TGA pode-se determinar a temperatura de início de degradação térmica, temperatura máxima de degradação e a porcentagem de perda de massa de cada filme P(3HB) obtido das células de *R. eutropha*. A análise termogravimétrica das amostras de filmes obtidos pelo novo método de extração, juntamente com a amostra da PHB Industrial, fornece as curvas termogravimétricas mostradas na Figura 4.16.

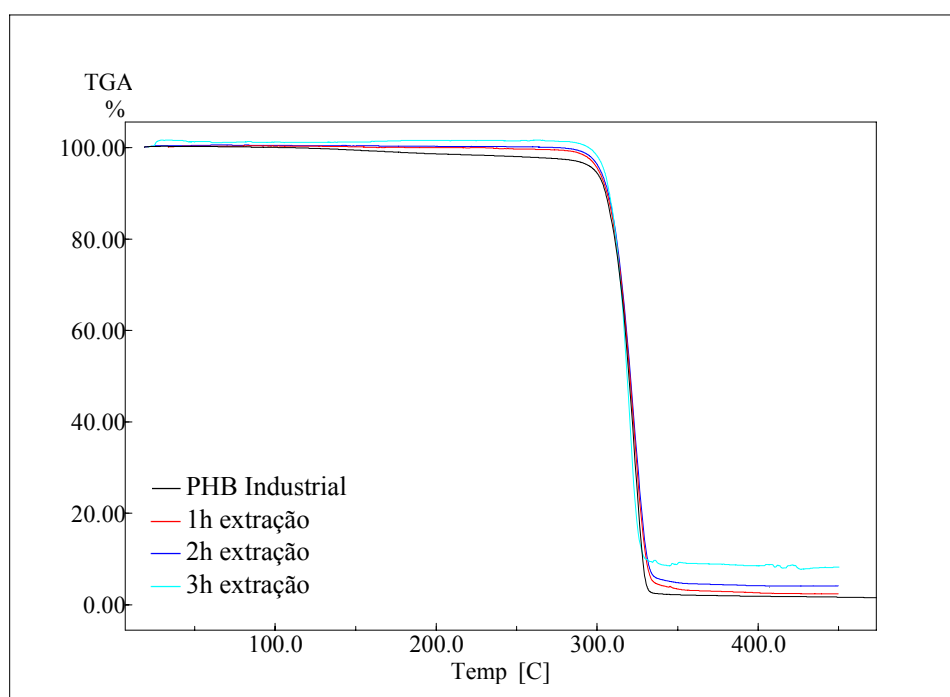


Figura 4.16 - Curvas de TGA dos filmes de P(3HB) extraídos pelo novo método, em diferentes tempos de extração, juntamente com o filme da PHB Industrial.

Observando a Figura 4.16, percebe-se que a degradação térmica do P(3HB) ocorre em um único processo de perda de massa envolvendo apenas um passo de degradação. A Tabela 4.19 apresenta os valores das temperaturas de início de degradação (T_i), temperaturas máximas de degradação (T_{pico}) e % de perda de massa, obtidas a partir das curvas da Figura 4.16.

Tabela 4.19 - Temperatura de início de degradação (T_i), temperatura máxima de degradação (T_{pico}) e porcentagem de perda de massa para os diferentes filmes de P(3HB) obtidos a partir da TGA.

Amostras	T_i (°C)	T_{pico} (°C)	% perda de massa
1 h de extração	308	323	97
2 h de extração	308	323	97
3 h de extração	306	318	93
PHB Industrial	306	324	98

Observando-se a Tabela 4.19, nota-se que as temperaturas máximas de degradação para os filmes obtidos com 1h e 2h de extração apresentaram os mesmos valores, de 323°C, valor este muito próximo ao obtido para o polímero da PHB Industrial. Apesar da temperatura de início de degradação ser a mesma para a extração de 3h e para o filme da PHB Industrial, a decomposição do filme de 3 h foi mais rápida, esse comportamento pode ser melhor visualizado na Figura 4.16.

O método de extração utilizado neste trabalho foi adaptado do método de Vanin et al., (2004) que estudaram a degradação de blendas de poli (β - hidroxibutirato)/poli(L-ácido láctico) na forma de filmes. O resultado encontrado por estes autores para a temperatura de decomposição, quando o P(3HB) foi estudado isoladamente, foi de 278°C com perda de massa total. Marangoni (2000) caracterizou o copolímero P(3HB-co-3HV) produzido por *R. eutropha* e o valor encontrado para a temperatura de degradação foi de 313,12°C.

Os valores obtidos nesse estudo, para qualquer tempo de extração, apresentaram maior estabilidade térmica que os autores citados anteriormente. É interessante ressaltar que essa alta temperatura de decomposição encontrada para os filmes de P(3HB) é um fator muito atrativo comercialmente, uma vez que esta característica favorece a sua aplicação nos processos de transformação.

Utilizando o polímero da PHB Industrial obteve-se 98% de perda de massa, sendo 2% a massa não degradada pela análise, logo o filme da PHB Industrial contém 2% de impurezas. Os filmes obtidos das células de *R. eutropha* obtiveram alto grau de pureza em todos os tempos de extração, e esses dados foram discutidos anteriormente no item 4.5.3.

4.5.4.3 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

Foi realizada a análise de cromatografia de permeação em gel para a determinação da massa molar de cada filme de P(3HB) obtido pelo novo método de extração. A Figura 4.17 ilustra os cromatogramas obtidos pela análise de GPC para quantificação da massa molar.

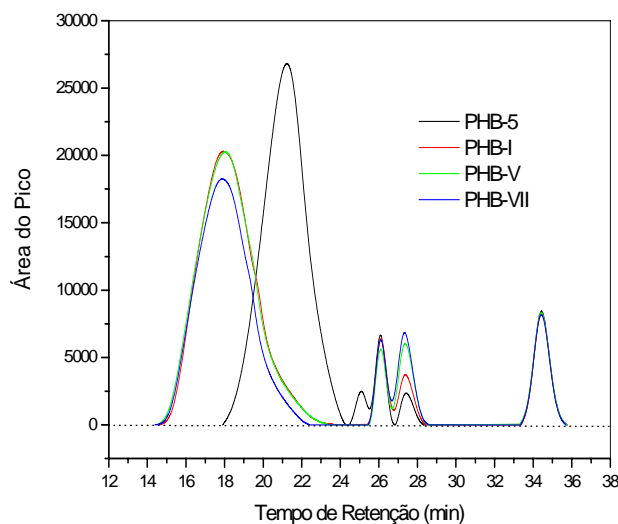


Figura 4.17 - Cromatogramas obtidos para análise de massa molar, área do pico *versus* tempo de retenção em min, para as amostras: PHB-5: amostra da PHB Industrial; PHB-I: 3 horas de extração; PHB-V: 1 hora de extração; PHB-VII: 2 horas de extração.

Observando a Figura 4.17, nota-se que a área do pico e o tempo de retenção para as três amostras de P(3HB) estão muito próximos, diferentemente para o PHB Industrial. A partir dos dados dessa figura, foram calculados os valores de massa molar média e da polidispersidade dos filmes de P(3HB) e estes valores estão na Tabela 4.20.

Tabela 4.20 - Dados de massa molecular (M_n) e de polidispersidade, para os diferentes filmes de P(3HB), obtidos pelo novo método de extração, juntamente com o da PHB industrial.

Amostras	M_n (Da)	Polidispersidade
1 h de extração	$2,3 \cdot 10^6$	1,43
2 h de extração	$2,4 \cdot 10^6$	1,38
3 h de extração	$2,1 \cdot 10^6$	1,41
PHB Industrial	$2,1 \cdot 10^5$	1,41

A massa molar dos polímeros varia normalmente de $1 \cdot 10^4$ a $3 \cdot 10^6$ Da (LEE, 1996a; KHANNA e SRIVASTAVA, 2005b). Observando a Tabela 4.20, pode-se perceber que os valores de massa molar estão de acordo com os da literatura. Nota-se claramente que o valor do filme da PHB Industrial é 10 vezes menor que os obtidos para os filmes de P(3HB) extraídos das células de *R. eutropha*, apresentando uma alta massa molar.

A massa molar de P(3HB) pode diminuir significativamente devido à degradação durante o processo de extração, especialmente quando a digestão química é empregada (RAMSAY et al., 1990). Chen et al., (1999) desenvolveram um novo método para a extração de P(3HB) de *Alcaligenes eutrophus*. Este processo envolve o uso de solução aquosa de surfactante-quelante, onde a massa molar após a extração foi de $3,2 \cdot 10^5$ Da, sendo a massa molar original de $4,0 \cdot 10^5$ Da.

O tratamento brando com hidróxido de amônia para extrair P(3HB) de *A. vinelandii* levou a um polímero com uma alta massa molar da ordem de $1,7 \cdot 10^6$ a $2,0 \cdot 10^6$ Da, e baixa polidispersividade. A empresa ZENECA considera uma massa molar de aproximadamente $6 \cdot 10^5$ Da é aceitável para aplicações de seu termoplástico BIOPOL® (LUZIER, 1992). Chen et al., (1999) utilizaram *A. vinelandii* para produzir P(3HB) com uma massa molar da ordem de $4 \cdot 10^6$ Da, sendo muito provavelmente o maior valor reportado na literatura até o momento.

Os valores encontrados de massa molar para os filmes de P(3HB) obtidos pelo novo método de extração são maiores que $2 \cdot 10^6$ Da, podendo-se definir como um biopolímero de alta massa molar. Não foi realizado um estudo antes da extração, mas pelo alto valor obtido pelo novo método, possivelmente o P(3HB) não seja degradado durante a extração, sendo uma característica muito importante, pois quanto mais brando for o método de extração menos perdas serão obtidas durante a mesma.

Os polímeros são substâncias compostas por uma mistura de moléculas com diferentes massas molares. A polidispersidade dos polímeros é oriunda das variações estatísticas presentes nos processos de polimerização. Com isso, o índice de polidispersidade é definido como sendo a razão entre a massa molar média e a massa molar ponderada, quanto maior for esse índice, mais ampla será a distribuição de tamanhos de cadeia (NOGUEIRA et al., 2002). Segundo Khanna e Srivastava (2005a), o P(3HB) se apresenta com uma faixa de massa molar relativa de $1 \cdot 10^4$ a $3 \cdot 10^6$ Da com uma polidispersidade por volta de 2. Observando a polidispersidade da Tabela 4.20, os valores se encontram em torno de 1,4, podendo-se dizer dessa maneira, que os biopolímeros apresentam moléculas com tamanhos muito próximos.

A Tabela 4.21 apresenta um resumo de todas as análises realizadas para a caracterização dos filmes de P(3HB) obtidos nos diferentes de extração.

Tabela 4.21 - Dados gerais da caracterização dos filmes de P(3HB) obtidos pelo novo método de extração.

