

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

DANIELE FARIAS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POLI(3-
HIDROXIBUTIRATO-co-3-HIDROXIVALERATO) POR
cupriavidus necator EM MELAÇO CÍTRICO**

**Florianópolis - SC
Junho de 2009**

DANIELE FARIAS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POLI(3-
HIDROXIBUTIRATO-co-3-HIDROXIVALERATO) POR
cupriavidus necator EM MELAÇO CÍTRICO**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

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

Co-Orientador: Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto

**Florianópolis – SC
Agosto de 2009**

DANIELE FARIAS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POLI(3-
HIDROXIBUTIRATO-co-3-HIDROXIVALERATO) POR
cupriavidus necator EM MELAÇO CÍTRICO**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Florianópolis, ____ de junho de 2009.

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

Prof. Dr. Willibaldo Schmidell
(Co-Orientador)

Banca Examinadora:

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

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

Imagination is more important than knowledge. For knowledge is limited to all we now know and understand, while imagination embraces the entire world, and all there ever will be to know and understand.

Albert Einstein

*Dedico este trabalho à minha mãe, à minha
querida irmã e à memória de meu pai, com
todo meu amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao finalizar esta etapa àqueles que de alguma forma colaboraram para a realização e concretização de mais esta etapa em minha vida:

Primeiramente à minha mãe pela dedicação, apoio e incentivo e à minha querida irmã, por ser um exemplo de bondade e generosidade, por suas palavras de carinho, amizade e compreensão. Obrigada por existirem na minha vida e acreditarem em mim.

À professora orientadora, Gláucia, pela sua grande contribuição, oportunidade, apoio, paciência e, principalmente por compartilhar comigo suas idéias e conhecimentos, sem os quais eu não teria conseguido chegar ao fim desta etapa.

Ao professor Willibaldo Schmidell por estar sempre presente no acompanhamento do desenvolvimento deste estudo com suas idéias e contribuições sempre pertinentes e decisivas.

À empresa Citrosuco S.A por financiar minha bolsa de mestrado.

Aos colegas do projeto PHB, pela ajuda fundamental no desenvolvimento deste trabalho, a cada um que contribuiu para concretização do mesmo meu sincero: Muito Obrigada!

Às minhas eternas “amigas-irmãs”: Joana, Marta e Márcia, que durante toda essa etapa da minha vida dedicaram seu carinho, confiança, atenção e amizade incondicional, sempre acreditando nos meus sonhos e sempre dizendo que eu chegaria ao fim. Vocês são indispensáveis na minha vida.

À amiga Manuela Feltes, por estar sempre presente em “todos” os momentos e por dedicar a mim uma amizade verdadeira, a qual, levarei por onde eu for e por toda à vida.

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

E à todas as pessoas que de alguma forma passaram por minha vida durante esta etapa, as quais, direta ou indiretamente, contribuíram com a minha formação profissional e principalmente para meu crescimento como ser humano, fazendo com que eu aprendesse a extrair conhecimento e aprendizado sempre positivo nas mais inusitadas situações.

RESUMO

Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) [P(3HB-co-3HV)] é um biopolímero acumulado intracelularmente por muitos organismos como reserva de carbono e energia, em condições desbalanceadas do meio. 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 polímeros convencionais, o que limita o uso. Diferentes estratégias de cultivo para a produção do copolímero P(3HB-co-3HV) por *Cupriavidus necator* foram avaliadas, com o objetivo de aumentar a produtividade do processo, e, conseqüentemente, a redução do custo de produção. O monitoramento da concentração de biomassa e da concentração de oxigênio dissolvido indicou as mudanças metabólicas do microrganismo, sinalizando o momento da limitação de nutriente. Esta sinalização facilita o processo produtivo, permitindo que as alimentações de nitrogênio e ácido propiônico sejam efetuadas a partir do momento exato do início da fase de produção, evitando desperdício de co-substrato. Visando testar a utilização de substratos alternativos de baixo custo, foram realizados testes em bioreator, estudando o crescimento de *C. necator* em diferentes fontes de carbono (glicose e melaço cítrico). Quando se utilizou melaço cítrico como fonte de carbono, obteve-se maior velocidade específica de crescimento ($0,35 \text{ h}^{-1}$) comparada ao cultivo realizado em glicose ($0,19 \text{ h}^{-1}$), demonstrando-se dessa forma como substrato promissor para a produção de biopolímeros. A alimentação do elemento limitante (nitrogênio) durante a fase de produção permitiu a formação de um copolímero com 9,3 mol% de acúmulo das unidades 3HV, comparado ao acúmulo de 3,7 mol% em cultura submetida à carência de nitrogênio. No entanto, não foi observado aumento de produtividade em virtude do elevado crescimento residual promovido, o qual prejudicou o acúmulo do polímero. A cinética do crescimento e a transferência de oxigênio dissolvido durante o cultivo foram acompanhados. A velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2) e o $k_L a$ foram determinados através do método dinâmico. Os resultados mostram que o $k_L a$, a velocidade específica de crescimento (μ_x) e de respiração (QO_2) são afetados pelo aumento da concentração de biomassa. O maior consumo global de oxigênio foi de $595 \text{ gO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para uma concentração celular de $18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ em cultivo realizado em glicose, sendo que a velocidade específica de consumo de oxigênio para manutenção celular neste