Análises	Tempo de extração para obtenção do filme de P(3HB)		
	1 hora	2 horas	3 horas
Pureza (%)	94	98	95
Recuperação (%)	86	94	84
T _g (°C)	3,96	0,83	4,56
T _m (°C)	175,0	176,3	175,8
χ _c ¹ (%)	59,4	55,5	60,1
T _i (°C)	308	308	306
T _{pico} (°C)	323	323	318
Massa molar (Da)	2,3. 10 ⁶	2,4. 10 ⁶	2,1. 10 ⁶

A Tabela 4.21 compara todos os valores encontrados para a caracterização dos filmes de P(3HB) extraídos nos diferentes tempos. Como todas as análises já foram discutidas, cabe dizer que o novo método de extração apresenta características muito importantes, pois é um método que apresenta uma alta porcentagem de pureza e de recuperação, um filme com características térmicas muito boas e alta massa molar. Em relação ao tempo de extração, o filme obtido em 2 horas apresentou em geral, as melhores características, sendo este o tempo que será usado pelo novo método.

4.6 Caracterização dos filmes de P(3HB) obtidos a partir dos cultivos utilizando resíduo amiláceo como fonte de carbono

Os filmes de P(3HB) foram extraídos pelo novo método de extração desenvolvido neste trabalho, e caracterizados conforme as análises a seguir.

4.6.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Os resultados da análise térmica por DSC dos filmes obtidos, utilizando como fonte de carbono resíduo amiláceo, sem e com suplementação de óleo de soja nas temperaturas de cultivo de 30°C e 35°C, juntamente com o filme da PHB Industrial, estão apresentados na Tabela 4.22.

Tabela 4.22 - Dados da T_g , T_m e χ_c obtidos pelo DSC para os filmes de P(3HB) obtidos dos cultivos utilizando resíduo amiláceo como fonte de carbono, juntamente com filme da PHB Industrial.

Amostras	T_g (°C)	T_m (°C)	χ_c^1 (%)	χ_c^2 (%)
30°C sem óleo	5,66	176,8	53,3	54,9
30°C com óleo	8,85	176,2	35,0	33,0
35°C sem óleo	1,65	168,0	55,8	57,2
35°C com óleo	3,35	178,4	41,0	43,9
PHB industrial	3,16	176,3	60,2	60,2

Observando a Tabela 4.22, nota-se que a temperatura de fusão do polímero da PHB Industrial e dos filmes obtidos nos cultivos a 30°C, sem e com suplementação, foram praticamente as mesmas. Para o cultivo a 35°C com suplementação, a temperatura de fusão foi 13°C superior ao cultivo sem suplementação. Na verdade, o cultivo a 35°C sem suplementação foi o único que apresentou a T_m inferior aos valores da literatura, onde todas as outras temperaturas encontram-se dentro do intervalo literário que é de 174°C a 180°C (ANDERSON e DAWES, 1990); GOMEZ e BUENO NETO, 1997).

As temperaturas de transição vítrea, encontradas nos cultivos a 35°C apresentam valores mais baixos, quando comparados aos cultivos a 30°C, que apresentaram valores de T_g um pouco superiores aos encontrados na literatura, que variam de -5 a 5°C para o P(3HB) (ANDERSON e DAWES, 1990). O valor da T_g para a amostra da PHB Industrial foi próximo ao cultivo a 35°C, suplementado com óleo de soja.

O grau de cristalinidade foi avaliado de três formas pela análise de DSC, como foi anteriormente explicado no item 4.5.4.1. Os graus de cristalinidade encontrados para os filmes de P(3HB) obtidos do cultivo em glicose, apresentaram valores um pouco superiores aos cultivos em que foi utilizado resíduo amiláceo como fonte de carbono, sem a suplementação de óleo de soja. A diferença de cristalinidade obtida entre as duas análises foi em torno de 2%.

Para os cultivos em resíduo amiláceo em que houve a suplementação de óleo de soja, as porcentagens de cristalinidade foram inferiores em relação aos cultivos sem suplementação. No cultivo realizado a 30°C suplementado com óleo de soja, a cristalinidade diminuiu aproximadamente 20%. Quando o cultivo foi realizado a 35°C com suplementação, a cristalinidade diminuiu em 14%. Isso indica que a suplementação de óleo de soja ajuda a diminuir o grau de cristalinidade do P(3HB), supostamente pela formação de uma nova estrutura polimérica mais flexível quando o óleo é adicionado ao meio de cultivo. Não se tem reportado na literatura graus de cristalinidade tão baixos para P(3HB), e também para filmes que foram obtidos de culturas suplementadas com óleo de soja. Essa característica é muito importante para a aplicação do biopolímero, pois se obteve um filme mais flexível e podendo dessa maneira, ser aplicado em diversas áreas. Essa característica deve ser pesquisada mais detalhadamente, pelo fato de não existir parâmetros literários para a comparação desses dados.

4.6.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica das amostras de filmes obtidos nas diferentes temperaturas de cultivo, com e sem suplementação de óleo de soja, juntamente com a amostra da PHB Industrial, fornece as curvas mostradas na Figura 4.18. A Tabela 4.23 ilustra os dados obtidos pela TGA para os filmes de P(3HB), representando as temperaturas de início de decomposição 1 e 2, temperaturas máximas de decomposição 1 e 2 e a porcentagem de perda de massa 1 e 2.

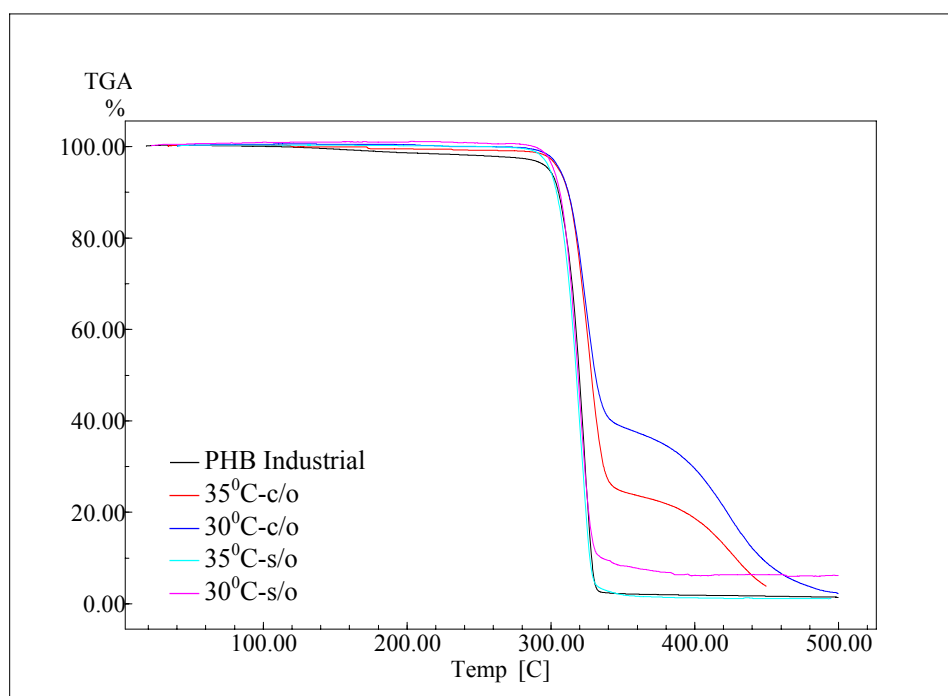


Figura 4.18 - Curvas de TGA dos os filmes de P(3HB) extraídos pelo novo método, nos cultivos em resíduo amiláceo nas temperaturas de 30°C e 35°C, com suplementação de óleo (c/o) e sem suplementação (s/o), e do filme da PHB Industrial.

Tabela 4.23 - Dados da temperatura inicial de decomposição (T_i), temperatura máxima de decomposição (T_{pico}) e % de perda de massa, obtidos pela análise de TGA para os filmes obtidos em resíduo amiláceo.

Amostras	T_{i1} (°C)	T_{pico1} (°C)	% p. massa ₁	T_{i2} (°C)	T_{pico2} (°C)	% p. massa ₂
30°C sem óleo	306	320	95	-	-	-
30°C com óleo	309	324	62	385	423	36
35°C sem óleo	305	321	98	-	-	-
35°C com óleo	310	326	76	392	427	20
PHB industrial	306	324	98	-	-	-

¹ representa o primeiro estágio de decomposição; ² representa o segundo estágio de decomposição.

Analisando-se os resultados apresentados na Figura 4.18 e da Tabela 4.23, verifica-se que os filmes obtidos dos cultivos em que não houve suplementação com óleo de soja apresentaram apenas um estágio de perda de massa. Para os filmes obtidos dos cultivos com suplementação de óleo de soja, ocorreram dois estágios de degradação, onde o primeiro se dá a decomposição do P(3HB), pois a temperatura de decomposição obtida para as outras amostras é aproximadamente no mesmo ponto, já o segundo estágio de degradação provavelmente seja de uma nova estrutura polimérica formada com a adição de óleo de soja à cultura, pois, nos cultivos sem suplementação, o processo de degradação ocorre em apenas um estágio.

Os valores de temperatura inicial de degradação e temperatura máxima de degradação, para os filmes obtidos nos cultivos em glicose, foram bastante próximos aos encontrados para os filmes de P(3HB), obtidos de cultivos utilizando o resíduo amiláceo como fonte de carbono. As culturas em que foi utilizado o óleo se apresentaram um pouco mais estáveis ao início da degradação.

As perdas de massa obtidas variaram de 95% a 98%, sendo que nos cultivos utilizando a glicose, como padrão, variou 94% a 98%, mostrando assim, que os filmes obtidos apresentam um percentual de impurezas bastante baixo, tanto no cultivo padrão, quanto nos cultivos utilizando resíduo amiláceo como fonte de carbono.

4.6.3 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A Tabela 4.24 apresenta a massa molar e a polidispersidade dos filmes obtidos nos diferentes cultivos em resíduo amiláceo e do polímero da PHB Industrial. A Figura A.14- Anexo I ilustra os picos obtidos pela análise de GPC para quantificação da massa molar.

Tabela 4.24 - Dados de massa molar (Mn) e de polidispersidade obtidos para os diferentes filmes obtidos em resíduo amiláceo, juntamente com PHB industrial.

Amostras	Mn (Da)	Polidispersidade
30°C sem óleo	2,0. 10 ⁶	1,41
30°C com óleo	2,1. 10 ⁶	1,42
35°C sem óleo	2,0. 10 ⁶	1,41
35°C com óleo	2,4. 10 ⁶	1,39
PHB Industrial	2,1. 10 ⁵	1,41

Como já discutido na caracterização dos filmes de P(3HB) extraídos pelo novo método, a partir de culturas utilizando glicose como fonte de carbono, também para os filmes de P(3HB) extraídos de culturas utilizando o resíduo amiláceo, as massas molares apresentaram valores dentro da faixa encontrada na literatura, que varia de $1 \cdot 10^4$ a $3 \cdot 10^6$ Da (LEE, 1996; KHANNA e SRIVASTAVA, 2005b).