cultivo foi de $47,1 \text{ mgO}_2 \cdot (\text{g}_{\text{cél}} \cdot \text{h})^{-1}$. A modelagem matemática do crescimento da bactéria foi utilizada para estimar os parâmetros: velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), tempo da fase lag (λ) e aumento logarítmico da população (A), utilizando melaço cítrico e glicose como substrato. Utilizaram-se três modelos primários de crescimento (Gompertz Modificado, Logístico e Barany e Roberts) e o modelo de Gompertz Modificado foi o que apresentou melhor ajuste às curvas de crescimento da bactéria, para ambas as fontes de carbono testadas. Pelo modelo de Gompertz Modificado foi possível prever o momento da limitação da cultura. Por fim, a caracterização do copolímero produzido a partir das diferentes fontes de substrato testadas mostrou que os mesmos apresentam propriedades térmicas semelhantes ao copolímero industrial e superiores ao homopolímero industrial P(3HB).

Palavras-chave: *Cupriavidus necator*, P(3HB-co-3HV), transferência de oxigênio, modelagem matemática, resíduo cítrico.

ABSTRACT

Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-*co*-3HV)] is a biopolymer accumulated intracellularly by many microorganisms, as carbon and energy storage, under unbalanced growth. It possesses thermoplastic properties similar to the conventional plastics with advantages of biocompatibility and complete biodegradability. However, its high cost of production related to conventional plastics limits its use. Different strategies of P(3HB-*co*-3HV) production by *Cupriavidus necator* were studied, aiming to increase its productivity, and, consequently reducing the cost of production. Culture biomass potential and percentage of dissolved oxygen indicated state changes in *C. necator* and identified the limitation point during the culture. Further, it facilitated the production process allowing that nitrogen and propionic acid feedings were realized from the beginning of the production phase, without co-substrate waste. Looking for alternatives substrates of low cost, experiments in bioreactor were done, studying *C. necator* growth in different carbon sources (glucose and citrus molasses). When citrus molasses was used as carbon source, has been obtained a higher specific growth rate ($0,35 \text{ h}^{-1}$) compared with glucose ($0,19 \text{ h}^{-1}$), the production phase, it was demonstrated it is as a promising substrate for biopolymer production. Nitrogen feeding, during the production phase, allowed the formation of copolymer with higher percentage of 3HV units, with 9,3 mol% compared with accumulation of 3,7 mol% in the culture with nitrogen deficiency. However, there wasn't increase of productivity due to the high residual growth promoted. The kinetics growth and oxygen transfer were monitored during of cultivation. The specific oxygen uptake rate (QO_2) and the $k_{L,a}$ were determined through the dynamic method. Results show that $k_{L,a}$, as well as the specific growth (μ_x) and respiration rates (QO_2), are affected by the increase in biomass concentration. The highest value of specific consumption rate of oxygen uptake observed was $595 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, for a cell concentration of $18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, in culture with glucose. The amount of oxygen necessary for cell maintenance was $47,1 \text{ mgO}_2 \cdot \text{g}_{c,1} \cdot \text{h}^{-1}$. The mathematical modeling of bacterial growth was used to estimate the following parameters: specific maximum growth ($\mu_{\text{máx}}$), time of lag phase (λ) and logarithmic increase of population (A), using citrus molasses and glucose as carbon source. Three primary models were used (Modified Gompertz, Logistic and Barany and Roberts) and the Modified Gompertz model was present the best fit to the growth curves of the bacteria, on the different carbon

source tested. Through Modified Gompertz model, it was possible to establish the moment of nitrogen limitation in the culture. The copolymer characterization obtained from different carbon sources tested showed that thermal properties were similar to the conventional copolymer and higher than that of the conventional homopolymer P(3HB).

Keywords: *Cupriavidus necator*, *P(3HB-co-3HV)*, oxygen transfer, mathematical modeling, citrus molasses.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2. 1** - Estrutura geral dos PHAs.....37
- Figura 2. 2** - Biociclo dos polihidroxicanoatos.....42
- Figura 2. 3** - *Cupriavidus necator* em fase de crescimento (a), Fonte: (Ampe, 1995); e fase de produção (a barra representa 0,5 μm) (b).....49
- Figura 2. 4** - Via de biossíntese de produção de P(3HB-*co*-3HV) a partir de glicose e propionato, adaptado de Doi (1990)..52
- Figura 2. 5** - Biossíntese e degradação do P(3HB).....55
-
- Figura 3. 1** - Bioreator Bioflo 110 utilizado nos experimentos68
- Figura 3. 2** - Ilustração para explicar o método dinâmico utilizado para determinar $k_L a$ e QO_2 (adaptado por SCHMIDELL, 2001)76
- Figura 3. 3** - Fluxograma do método de extração das células de *C. necator* cultivada em diferentes substratos para obtenção de P(3HB-*co*-3HV) (baseado em Dalcanton, 2006)81
- Figura 3. 4** - Curva típica de crescimento microbiano em função do tempo, apresentando os parâmetros biológicos de crescimento86
-
- Figura 4.1** - Momento da limitação em nitrogênio observado pelo aumento da porcentagem de oxigênio dissolvido no cultivo em meio sintético (glicose) para a produção de P(3HB-*co*-3HB) por *C. necator*.....93
- Figura 4.2** - Acompanhamento do crescimento de *C. necator*, expressado em $\ln(\text{Abs}/\text{Abs}_0)$ e da concentração de nitrogênio versus o tempo, durante o cultivo em meio sintético para produção de P(3HB-*co*-3HV). A linha pontilhada indica o momento da limitação94
- Figura 4.3** - Evolução da biomassa total e da concentração de nitrogênio em função do tempo para a cultura conduzida em meio sintético para produção do copolímero P(3HB-*co*-3HV).....95
- Figura 4.4** - Evolução das concentrações de biomassa total (X_{total} ; \square) e residual (X_r ; $\square\square\square$), proteína (Ptn; Δ), nitrogênio (\bullet) e produção do copolímero (P(3HB-*co*-3HV; \blacklozenge) para o cultivo realizado em glicose. Os pontos representam os