Os valores encontrados de massa molar para os filmes de P(3HB) obtidos nas culturas sem suplementação são de $2 \cdot 10^6$ Da e para os cultivos suplementados a massa molar elevou um pouco. A polidispersidade foi próxima da ideal, mostrando que o filme obtido apresenta moléculas ordenadas. Como citado nas duas outras análises de caracterização, também pela análise de GPC pode-se observar pela figura citada em anexo, que no tempo de retenção de 25 min aparecem picos que não foram caracterizados como P(3HB) e também não são picos residuais da própria análise, esse dado vem a confirmar que possivelmente haja uma nova estrutura polimérica formada pela adição do óleo de soja no momento do cultivo.

Os filmes de P(3HB) obtidos de cultivos em resíduo amiláceo também apresentaram alta massa molar, sendo os valores muito próximos para o P(3HB) extraído do cultivo em glicose, esses dados só vêm a confirmar que o novo método de extração não degrada o biopolímero. Essa característica é muito importante, pois quanto mais brando for o método de extração, menos perdas serão obtidas durante a mesma.

CAPÍTULO V

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Este trabalho teve como objetivo geral: melhorar as condições de cultivo de *Ralstonia eutropha* para aumentar a produção de polihidroxialcanoatos, utilizando substrato de baixo custo, como resíduo da indústria de alimentos, estudar a utilização de suplementos nutricionais nos cultivos, estudar a influência da temperatura nestas culturas e desenvolver um método de extração simples e eficiente, seguido de caracterização dos filmes formados.

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- O modelo de Gompertz Modificado foi o que apresentou os melhores ajustes para descrever os parâmetros de crescimento: velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}), tempo de fase lag (λ) e aumento logarítmico da população (A) de *Ralstonia eutropha* em todas as condições de estudo testadas.
- Com o modelo de Gompertz Modificado foi possível prever o momento da limitação da cultura para os cultivos a 30°C e 35°C em glicose. A partir do momento em que a bactéria atinge seu μ_{\max} , a fase de produção de biopolímero inicia-se após 5,04 ($\pm 0,27$) horas.
- A partir do modelo da Raiz Quadrada, foi possível modelar o efeito da temperatura sobre o parâmetro λ , no meio utilizando resíduo amiláceo como substrato, suplementado com óleo de soja. Os outros parâmetros de crescimento (μ e A) não foram possíveis de modelar, nos dois substratos testados. Mesmo realizando mais cultivos em diferentes temperaturas, não foi possível determinar um modelo secundário que descrevesse a influência da temperatura sobre estes parâmetros. Isso aconteceu porque o comportamento da bactéria *R. eutropha* é muito parecido no intervalo de temperatura de 30°C a 37,5°C.
- *Ralstonia eutropha* cresce muito bem em resíduo amiláceo. O crescimento nas temperaturas de 30°C e 35°C são parecidos, mas cabe ressaltar que as quantidades de P(3HB) e de células produzidas a 35°C foram bem superiores que a 30°C. Para os cultivos a 40°C, o metabolismo pára antes da limitação do nutriente essencial para que haja a produção de P(3HB).

- A suplementação com óleo de soja elevou o conteúdo de P(3HB), tanto no meio padrão, quanto no meio simulando resíduo industrial. Nos cultivos em glicose, o aumento do conteúdo de P(3HB) acumulado com suplementação a 30 e 35°C foi de 11,7 e 13,7%, respectivamente. Para os cultivos em resíduo amiláceo esse aumento foi de 6,1 e 8,0% nos cultivos a 30 e 35°C, respectivamente. Demonstrando também que o maior acúmulo de P(3HB) ocorre na temperatura de 35°C.
- Foi possível desenvolver um método de extração de P(3HB) simples, onde se utilizou os processos de agitação e aquecimento e apenas um solvente, clorofórmio, sem geração de resíduos líquidos, resultando em um processo menos poluente, extraíndo o P(3HB) de uma forma eficiente, obtendo um polímero com alta qualidade. As características dos filmes foram superiores aos obtidos dos filmes da PHB Industrial.
- Em relação ao tempo de extração, o filme obtido em 2 horas apresentou em geral, as melhores características, sendo este o tempo que será usado pelo novo método. O melhor tempo apresentou um filme com maior % de pureza e de recuperação, com menor cristalinidade, boa estabilidade térmica e com uma alta massa molecular.
- Os filmes de P(3HB) obtidos utilizando resíduo amiláceo como substrato, apresentaram as características próximas aos filmes extraídos dos cultivos em glicose. Já os filmes obtidos dos cultivos em resíduo amiláceo onde houve suplementação com óleo de soja, apresentaram características distintas, com menor cristalinidade, degradação em dois estágios, demonstrando que o óleo de soja interfere nas características dos filmes.

Com base nos resultados apresentados é possível fazer algumas sugestões de estudo:

- Estudar detalhadamente o intervalo de temperatura de 30-37,5°C, em cultivos em biorreator;
- Testar o resíduo de alguma indústria amilácea, visto que com o meio sintético obteve-se bons resultados;
- Estudar a utilização de resíduo amiláceo como substrato para a produção de P(3HB-co-3HV);
- Estudar a influência de diferentes concentrações de óleo de soja sobre a produção do polímero;
- Estudar o crescimento da bactéria utilizando óleo vegetal como fonte de carbono principal;

-
- Realizar a caracterização de filmes obtidos em diferentes cultivos, especialmente utilizando óleo de soja, para confirmação da influência deste suplemento nas características dos filmes;
 - Estudar a biodegradabilidade dos filmes obtidos pelo novo método de extração de P(3HB).

REFERÊNCIAS DA LITERATURA

AGUS, J., KAHAR, P., ABE, H. DOI, Y., TSUGE, T. Molecular weight characterization of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] synthesized by genetically engineered strains of *Escherichia coli*. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, p. 1138-1146, 2006.

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. **Microbiological reviews**, v. 54, n. 4, p. 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.**, v. 53, p. 453-460, 2000.

ARAGÃO, G. M. F. **Production de polyhydroxyalcanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre des cultures.** These (Doctorat spécialité: Biologie et génétique Moléculaires et Cellulaires – Biotechnologie) – L'Institut National des Sciences appliquées de Toulouse, Toulouse. 1996.

ASENJO, J. A.; SCHMIDT, A. S.; ANDERSON, P. R.; ANDREWS, B. A.; Effect of single nutrient limitation on Poly- β -hydroxybutyrate molecular weight distribution in *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnol. And Bioeng.**, v. 46, p. 497-502, 1995.

BARANYI, J. e ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, Abstract, 1994.

BATY, B.; MULLER, M. L. D. Estimating the bacterial lag time: which model, which precision? **International Journal of Food Microbiology**, v.91, p.261-277, 2004.

BEAULIEU, M.; GOULET, J.; BEAULIEU, Y.; MÉLINARD, J.; PANDIAN, S. Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate. **Applied and Environmental Microbiology**, vv. 61, p. 165-169, 1995.

BEROVIC, M.; OSTROVERSNIK, H. Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 47-53, 1997.

BOHMERT, K.; BALBO, I.; STEINBÜCHEL, A.; TISCHENDORF, G.; WILLMITZER, L.. Constitutive Expression of the β -Ketothiolase Gene in Transgenic Plants. A Major Obstacle for Obtaining Polyhydroxybutyrate-Producing Plants. **Plant Physiol.** 128:1282-1290. 2002

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1977-1982, 1988.

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

BRAUNEGG, 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.**, v. 6, p. 29-37, 1978.

BUCHANAN, R. L.; WHITING, R. C.; DAMERT, W. C. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. **Food Microbiology**, v. 14, p. 313-326, 1997.

BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **TIBTECH**, v. 5, p. 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.** São Paulo, 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Química). Universidade Estadual de Campinas.

CAYRÉ, M. E.; VIGNOLO, G.; GARRO, O. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsion stored at three temperatures. **Food Microbiology**, v. 20, 561-566, 2003.

CHEN, G. Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, Article in press, 2005.

CHEN, H.; HOOVER, G. D. Pressure inactivation kinetics of *Yersinia enterocolitica* ATCC 35669. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, p. 161-171, 2003.

CHEN, Y.; CHEN, J.; YU, C.; DU, G.; LUN, S. Recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Alcaligenes eutrophus* by surfactant–chelate aqueous system. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 153–157, 1999.

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

CHOI, J.; LEE, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. **Applied Microbiol Biotechnol**, v. 51, p. 13-21, 1999b.

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

COUTINHO, B. C.; MIRANDA, G. B.; SAMPAIO, G. R.; SOUZA, L. B. S.; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M. A importância e as vantagens do polihidroxibutirato (plástico biodegradável). **Holos**, Ano 20, 2004.

DALGAARD, P.; KOUTSOUMANIS, K. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. **Journal of Microbiological Methods**, v. 43, p. 183-196, 2001.

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

DOI, Y.; KAWAGUCHI, Y.; KIM, J. H.; LEBEAULT, J. M. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiol. Reviews**, v. 103, p. 103-108, 1992.

DOI, Y.; SEGAWA, A.; KAWAGUCHI, Y.; KUNIOKA, M. Cyclic nature of poly(3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 67, p. 165-170, 1990.

DU, G. C.; CHEN, J.; YU, J.; LUN, S. Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p. 59-65, 2001.

DUARTE, M. A. T.; HUGEN, R. G.; MARTINS, E. S.; JÚLIO, C. F.; PEZZIN, A. P. T.; PEZZIN, S. H. Estudo do processamento em PHB e de blendas PHB/PCL por injeção em molde. **XVI Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais**, 2004.

ERKMEN, O. Mathematical modeling of *Escherichia coli* inactivation under high-pressure carbon dioxide. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, p. 39-43, 2001.

ERKMEN, O. Predictive modelling of *Listeria monocytogenes* inactivation under high pressure carbon dioxide. **LWT - Food Science and Technology**, v. 33, p. 514-519, 2000.

ERKMEN, O; ALBEN, E. Mathematical modeling of citric acid production and biomass formation by *Aspergillus niger* in undersized semolina. **Journal of Food Engineering**, v. 52, p. 161-166, 2002.

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

FERREIRA, L. D. **Utilização da microbiologia preditiva na avaliação do crescimento de bactérias ácido láticas em presunto fatiado**. Florianópolis, 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina.

FU, B.; LABUZA, T. P. Shelf-life prediction: theory and application. **Food Control**, v. 4, p. 125-133, 1993.