	dados experimentais e as linhas o ajuste pelo <i>software Lissage</i>	96
Figura 4.5	- Produtividade de P(3HB- <i>co</i> -3HV) em toda a cultura (a) e na fase de produção (b) para as culturas A (■) e B (□) tendo como fonte de substrato glicose	101
Figura 4.6	- Fluxograma de pré-tratamento do melão para o ensaio de filtração	103
Figura 4.7	- Concentração de massa seca para o teste de filtração do melão em membrana de ultrafiltração	105
Figura 4.8	- Fluxograma de pré-tratamento do melão para os cultivos A, B e C na produção de P(3HB- <i>co</i> -3HV)	106
Figura 4.9	- Acompanhamento do crescimento de <i>C. necator</i> , expresso em $\ln(\text{Abs}/\text{Abs}_0)$ versus o tempo, durante o cultivo em melão cítrico pasteurizado.....	107
Figura 4.10	- Evolução das concentrações de biomassa total (X_{total} ; □) e residual (X_r ; □□□), proteína (Ptn; Δ) e produção do copolímero (P(3HB- <i>co</i> -3HV; ◆) para o cultivo realizado em melão cítrico pasteurizado. Os pontos representam os dados e as linhas o ajuste pelo <i>software Lissage</i>	108
Figura 4.11	- Evolução da concentração de biomassa total (■) e de nitrogênio (□) versus o tempo de cultivo durante cultura utilizando melão cítrico pasteurizado como fonte de substrato para produção de P(3HB- <i>co</i> -3HV) por <i>Cupriavidus necator</i>	110
Figura 4.12	- Momento da limitação da cultura observado pelo aumento da porcentagem de OD no cultivo em melão cítrico para a produção de P(3HB- <i>co</i> -3HB) por <i>C. necator</i>	110
Figura 4.13	- Determinação dos fatores de conversão de ART em célula ($Y_{X/US}$), de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$), e ácido propiônico em unidades 3HV ($Y_{\text{ác. prop}/3HV}$)	111
Figura 4.14	- Evolução da biomassa total (expressa em \ln ; ■) e da concentração de nitrogênio ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; □) em cultura conduzida em carência de nitrogênio na fase de produção.....	114
Figura 4.15	- Evolução das concentrações de ART (■) em função do tempo e as alimentações realizadas durante a cultura em carência de nitrogênio	115
Figura 4.16	- Evolução das concentrações de biomassa total (X_{total} ; □) e residual (X_r ; —), proteína (Ptn; Δ), nitrogênio (●) e produção do copolímero (P(3HB- <i>co</i> -3HV; ◆) em função	

- do tempo para cultura conduzida em carência de nitrogênio. Os pontos representam os dados experimentais e as linhas o ajuste pelo *software Lissage*116
- Figura 4.17** - Evolução da biomassa total (expressa em ln; ■) e da concentração de nitrogênio (g.L^{-1} ; □) em cultura com alimentação de nitrogênio na fase de produção117
- Figura 4.18** - Evolução das concentrações de ART (■) em função do tempo e as alimentações realizadas durante a cultura com alimentação de nitrogênio na fase de produção118
- Figura 4.19** - Evolução das concentrações de biomassa total (X_{total} ; □), residual (X_r ; ---), proteína (Ptn; Δ), nitrogênio (●) e produção do copolímero (P(3HB-co-3HV); ◆) em função do tempo para cultura conduzida em alimentação de nitrogênio. Os pontos representam os dados experimentais e as linhas o ajuste pelo *software Lissage*118
- Figura 4. 20** -Teste degrau, com o eletrodo inicialmente zerado com N_2 , colocado em meio de cultura saturado com O_2 e sob agitação, a 35 °C: resposta do eletrodo em função do tempo (a) e determinação do tempo de resposta (b)123
- Figura 4. 21** -Variação entre os valores de k_p (h^{-1}) conforme o tempo de utilização da membrana124
- Figura 4. 22** -Variação da concentração real de oxigênio dissolvido ($C.C_S^{-1}$) e sinal do eletrodo ($C_p.C_S^{-1}$), durante execução do método dinâmico. Simulação da Equação 4.4 e Equação 3.13 para valores de $k_L a$ e k_p para a primeira utilização da membrana125
- Figura 4. 23** -Variação da concentração real de oxigênio dissolvido (◆, $C.C_S^{-1}$) e sinal do eletrodo (■, $C_p.C_S^{-1}$), durante execução do método dinâmico. Simulação da Equação 3.16 e Equação 3.13 para os valores de $k_L a$ e k_p para a quarta utilização da membrana126
- Figura 4. 24** -Variação da concentração de oxigênio dissolvido com o tempo127
- Figura 4. 25** -Determinação do coeficiente volumétrico de oxigênio ($k_L a$)128
- Figura 4. 26** -Dados experimentais do método dinâmico (C_p) obtidos em cultivo para produção de P(3HB-co-3HV) por *C. necator*. A curva vermelha corresponde aos dados teóricos (C_{teor}) e a curva tracejada representa os valores