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

GALEGO, N., ROZSA, C., SÁNCHEZ, R., FUNG, J., VÁSQUEZ, A., TOMÁS, J.S. Characterization and application of poly(β -hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. **Polymer Testing**, v. 19, p. 485-492, 2000.

GOMEZ, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 17, p. 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 P(3HB-*co*-3HV) by soil isolated bacteria able to use sucrose. **Rev Microbiol**, v. 28, pg 43-48, 1997.

GUAN, D.; CHEN, H.; TING, E.Y.; HOOVER, G.D. Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 under isothermal-endpoint pressure conditions. **Journal of Food Engineering**, article in press, 2005.

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. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 256-261, 1994.

HÄNGGI, U. J. Requirements on bacterial polyesters as future substitute for conventional plastics for consumer goods. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, p. 213-220, 1995.

HAYWOOD, G. W.; ANDERSON, A. J.; CHU, L.; DAWES, E. A. The role of NADH- and NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 52, p. 259-264, 1988.

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

INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS- IPT. **Produção de plásticos biodegradáveis a partir de cana-de-açúcar por via biotecnológica**. Relatório n^o 31478/93, v. 2, p. 103, 1993.

KAHAR, P.; TSUGE, T.; TAGUCHI, K.; DOI, Y. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. **Polymer Degradation and Stability**, v. 83, p. 79-86, 2004.

KAPRITCHKOFF, F. M.; VIOTTI, A. P.; ALLI, R. C. P.; ZUCCOLO, M.; PRADELLA, J. G. C.; MAIORANO, A. E.; MIRANDA, E. A.; BONOMI, A. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. **Journal of Biotechnology**, article in press, 2005.

KESSLER, B.; WEUSTHUIS, R.; WITHOLT, B.; EGGINK, G. Production of microbial polyesters: Fermentation and Downstream processes. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 71, p. 159-182, 2001.

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. K. (a). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 607-619, 2005.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. (b). Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2173-2182, 2005.

KIM, B. S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 27, p. 774-777, 2000.

KIM, B. S.; CHAN, H. N. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from starch by *Azotobacter chroococcum*. **Biotechnology Letters**, v. 20 (2), p. 109–112, 1998.

KIM, M.; CHO, K.; RYU, H. W.; LEE, E.; CHANG, Y. K. Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulfate. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 55–59, 2003.

KIM, B. S.; LEE, S. C; LEE, S.Y.; CHANG, H. N.; CHANG, Y.K.; WOO S. I. Production of polyhydroxybutyrate by fed batch with glucose concentration control in *Ralstonia eutropha*. **Biotechnol Bioeng**, v. 43, p. 892–8, 1994.

KOYAMA, N.; DOI, Y. Continuous production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 281-284, 1995.

LABUZA, T.P. e FU, B. Growth kinetics for shelf-life prediction: teory and practice. **Journal of Industrial Microbiology**, 12, 309-323, 1993.

LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 1-14, 1996a.

LEE, S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Tibtech**, v. 14, p. 431-438, 1996b.

LEE, S. Y.; CHOI, J. Production of microbial polyester by fermentation of recombinant microorganisms. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 71, p. 183-207, 2001.

LEE, S. Y.; CHOI, J.; WONG, H. H. Recent advances in poluhydroxybutyrate production by bacterial fermentation: mini-review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 31-36, 1999.

LEE, S. Y.; KIM, M. K.; CHANG, H. N.; PARK, Y. H. Regulation of poly-beta-hydroxytbutyrate biosynthesis by nicotinamide nucleotide in *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 131, p. 35-39, 1995.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de Polímeros**. Editora: e-papers, Rio de Janeiro, 2001.

LUND, B.; NORDDAHL, B.; AHRING, B. Production of lactic acid from whey using hydrolysed whey protein as nitrogen source. **Biotech Lett.** v. 14, p. 851-856, 1992.

LUZIER, W. D. Materials derived from biomass biodegradable materials. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 89, p. 839-842, 1992.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 63, n. 1, p. 21-53, 1999.

MARANGONI, C. **Estudo de estratégias de produção de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha* utilizando substratos de baixo custo e ácido propiônico.** Florianópolis 2000. 191p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina.

MARANGONI, C.; FURIGO JR., A.; ARAGÃO, G. M. F. Oleic acid improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Ralstonia eutropha* in inverted sugar and propionic acid. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1635-1638, 2000.

METABOLIX, Inc. Apresenta informações sobre a companhia, seus produtos e pesquisas. Disponível em: <<http://www.metabolix.com>>. Acesso em: 25 de outubro de 2004.

MILLER, G. L. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

NOGUEIRA, A. L, MACHADO, R. A. F., SCHLISTING, R.. **Polímeros e Reações de Polimerização.** Laboratório de Controle de Processos-Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

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

OEDING, V.; SCHLEGEL, H. G. β -ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism. **Biochem. J.**, v. 134, p. 239-248, 1973.

OMAR, S.; RAYES, A.; EQAAB, A.; VISS, I.; STEINBUECHEL, A. Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. **Biotechnol Lett**, v. 23, p. 1119-1123, 2001.

ORTEGA FILHO, S. **O potencial da agroindústria canavieira do Brasil.** Relatório PHB Industrial S/A e Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP), 2003.

PARK, S. J.; CHOI, J.; LEE, S. Y. Engineering of *Escherichia coli* fatty acid metabolism for the production of polyhydroxyalkanoates. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 36, p. 579-588, 2005.

PELEG, M.; COLE, M. B. Reinterpretation of microbial survival curves. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** v. 38, p. 353-380, 1998.

PIEMOLINI, L. T. **Modelagem estrutural da PHA sintase de *Chromobacterium violaceum* para estudos de mutação sítio-dirigida**. Florianópolis, 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Universidade Federal de Santa Catarina.

RAMSAY, B.A. Physiological factor affecting PHA production. Physiology, kinetics, production and use of biopolymers (Proceedings) p. 9-17, Austria, 1994.

RAMSAY, J.A.; BERGER, E.; VOYER, R.; CHAVARIE, C.; RAMSAY, B. A.Extraction of poli- β -hydroxybutyrate using chlorinated solvents. **Biotechnol. Tech**, v. 8, p. 589-594, 1994.

RATKOWSKY, D.A.; OLLEY, J.; McMEEKIN, T.A., BALL, A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **J. Bacteriol.** v. 149, p.1-5, 1982.

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

RODRIGUES, R. C. **Condições de cultura para a produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* a partir de resíduos de indústrias de alimentos**. Florianópolis, 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina.

ROOS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **J. Appl. Bacteriol.** v. 81, p. 501-508, 1996.

ROSSEL, C. E. V.; MANTELATTO, P. E.; BUENO NETTO, C. L.; RIBEIRO, A. M. M.; MATSUBARA, R. M. S. **Processo de extração de biopolímeros**. Patente PI 9302312, IPT-COPERSUCAR, 2002.

RUSENDI, D.; SHEPPARD, J. D. Hydrolysis of potato processing waste for the production of poly-b-hydroxybutyrate. **Bioresource Technology**, v. 54, p. 191-196, 1995.

SARIKAYA, E.; HIGASA, T.; ADACHI, M.; MIKAMI, B. Comparison of degradation abilities of a- and b-amylases on raw starch granules. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 711-715, 2000.

SAVENKOVA, L.; GERBERGA, Z.; BIBERS, I.; KALNIN, M. Effect of 3-hydroxy valerate content on some physical and mechanical properties of polyhydroxyalkanoates produced by *Azotobacter chroococcum*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 445-450, 2000.

SCHAFFNER, D. W.; LABUZA, T. P. Predictive Microbiology: Where are we, and where are we going? **Food Technology**, v. 51, n.4, 1997.

SCHNEIDER, A. L. S. **Síntese, caracterização e biodegradação de poli-3-hidroxitirato obtido por *Ralstonia eutropha***. Florianópolis, 2005. Exame de Qualificação para o Doutorado (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina.

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.

SOTERO, A. P. Plásticos biodegradáveis trazem melhoria ambiental. **Jornal de Plásticos**, 1017/1018. 2000.

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

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

SQUIO, C. R. e ARAGÃO, G. M. F. Estratégias de cultivo para a produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxitirato) e poli(3-hidroxitirato-co-3-hidroxi valerato) por bactérias. **Quim. Nova**, Vol. 27, No. 4, 615-622, 2004.

STEINBÜCHEL, A.; polyhydroxybutyrate acid. In: BYROM, D. **Biomaterials: novel materials from biological source**. V. New York. Stockton, p. 132-213, 1991.

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

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

STEINBÜCHEL, A.; LEE, S. Y., JENDROSSEK, D., SCHIRMER, A. e CHOI, C.Y. Biosynthesis of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acid from 1-3 butanodiol or from 3-hydroxybutyrate by *Pseudomonas sp* A33. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 42, p. 901-909, 1995.

STREIT, F. **Estudo do aproveitamento do bagaço de maçã para produção de quitosana fúngica**. Florianópolis, 2004. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina.

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

SUTHERLAND, J. P.; BAYLISS, A. J. Predictive modelling of *Yersinia enterocolitica*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. **International Journal Food Microbiology**, v. 21, p. 197-215, 1995.

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

THAKOR, N.; LÜTKE-EVERSLOH, T.; STEINBÜCHEL. Application of the BPEC pathway for biotechnological production of poly(3-mercaptopropionate) by recombinant *Escherichia coli* at large scale including a novel *in situ* isolation method. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71 (2), p. 835-841, 2005.

TIM, A.; STEINBÜCHEL, A. Formation of polyester consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent *Pseudomonas*. **Applied and Environ. Microbiol.**, v. 56, n. 11, p. 3360-3367, 1990.

TOBAJAS, M. e GARCIA, C. E. Comparison of analysis methods for determination of kinetic parameters in batch culture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 845-851, 2000.

TSUJI, H, IKADAA Y. Blends of aliphatic polyesters. 1. Physical properties and morphologies of solution-cast blends from poly(DL-lactide) and poly(ϵ -caprolactone). **Journal of Applied Polymer Science**. 1996, 60(13): 2367-2375

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

VANSAMME, P., COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. <<http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/query.fcgi=pubmed&cmd>> Acesso em: novembro de 2005.

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 2004.

ZWIETITTING, M.H.; KOOS, J.T.; HASENACK, B.E.; WIT, J.C. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, p. 1094-1101, 1991.

WACHENHEIM, D. E.; PATTERSON, J. A.; LADISCH, M. R. Analysis of the logistic function model: derivation and applications specific to batch cultured microorganisms. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 157-164, 2003.

WONG, H. H.; LEE, S. Y. Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 50, p. 30-33, 1998.

YOO, Y.J.; CHUNG, Y.J.; CHA, H. J.; YEO, J. S. Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric) acid using propionic acid by pH regulation. **J. Ferment. And Bioeng.** v. 83, p. 492-495, 1997.