	de C_p corrigido o atraso devido ao tempo de resposta ($C_{p_{corr}}$).....	130
Figura 4. 27	-Dados do k_{La} (\blacktriangle), QO_2X (\blacksquare), QO_2 (\bullet), X_t (\square) e X_r (—) durante os cultivos para produção do copolímero P(3HB-co-3HV) por <i>Cupriavidus necator</i> utilizando como fonte de carbono glicose (a) e melão cítrico (b). A linha pontilhada representa a limitação em nitrogênio e início da fase de produção.....	132
Figura 4. 28	-Relação entre a velocidade específica de respiração (QO_2 real) e a velocidade específica de crescimento das células (μ) para a produção de P(3HB-co-3HV) por <i>C. necator</i> a partir de glicose (a) e melão cítrico (b) como fonte de substrato.....	134
Figura 4. 29	-Curvas de crescimento de <i>C. necator</i> para produção de P(3HB-co-3V) expressa em $\ln(X/X_0)$ em função do tempo cultivadas em (a) Glicose e (b) Melão cítrico. As linhas representam o Modelo de Gompertz Modificado ajustado aos dados experimentais, com auxílio do software Matlab 7.0.	138
Figura 4. 30	-Curvas de crescimento de <i>C. necator</i> para produção de P(3HB-co-3V) expressa em $\ln(X/X_0)$ em função do tempo cultivada em melão cítrico com alimentação de nitrogênio na fase de produção. As linhas representam o Modelo de Gompertz Modificado ajustado aos dados experimentais, com auxílio do <i>software</i> Matlab 7.0. ...	141
Figura 4. 31	-Evolução do μ pelo tempo (—) e consumo de nitrogênio pelo tempo (\bullet) nos cultivos utilizando como fonte de carbono (a) glicose, (b) melão cítrico e (c) melão cítrico com alimentação de nitrogênio na fase de produção.....	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Comparação entre as propriedades dos polímeros	40
Tabela 2.2 - Biodegradação de um filme de 1 mm de P(3HB- <i>co</i> -3HV) em diferentes ambientes	41
Tabela 3. 1 - Composição do meio mineral (MM).....	65
Tabela 3. 2 - Composição da solução de oligoelementos.	66
Tabela 3. 3 - Procedimento de determinação de nitrogênio amoniacal.	73
Tabela 4.1 - Resumo dos dados gerais obtidos nas culturas realizadas com glicose como fonte de substrato para produção de P(3HB- <i>co</i> -3HV)	97
Tabela 4.2 - Fator de conversão de substrato em polímeros e monômeros para as culturas com adição de ácido propiônico (A e B) para formação de copolímero e sem (C) para formação de homopolímero.....	99
Tabela 4.3 - Conteúdo de carbono consumido e polímero produzido para as culturas (A e B) para produção de copolímero e cultura (C) para produção de homopolímero	99
Tabela 4.4 - Resultados das análises de ART e Nitrogênio para o teste de filtração do melão cítrico utilizando duas membranas de ultrafiltração.....	104
Tabela 4. 5 - Resumo dos dados gerais obtidos nos cultivos com carência e alimentação de nitrogênio durante a fase de produção do copolímero P(3HB- <i>co</i> -3HV).....	120
Tabela 4. 6 - Resposta da constante de atraso da sonda conforme o número de vezes que a sonda foi utilizada	123
Tabela 4. 7 - Variáveis de cultivo avaliadas no momento da realização do ensaio para determinação de Y_{GO} e m_o para produção de P(3HB- <i>co</i> -3HV) por <i>Cupriavidus necator</i>	135
Tabela 4. 8 - Valores dos índices estatísticos para os modelos aplicados às curvas de crescimento de <i>C. necator</i> nas diferentes fontes de carbono.....	136
Tabela 4. 9 - Parâmetros de crescimento obtidos pelo modelo de GM para os cultivos realizados em diferentes fontes de carbono para a produção de P(3HB- <i>co</i> -3HV)	138