YU, J. Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 105-112, 2001.

ANEXOS

Anexo I

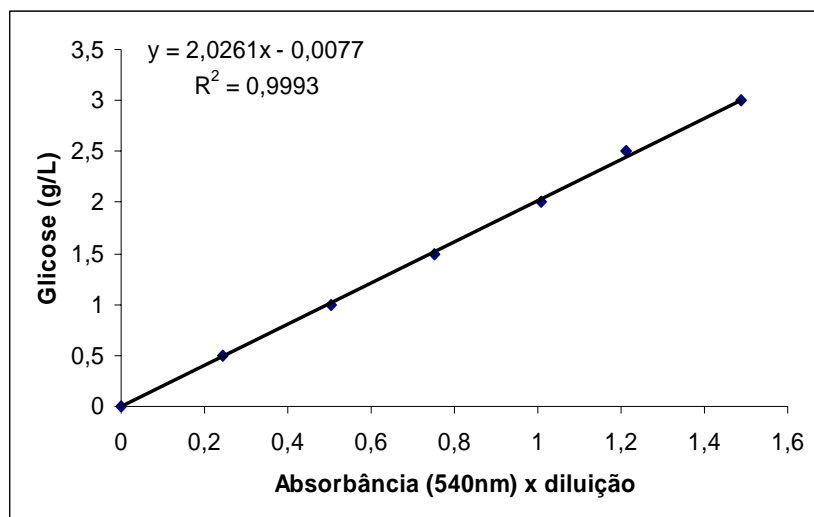


Figura A.1: Curva de calibração para a determinação da concentração de açúcares redutores pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS).

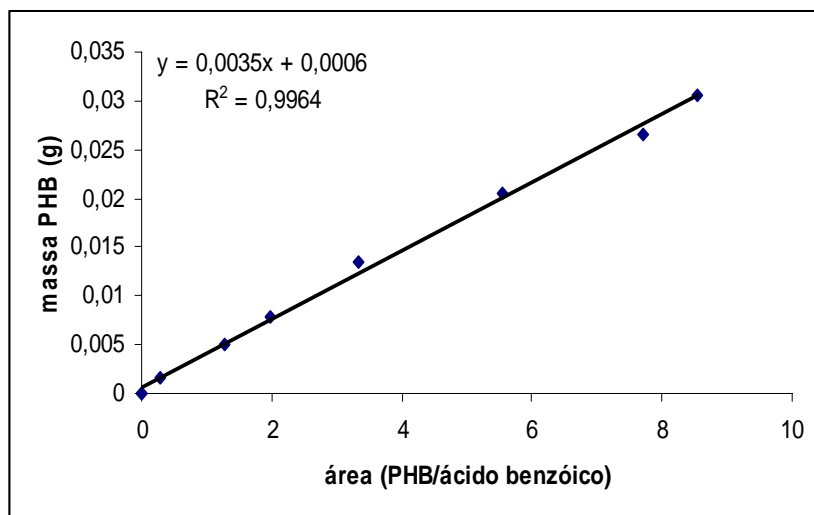
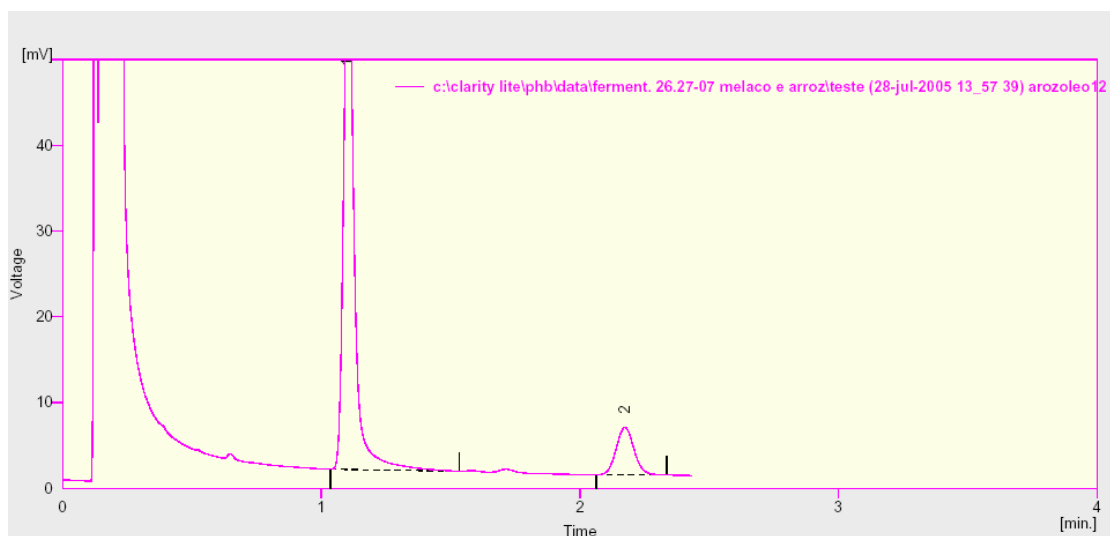
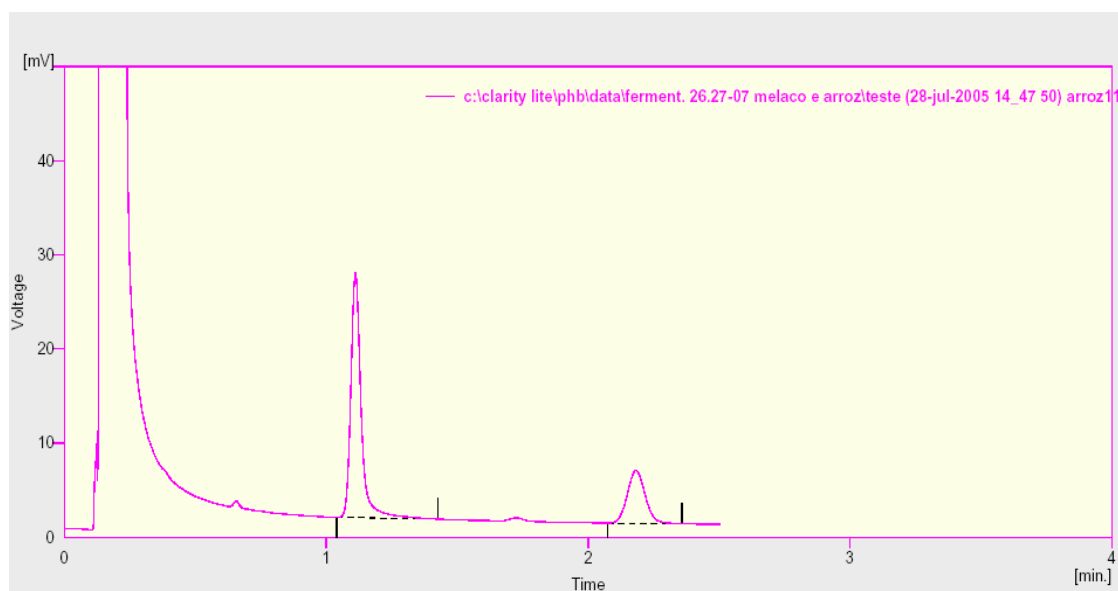


Figura A.2. Curva típica padrão para a determinação da concentração de P(3HB).



(a)



(b)

Figura A.3. Exemplos de cromatogramas nas culturas utilizando resíduo amiláceo, (a) com suplementação e (b) sem suplementação. Primeiro pico corresponde ao P(3HB) e o segundo ao ácido benzóico (determinação de P(3HB) com 22 horas de cultivo).

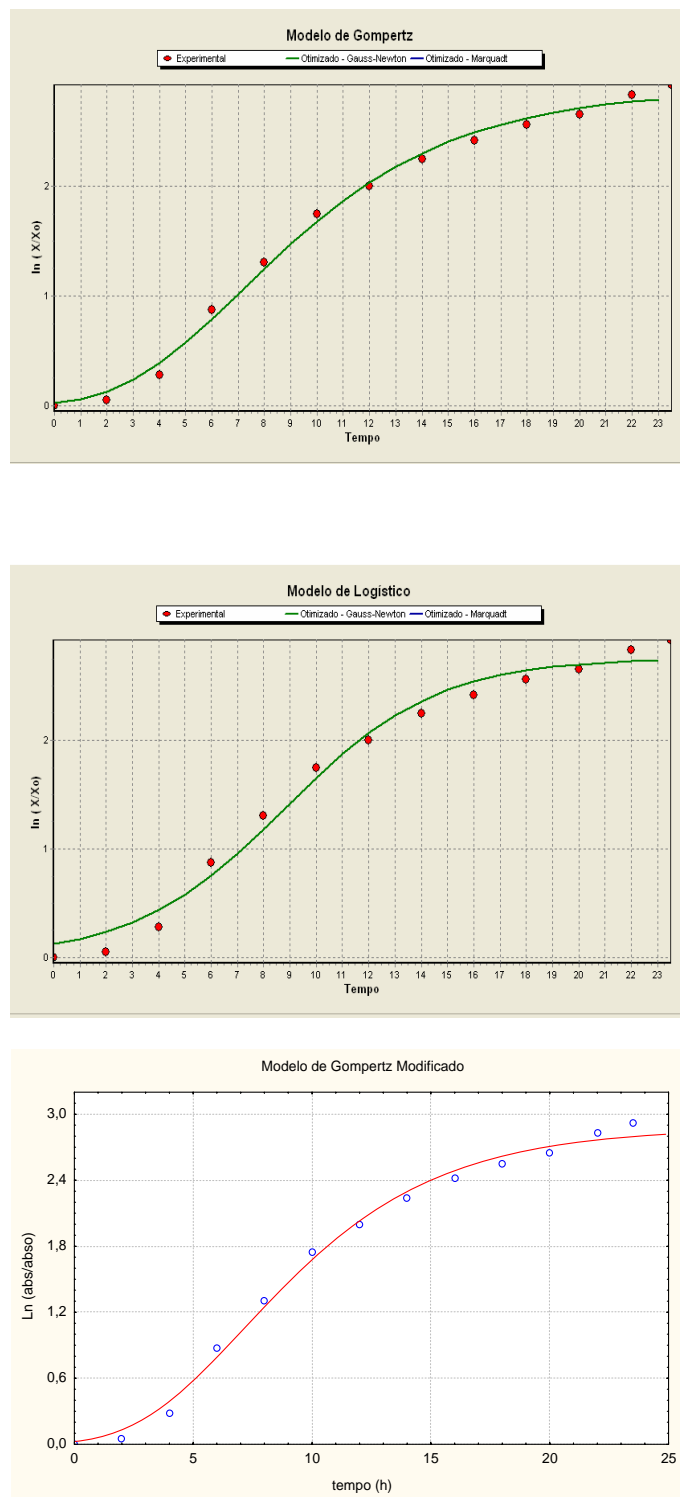


Figura A.4: Aplicação dos modelos primários às curvas dos cultivos de *Ralstonia eutropha* utilizando resíduo amiláceo como fonte de carbono, na temperatura de 30°C.

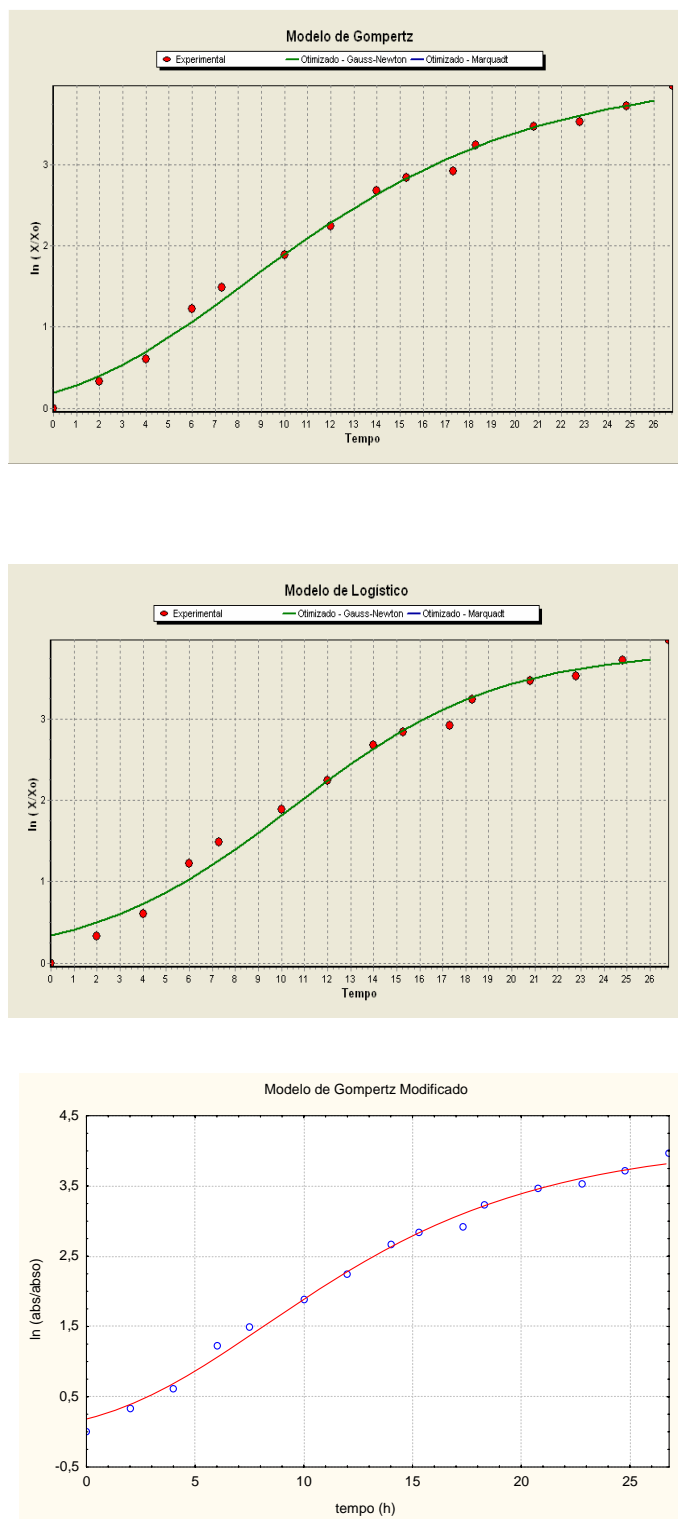


Figura A.5: Aplicação dos modelos primários às curvas dos cultivos de *Ralstonia eutropha* utilizando resíduo amiláceo como fonte de carbono, na temperatura de 35°C.

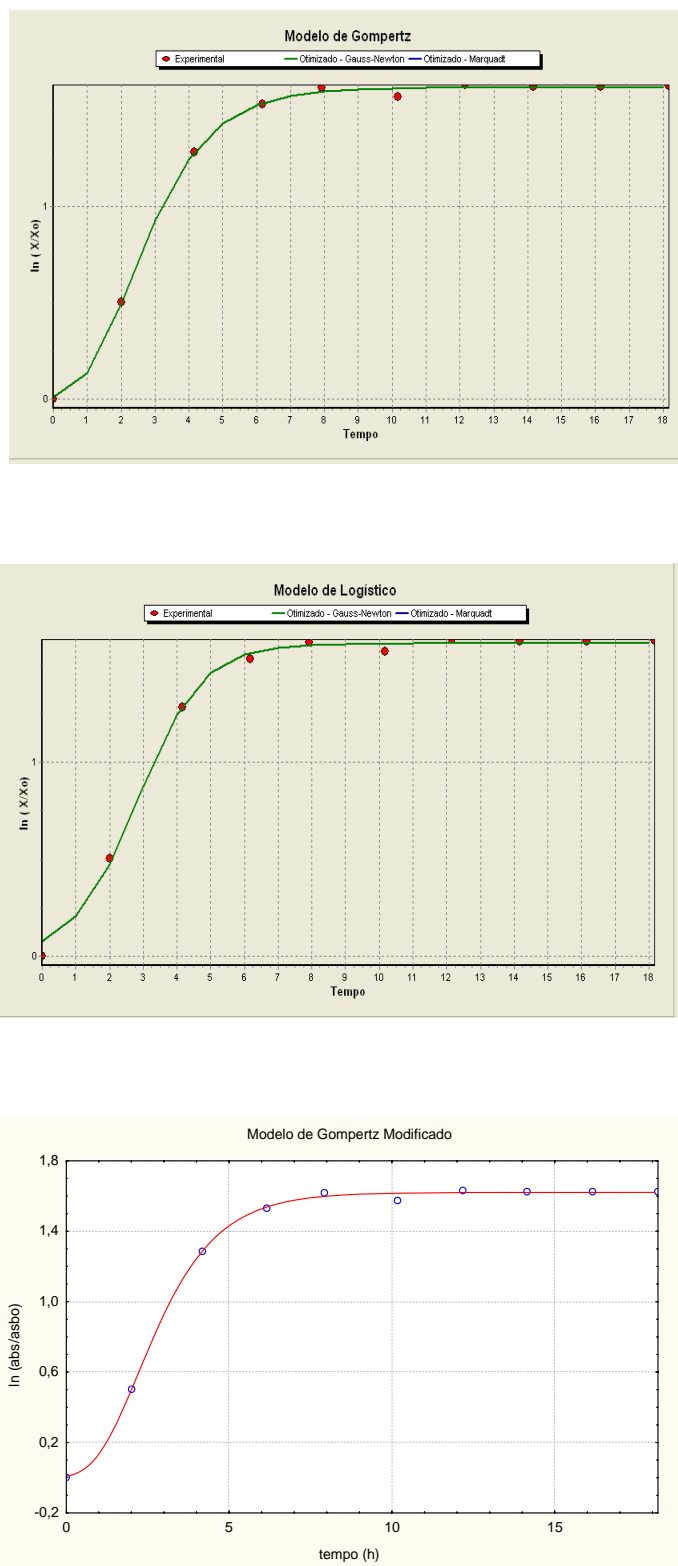


Figura A.6: Aplicação dos modelos primários às curvas dos cultivos de *Ralstonia eutropha* utilizando resíduo amiláceo como fonte de carbono, na temperatura de 40°C.

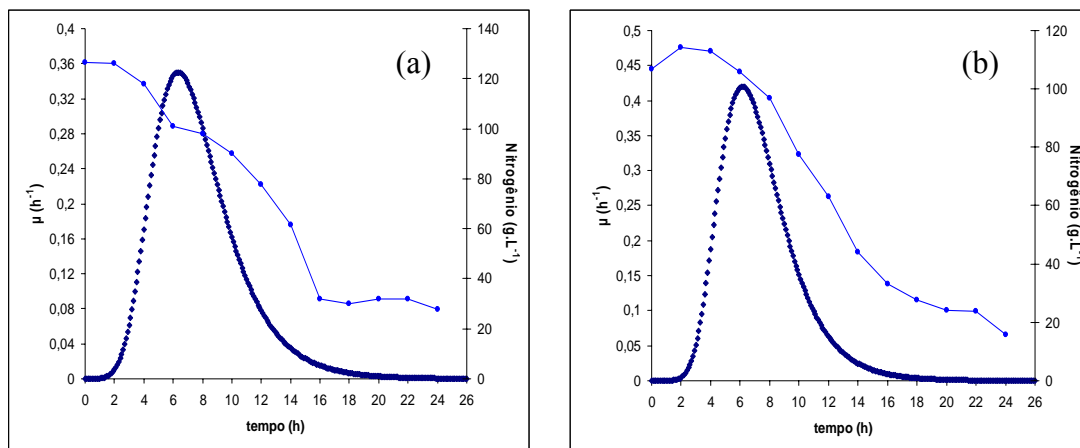


Figura A.7. Acompanhamento do μ pelo tempo (—) e consumo de nitrogênio pelo tempo (---) nos cultivos utilizando a glicose como fonte de carbono, nas seguintes condições: (a) cultivo a 40°C; (b) cultivo a 40°C com suplementação de óleo de soja.