Tabela 4. 10 - Valores dos índices matemáticos e estatísticos para os modelos aplicados às curvas de crescimento de <i>C. necator</i> nas diferentes fontes de carbono curvas de crescimento de <i>C. necator</i> nas diferentes fontes de carbono	139
Tabela 4. 11 - Tempo de cultivo no qual a velocidade específica de crescimento é máxima e onde ocorre a limitação de nitrogênio, nas culturas utilizando diferentes fontes de carbono como substrato. glicose e melão cítrico, para produção de P(3HB-co-3HV)	144
Tabela 4. 12 - Porcentagem de pureza e porcentagem de recuperação dos filmes obtidos	146
Tabela 4. 13 - Porcentagens de perda de massa obtidas através da análise termogravimétrica (TGA) para os filmes de P(3HB-co-3HV) obtidos em cultivos realizados com diferentes substratos e para o filme de P(3HB) Industrial	147
Tabela 4. 14 - Propriedades térmicas obtidas pela análise de calorimetria DSC para os filmes de P(3HB-co-3HV) obtidos em cultivos realizados com diferentes substratos e para os filmes de P(3HB) Industrial e P(3HB-co-3HV) SIGMA ALDRICH.....	149
Tabela 4. 15 - Propriedades térmicas obtidas na análise de TGA para os filmes de P(3HB-co-3HV) obtidos em cultivos realizados com diferentes substratos e para os filmes de P(3HB) Industrial e P(3HB-co-3HV) SIGMA ALDRICH	152

LISTA DE ABREVIATURAS

PHAs	Poli-hidroxiálcanoatos
P(3HB)	Poli(3-hidroxi-butirato)
P(3HB- <i>co</i> -3HV)	Poli(3-hidroxi-butirato- <i>co</i> -3-hidroxi-valerato)
3HB	3-hidroxi-butirato
3HV	3-hidroxi-valerato
NB	Meio nutriente
MM	Meio mineral
abs	Absorbância
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
TGA	Termogravimetria
MSE	Erro médio quadrado
R ²	Coefficiente de correlação
GM	Modelo de Gompertz Modificado
LO	Modelo Logístico
BR	Barany Roberts
χ_c	Grau de cristalinidade
rpm	Rotações por minuto
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
ATP	Adenosina trifosfato
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
CoASH	Coenzima A
DNS	Dinitrosalicílico

LISTA DE SÍMBOLOS

P_r	Produtividade média de P(3HB- <i>co</i> -3HV) ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
P_p	Produtividade na fase de produção de P(3HB- <i>co</i> -3HV) ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
$q_{P(3HB-co-3HV)}$	Velocidade específica de produção de P(3HB- <i>co</i> -3HV) ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
$Y_{Q/S}$	Fator de conversão de substrato S no componente Q (g.g^{-1})
$Y_{Xt/S \text{ cresc}}$	Fator de conversão de substrato S em biomassa total na fase de crescimento (g.g^{-1})
$Y_{Xt/S \text{ cresc}}$	Fator de conversão de substrato S em biomassa total na fase de produção (g.g^{-1})
$Y_{Xt/S \text{ cresc}}$	Fator de conversão de nitrogênio em células (g.g^{-1})
$Y_{P(3HB)/S}$	Fator de conversão de substrato S em P(3HB) (g.g^{-1})
$Y_{3HV/\text{ác. prop.}}$	Fator de conversão de ácido propiônico em 3-hidroxicincomato (g.g^{-1})
$Y_{(3HB-co-3HV/S)}$	Fator de conversão de S em P(3HB- <i>co</i> -3HV) (g.g^{-1})
Y_{GO}	Fator de conversão de oxigênio para as células ($\text{g}_{\text{cél.}}.\text{gO}_2^{-1}$)
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})
μ	Velocidade específica de crescimento (h^{-1})
λ	Duração da fase lag (h)
A	Aumento logarítmico populacional
C	Concentração de oxigênio no líquido ($\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$)
$C_{\text{crít}}$	Concentração de oxigênio dissolvido crítica ($\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$)
C_S	Concentração de saturação do oxigênio no líquido ($\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$)
C_p	Concentração de oxigênio dissolvido lido pelo eletrodo ($\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$)
H	Constante de Henry ($\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}.\text{atm}^{-1}$)
k_{La}	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1})
k_p	Constante de atraso do eletrodo (h^{-1})
m_O	Coefficiente de manutenção para o oxigênio ($\text{mgO}_2.\text{g}_{\text{cél}}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
n_{O_2}	Fluxo de oxigênio ($\text{mgO}_2.\text{cm}^{-2}.\text{h}$)
p_g	Pressão parcial de oxigênio no gás (atm)

p_i	Pressão parcial de oxigênio na interface gás-líquido (atm)
p_L	Pressão parcial de oxigênio no líquido (atm)
Q_{O_2}	Velocidade específica de respiração ($\text{mgO}_2 \cdot \text{g}_{\text{cél}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
V	Volume (L)
t	Tempo (h)
S	Concentração de substrato durante um cultivo ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
S_0	Concentração inicial de substrato ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
X_t	Concentração de biomassa total ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
X_r	Concentração de biomassa residual ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
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 ($^{\circ}\text{C}$)

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO.....	30
--------------------------	-----------

CAPÍTULO II

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	34
2.1 Polihidroxialcanoatos.....	34
2.1.1 Histórico dos polihidroxialcanoatos.....	34
2.1.2 Descrição e propriedades dos PHAs	36
2.1.3 Aplicações.....	43
2.2 Microrganismos Produtores	44
2.2.1 Microrganismos normalmente produtores de PHA.....	44
2.2.2 Microrganismos recombinantes	46
2.2.3 Plantas transgênicas	47
2.3 Produção por <i>Cupriavidus necator</i>	48
2.4 Metabolismo em <i>Cupriavidus necator</i>	49
2.4.1 Biossíntese de P(3HB).....	49
2.4.2 Enzimas envolvidas na síntese de P(3HB).....	50
2.4.3 Biossíntese de P(3HB-co-3HV).....	51
2.4.4 Regulação da síntese de PHAs.....	53
2.4.5 Degradação intracelular do P(3HB).....	54
2.5 Estratégias de cultivo	55
2.5.1 Modos de cultura	55
2.5.2 Culturas em regime batelada alimentada	57
2.6 Custos de produção.....	58
2.6.1 Custo do substrato.....	59
2.7 Extração	61
2.8 Caracterização.....	62