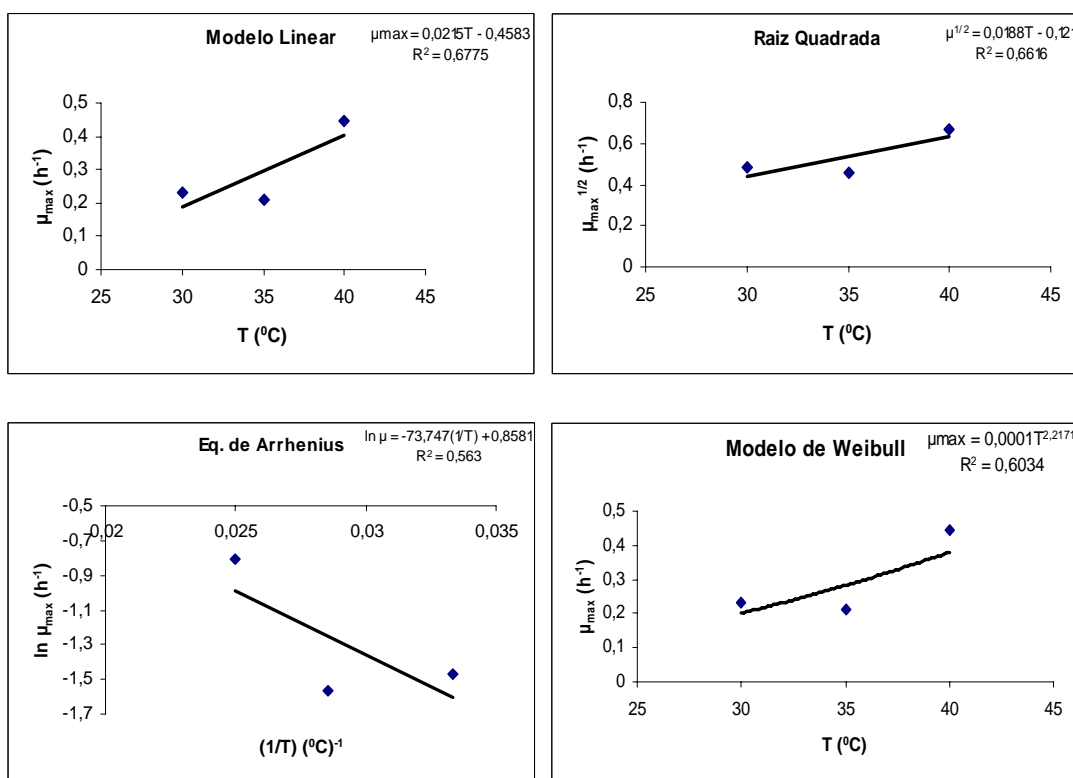


Figura A.8. Efeito da temperatura na velocidade específica máxima de crescimento para os modelos: Linear, Raiz Quadrada, Equação de Arrhenius e Weibull nos cultivos em resíduo amiláceo.

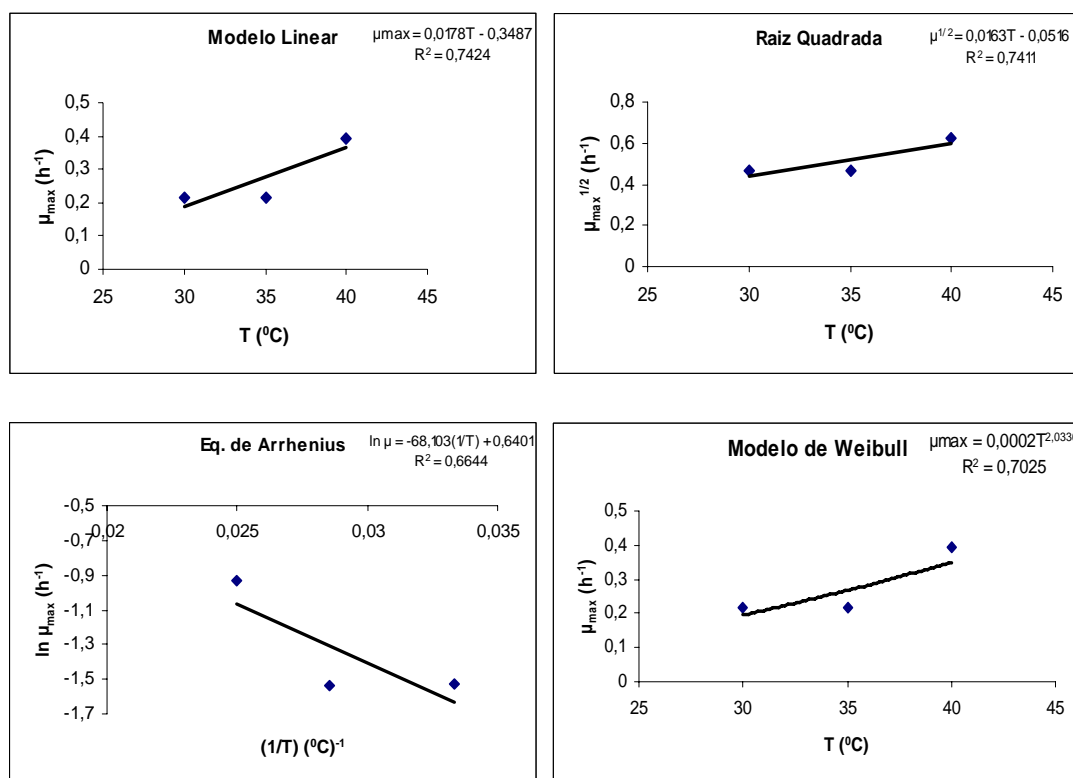


Figura A.9. Efeito da temperatura na velocidade específica máxima de crescimento para os modelos: Linear, Raiz Quadrada, Equação de Arrhenius e Weibull nos cultivos em resíduo amiláceo com suplementação nutricional.

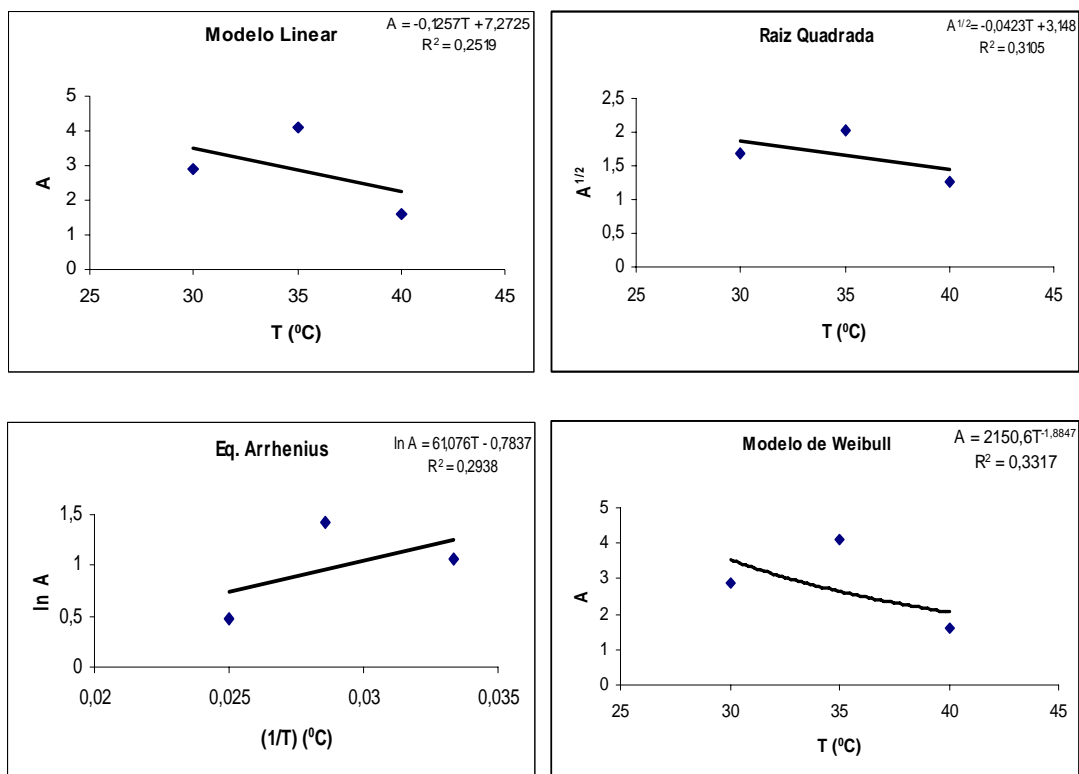


Figura A.10. Efeito da temperatura no aumento logarítmico populacional para os modelos: Linear, Raiz Quadrada, Equação de Arrhenius e Weibull nos cultivos em resíduo amiláceo.

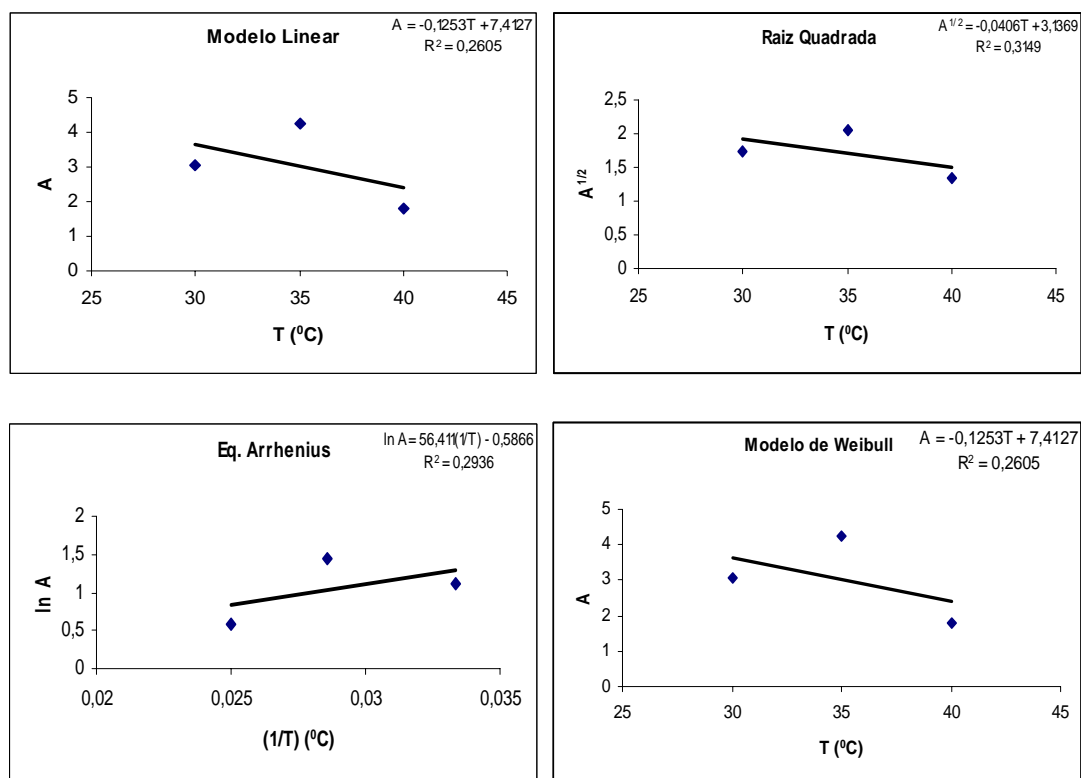


Figura A.11. Efeito da temperatura no aumento logarítmico populacional para os modelos: Linear, Raiz Quadrada, Equação de Arrhenius e Weibull nos cultivos em resíduo amiláceo com suplementação nutricional.