CAPÍTULO III

3 Materiais e Métodos.....	64
3.1 Microrganismo.....	64
3.2 Meios de cultura.....	64
3.3 Condições de cultura.....	66
3.3.1 Pré-culturas	66

3.3.2 Culturas em bioreator.....	67
3.3.3 Fontes de carbono	68
3.4 Estratégias de cultivo	69
3.4.1 Alimentação em Açúcar e Ácido propiônico	69
3.4.2 Alimentação em nitrogênio	69
3.4.3 Pré-tratamento do melaço cítrico	70
3.5 Métodos analíticos	70
3.5.1 Amostragem.....	70
3.5.2 Determinação da concentração de biomassa.....	70
3.5.3 Dosagem de substratos.....	71
3.5.4 Dosagem de P(3HB-co-3HV)	74
3.5.5 Determinação do oxigênio dissolvido	74
3.6 Transferência de massa	74
3.6.1 Transferência e consumo de oxigênio durante o cultivo: determinação do k_La e QO_2	74
3.6.2 Constante de atraso do eletrodo (k_p) de oxigênio dissolvido.....	77
3.6.3 Correção do k_{La} em função do atraso na resposta do eletrodo.....	78
3.6.4 Correção do k_{La} e do QO_2 em função da constante de atraso	79
3.6.5 Velocidade específica de consumo de oxigênio para a manutenção e fator de conversão de oxigênio para células.....	80
3.7 Extração e caracterização.....	80
3.7.1 Extração de P(3HB-co-3HV).....	80
3.7.2 Determinação da porcentagem de pureza e de recuperação de P(3HB-co-3HV).....	82
3.7.3 Caracterização de P(3HB-co-3HV).....	83
3.8 Tratamento de dados	84
3.8.1 Ajuste dos dados experimentais	84
3.8.2 Análise cinética.....	84
3.8.3 Fatores de conversão.....	84
3.8.4 Produtividade média de P(3HB-co-3HV)	85
3.8.5 Produtividade de P(3HB-co-3HV) na fase de produção	85
3.9 Modelagem do crescimento microbiano	86
3.9.1 Modelos Primários	86
3.10 Análises Estatísticas.....	89

CAPÍTULO IV

4 Resultados e discussão	91
4.1 Produção de P(3HB-co-3HV) por <i>Cupriavidus necator</i> utilizando glicose como fonte de carbono.....	91

4.1.1 Identificação da fase de produção de P(3HB-co-3HV) por Cupriavidus necator	91
4.1.2 Características gerais da fase de crescimento e de produção de P(3HB-co-3HV) por Cupriavidus necator a partir de meio sintético (glicose) como fonte de carbono.....	95
4.2 Produção de poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) em melão cítrico	102
4.2.1 Estudo de pré-tratamentos necessários para utilização do melão como substrato	102
4.2.2 Uso de melão cítrico ultrafiltrado como fonte de carbono	105
4.3 Transferência de oxigênio	122
4.3.1 Constante de atraso (k_p) do oxigênio dissolvido	122
4.3.2 Correção do k_La em função do atraso na resposta do eletrodo..	125
4.3.3 Determinação do k_La e do QO_2X durante o cultivo.....	127
4.3.4 Correção do k_La e do QO_2 em função do atraso na resposta do eletrodo	129
4.3.5 Características gerais dos dados de k_La e QO_2 durante o cultivo	131
4.3.6 Velocidade específica de consumo de O_2 para a manutenção celular e fator de correção de oxigênio em células	133
4.4 Modelagem Matemática.....	135
4.4.1 Modelagem do crescimento de Cupriavidus necator em meio sintético (glicose) e melão cítrico para produção de P(3HB-co-3HV)	135
4.4.1.1 Avaliação e Modelagem do crescimento de Cupriavidus necator	136
4.4.2 Utilização do modelo de Gompertz Modificado para prever o momento da limitação da cultura.....	142
4.5 Extração e Caracterização do P(3HB-co-3HV)	145
4.5.1 Caracterização dos filmes	148

CAPÍTULO V

5 CONCLUSÕES E SUGESTÃO.....	155
REFERÊNCIAS	158
ANEXOS	178
Anexo A	179
Anexo B.....	189
Anexo C.....	193

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

Os plásticos são polímeros geralmente de origem petroquímica, que, devido à sua estrutura química, não sofrem alterações moleculares durante aquecimento, podendo ser novamente fundidos após o resfriamento. A sua estrutura pode ainda ser manipulada, e, sendo facilmente moldáveis, podem ser obtidos com diferentes formas e resistências. Eles têm massa molar elevada, variando entre 10^4 e 10^6 g.mol⁻¹, possuem alta resistência química e boa resistência mecânica, são impermeáveis e podem ser transparentes, ou coloridos. Essas características, associadas ao seu baixo custo de produção, tornaram os plásticos altamente difundidos em todo o mundo, encontrando aplicações nos mais variados setores (PLASTIVIDA, 2005; REDDY *et al.*, 2003).