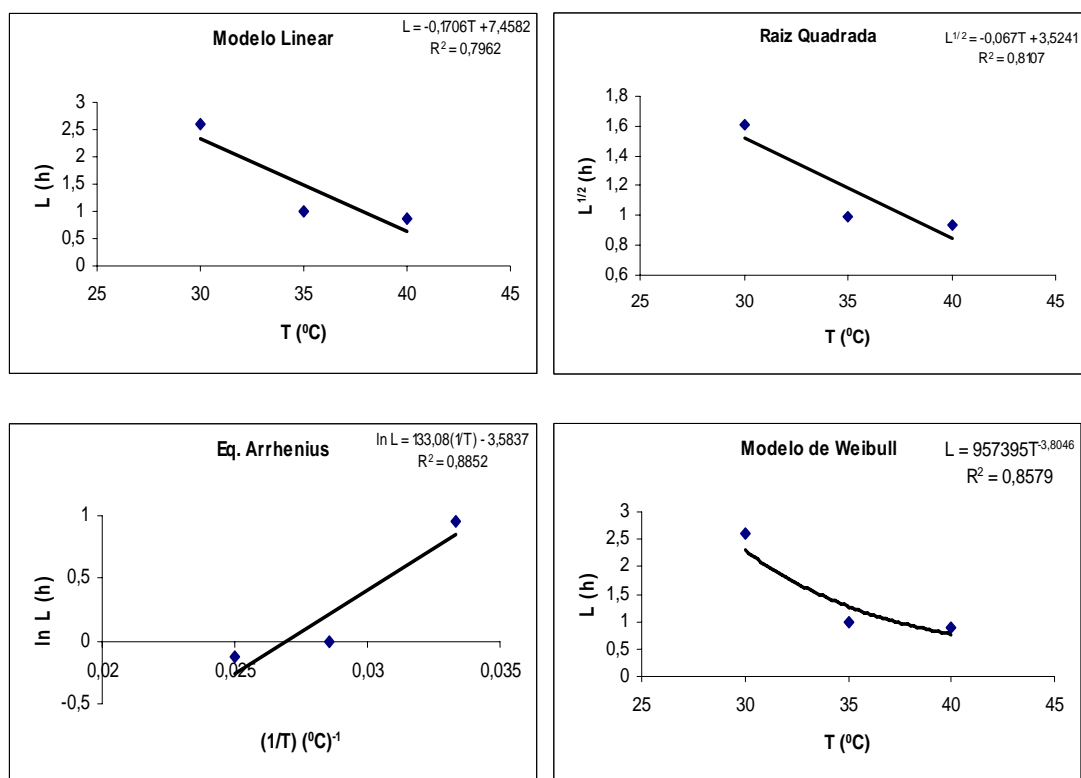


Figura A.12. Efeito da temperatura na duração da fase lag para os modelos: Linear, Raiz Quadrada, Equação de Arrhenius e Weibull nos cultivos em resíduo amiláceo sem suplementação nutricional.

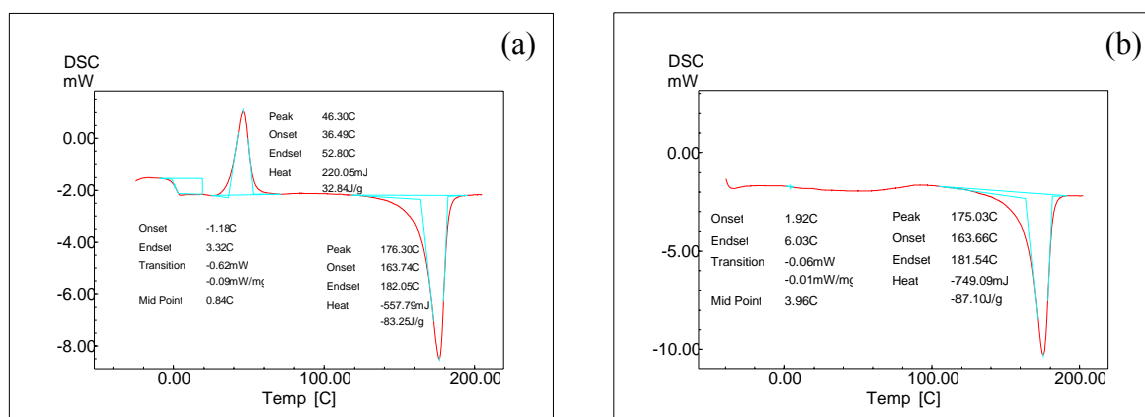


Figura A.13: Curva obtida pela análise de DSC para os filmes de P(3HB) extraídos no tempo de: (a) 2 horas, (b) 1 hora.

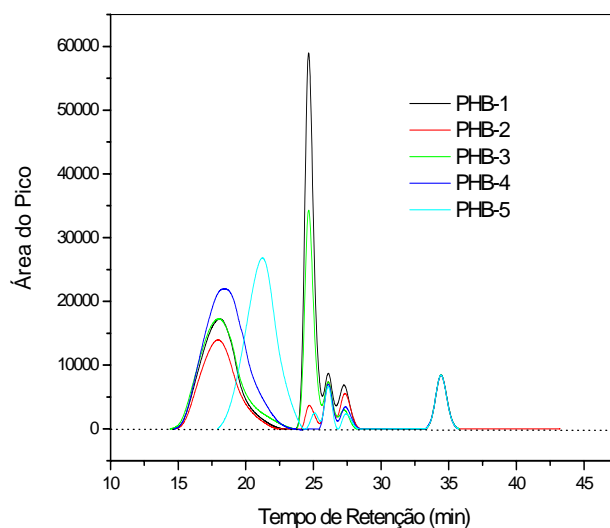


Figura A.14: Cromatogramas obtidos para análise de massa molar, área do pico *versus* tempo de retenção em min, para as amostras: PHB-5: amostra de PHB Industrial; PHB-1: P(3HB) cultivado a 35°C com suplementação de óleo; PHB-2: P(3HB) cultivado a 30°C com suplementação de óleo; PHB-3: P(3HB) cultivado a 30°C sem suplementação de óleo; PHB-4: P(3HB) cultivado 35°C sem suplementação de óleo. Todos os cultivos foram realizados em resíduo amiláceo.

Anexo II

Tabela A.1. Valores dos índices estatísticos para os modelos de Gompertz, Gompertz Modificado e Logístico, para os cultivos em glicose com suplementação de óleo.

Índices	Modelos matemáticos								
	Glicose com suplementação								
	30°C*			35°C			40°C*		
	GP ^c	GM ^d	LO ^e	GP ^c	GM ^d	LO ^e	GP ^c	GM ^d	LO ^e
MSE ^a	0,0078	0,0078	0,0163	0,0097	0,0097	0,0203	0,0068	0,0068	0,0150
Fator bias	0,9938	0,9939	0,9750	1,0105	1,0105	1,0006	1,0071	1,0583	1,0137
F.exatidão	1,0661	1,0661	1,1082	1,0447	1,0448	1,0815	1,0341	1,0341	1,0504
R ^{2b}	0,9941	0,9954	0,9862	0,9935	0,9948	0,9850	0,9958	0,9950	0,9902

^aMSE: erro médio quadrático; ^bR²: coeficiente de correlação; ^cGP: Gompertz; ^dGM: Gompertz Modificado; ^eLO: Logístico. * cultivo com suplementação de 0,6 g.L⁻¹ de ácido oléico no meio.

Observando a Tabela A.1, pode-se perceber que o MSE para os modelos de Gompertz Modificado e Gompertz apresentaram os mesmos valores, sabe-se que o MSE representa a adequação dos modelos aos dados experimentais, dessa maneira quanto menor o valor do MSE, melhor o ajuste do modelo, mostrando assim que os modelos de GM e GP obtiveram a melhor predição dos dados de crescimento de *Ralstonia eutropha* nas três temperaturas. Os coeficientes de correlação obtidos nos modelos de GM e GP estiveram todos acima de 0,99, indicando que esses modelos testados apresentaram um bom ajuste aos dados experimentais.

Os valores do fator bias nas temperaturas de 35°C e 40°C para os três modelos apresentam valores bastante próximos de 1. Para os cultivos a 30°C os valores foram inferiores a 1, porém nos modelos GM e GP estiveram próximos a 1, o modelo LO foi o que apresentou menor valor, sendo esse de 0,9750. Os valores do fator de exatidão obtidos estão próximos de 1, para os três modelos a 35°C e 40°C e para os modelos de GM e GP a 30°C.

Tabela A.2. Valores dos índices estatísticos para os modelos de Gompertz, Gompertz Modificado e Logístico, para os cultivos complementares em glicose.

Índices	Modelos matemáticos					
	Glicose sem suplementação					
	32,5°C			37,5°C		
	GP ^c	GM ^d	LO ^e	GP ^c	GM ^d	LO ^e
MSE ^a	0,0141	0,0090	0,0246	0,0095	0,0095	0,0216
Fator bias	1,0213	1,0201	1,0156	0,9973	0,9973	0,9861
F.exatidão	1,0594	1,0594	1,0617	1,0664	1,0594	1,1036
R ² ^b	0,9920	0,9935	0,9845	0,9939	0,9950	0,9853

^aMSE: erro médio quadrático; ^bR²: coeficiente de correlação; ^cGP: Gompertz; ^dGM: Gompertz Modificado; ^eLO: Logístico.

Comparando o coeficiente de correlação da Tabela A.2, pode-se observar que os modelos de Gompertz e Gompertz Modificado apresentaram coeficientes de regressão acima de 0,99, mostrando bom ajuste das curvas de crescimento de *R. eutropha*, já o modelo Logístico não apresentou um bom ajuste quando comparado aos outros modelos, com coeficiente de correlação de 0,98. Os valores de MSE, fator de bias e fator exatidão para os modelos de Gompertz e Gompertz Modificado apresentaram valores bastante próximos, diferindo apenas no coeficiente de correlação. Como nos outros experimentos realizados em glicose, em geral, o modelo de Gompertz Modificado foi o que obteve os melhores resultados para a predição do crescimento de *Ralstonia eutropha* nas temperaturas complementares de 32,5°C e 37,5°C.

Tabela A.3. Valores dos índices estatísticos para os modelos de Gompertz, Gompertz Modificado e Logístico, para o cultivo em glicose em biorreator.

Índices	Modelos matemáticos		
	GP ^c	GM ^d	LO ^e
MSE ^a	0,0042	0,0026	0,01543
Fator bias	0,9996	0,9990	0,9332
F.exatidão	1,0329	1,0248	1,0329
R ² ^b	0,9981	0,9990	0,9923

^aMSE: erro médio quadrático; ^bR²: coeficiente de correlação; ^cGP: Gompertz; ^dGM: Gompertz Modificado; ^eLO: Logístico.

Pela análise da Tabela A.3, pode-se dizer que os três modelos se ajustam ao crescimento de *Ralstonia eutropha* cultivada em glicose, pois apresentam coeficiente de correlação acima de 0,99, sendo que o modelo de Gompertz Modificado apresentou o menor valor de MSE, o fator de exatidão foi o mais próximo de 1 e também apresentou o melhor coeficiente de correlação. O modelo de GM foi o que apresentou os melhores resultados para a predição do crescimento de *R. eutropha* no cultivo em biorreator.