Variadas aplicações acarretaram uma grande produtividade deste insumo, conduzindo a uma enorme geração de resíduos sólidos. Sabendo que a maior porcentagem desse material é descartável e apresenta grande dificuldade de degradação no meio ambiente, o problema com este lixo gera proporções cada vez maiores. Dessa forma, é desnecessário salientar os enormes problemas ambientais e de logística que as alternativas atuais de incineração, aterramento e reciclagem destes polímeros têm causado às sociedades desenvolvidas e em desenvolvimento (SILVA, 2007).

Como resposta a uma crescente preocupação com os problemas ambientais causados pela produção e acúmulo de materiais plásticos de origem petroquímica, e, além disso, o esgotamento das fontes de combustíveis fósseis e a própria estagnação no ritmo de inovações em polímeros sintéticos nos últimos vinte anos, muitos países estão realizando estudos de gerenciamento e diminuição do volume de lixo sólido, bem como, buscando a produção de materiais plásticos biodegradáveis, a partir de fontes renováveis de carbono. Contudo, estes novos materiais plásticos devem possuir as propriedades desejáveis dos plásticos convencionais e ainda serem completa e rapidamente biodegradados quando descartados no meio ambiente (LEE, 1996b, BASTOS, 2007).

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são os únicos polímeros totalmente biodegradáveis, de origem microbiana. Eles são sintetizados por diversos microrganismos, como polímeros de reserva de carbono e

energia, possuindo, após extração, propriedades semelhantes aos plásticos de origem petroquímica, como o polipropileno. São acumulados na forma de grânulos no interior das células, os quais podem representar até 80% de sua massa seca. Sua estrutura depende do meio de crescimento e do microrganismo produtor, podendo ser planejada, de acordo com as condições de cultivo microbiano empregadas, para fornecer ao polímero as características que se deseja. Com boas propriedades, facilmente moldável e insolúvel, se apresentam como um substituinte à altura para os plásticos petroquímicos (HOLMES, 1985; LEE, 1996a; RAMSAY, 1994; BASTOS, 2007).

Dentre os PHAs mais estudados, destacam-se o poli-3-hidroxi-butarato (P(3HB)) e seu copolímero poli(3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato) (P(3HB-co-3HV)). O segundo apresenta características mais atrativas em relação ao primeiro em virtude da incorporação de unidades de 3-hidroxi-valerato em sua molécula. Estas unidades conferem ao copolímero maior elasticidade e provocam alterações de parâmetros como níveis de cristalinidade e ponto de fusão, acarretando uma diminuição da rigidez do polímero e aumentando à resistência ao impacto, tornando-o mais interessante industrialmente (HOLMES, 1985).

Muitos são os microrganismos produtores de PHAs e a espécie *Cupriavidus necator* é uma das que apresenta condições mais favoráveis à produção industrial. Este microrganismo se destaca pela possibilidade de acumular mais de 80% de sua massa seca em polímero, com alta massa molar e utilizando diferentes fontes de substrato, como glicose, frutose, entre outros (RAMSAY, 1994).

As aplicações destes poliésteres são bastante amplas, não se restringindo apenas à utilização como polímero convencional. Além da característica de minimização de despejos industriais, os PHAs são materiais por excelência biocompatíveis. A sua biocompatibilidade e sua baixa dissolução em ambientes biológicos os tornam úteis na medicina, na fabricação de materiais de sutura e próteses ósseas, não provocando resposta imunológica (reações inflamatórias). Podem ainda ser utilizados na indústria farmacêutica (na produção de cápsulas para liberação controlada de fármacos) e na indústria alimentícia (embalagens ativas) (BYROM, 1990; STEINBUCHER e FUNCHTEBBUSCH, 1998).

Apesar desta grande possibilidade de aplicações, esta substituição ainda não é viável, devido ao preço dos polihidroxi-alcanoatos não ser competitivo, quando comparado ao dos plásticos petroquímicos (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997; COUTINHO *et al.*, 2004). O custo

para produção de PHAs é em torno de US\$ 4/kg, frente aos polímeros sintéticos, como o polipropileno, a US\$ 1/kg, mas há estimativas de redução para US\$ 2,65/kg, em planta com capacidade de 100 mil t/a (BASTOS, 2007).

Dois componentes são preponderantes na determinação do preço dos polímeros produzidos a partir de matéria-prima renovável e são imperativos para garantir uma competição com polímeros de origem petroquímica: custo da matéria-prima e energia, bem como de investimento de capital para implantação de uma unidade industrial de produção. Na questão do custo da matéria-prima e energia é amplamente reconhecida a vantagem competitiva do nosso país devido às suas condições climáticas favoráveis e grande extensão territorial (potencial de produzir biomassa). Resta, portanto, converter estas vantagens em processos de alto desempenho e economicamente diferenciados, porque o processo de produção utiliza nutrientes relativamente caros, em adição a outros fatores que também influem no custo do produto, como nível de acúmulo do polímero nas células, produtividade e eficiência de extração (SILVA, 2007).

Na tentativa de viabilizar o processo de produção de PHAs, diversas estratégias têm sido testadas com o objetivo de aumentar a produtividade do polímero e diminuir custos. Entre elas, destacam-se as modificações genéticas em bactérias, capacitadas a acumular altos níveis de polímero no seu citoplasma, e o emprego de fontes de nutrientes derivados da agroindústria, na sua maioria resíduos de beneficiamento e técnicas mais eficientes para extração e recuperação (GOMES e BUENO NETO, 1997).

A utilização de substratos de baixo custo pode apresentar cerca de 40% de economia no processo de produção de PHAs (KIM, 2000). Dentre os substratos de baixo custo disponíveis, o melão cítrico, subproduto da indústria processadora de suco de laranja, apresenta-se como uma fonte de carbono atrativa para produção de PHAs em virtude do seu alto conteúdo de açúcares e da sua suscetibilidade a hidrólises enzimáticas ou processos fermentativos (ROUMBOUTS & PILNIK, 1978 e GROMANN *et al.*, 1994).

O **objetivo** geral deste trabalho foi desenvolver estratégias de produção de poli(3-hidroxi butirato-*co*-3-hidroxi valerato) por *Cupriavidus necator* a partir de melão cítrico, e, assim fornecer uma opção interessante de aumento de valor agregado à indústria geradora deste resíduo e, conseqüentemente, reduzir o custos de produção do polímero.

Os objetivos específicos são:

- Estudar as condições de crescimento e produção de P(3HB-co-3HV) a partir de *C. necator* em meio sintético (glicose) para verificar o comportamento do microrganismo neste substrato para posterior comparação as condições de crescimento e produção em melão cítrico;
- Avaliar a capacidade de crescimento e produção de P(3HB-co-3HV) por *C. necator* em melão cítrico como substrato;
- Estudar a influência de estratégia de alimentação de nitrogênio durante a fase de produção, com a finalidade de melhorar a composição molar do copolímero e aumentar a produtividade do processo;
- Estudar a transferência de oxigênio durante o cultivo;
- 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;
- Caracterizar os polímeros produzidos em glicose e em melão cítrico e compará-los com o polímero obtido comercialmente.

Este trabalho está estruturado em diferentes capítulos. O Capítulo II apresenta uma revisão da literatura sobre os diferentes assuntos abordados na pesquisa. No Capítulo III são apresentados os materiais e métodos utilizados neste estudo. Os resultados e discussão estão 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 bibliográficas consultadas.

CAPÍTULO II

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Polihidroxicanoatos

2.1.1 Histórico dos polihidroxicanoatos

PHAs são estocados na forma de grânulos no interior dos microrganismos. A observação desta inclusão nas células bacterianas remonta à Beijerinck em 1888, mas o reconhecimento e a primeira determinação da composição dos grânulos de PHAs, só foi identificada por Lemoigne em 1927, no Instituto Pauster, que verificou que em *Bacillus megaterium* a degradação anaeróbica de um material desconhecido, levava à excreção de ácido 3-hidroxi-butírico (VOLOVA, 2004). Lemoigne identificou esse material como um homopolíéster de hidroxiácido, 3-hidroxi-butirato ou poli(3-hidroxi-butirato) (P(3HB)) (BRAUNEGG *et al.*, 1998).

Em 1958, foi proposto o papel funcional do P(3HB) por Macrae e Wilkinson, que observaram que *B. megaterium* estocava o homopolímero especialmente quando a razão de C/N no meio estava alta, e que a consequente degradação ocorria rapidamente na ausência de carbono e energia (MACRAE e WILKINSON, 1958; BRAUNEGG *et al.*, 1998). No início da década de 60, o interesse por estes materiais cresceu fortemente devido à descoberta de que possuíam propriedades termoplásticas (BAPTIST, 1962a; 1962b). Esta descoberta levou ao primeiro empreendimento para a produção comercial de P(3HB) pela empresa W.R. Grace Co. nos Estados Unidos. Porém, baixas produtividades, altos custos com solventes utilizados na extração, e a contaminação do polímero por resíduos celulares minaram o processo (MACRAE e WILKINSON, 1958; HOLMES, 1985; BRAUNEGG *et al.*, 1998; VOLOVA, 2004; SURIYAMONGKOL *et al.*, 2007).

A crise do petróleo em 1973 e os subseqüentes acréscimos no preço do produto, bem como por ser uma fonte de energia não-renovável, gerou dúvidas no futuro da indústria polimérica baseada no petróleo e incentivou as pesquisas para produção de materiais plásticos alternativos (VOLOVA, 2004). A partir de 1974, Wallen and Rohwedder reportaram a identificação de hidroxicanoatos (HA) além do 3-hidroxi-butirato (3HB), entre eles 3-hidroxi-valerato (3HV), 3-

hidroxihexanoato (3HHx), 3-hidroxiheptanoato (3HHp), 3-hidroxi octanoato (3HO), entre outros. A identificação dessas outras unidades HA gerou um impulso nas investigações e foi destacada com marco do início da segunda fase de investigação sobre PHAs. Na década de 70, a Imperial Chemical Industries (ICI) patenteou um processo de produção do copolímero P(3HB-co-3HV), batizado de BIOPOL®, utilizando *C. necator* a partir de fontes renováveis (KING, 1982; VOLOVA, 2004). Porém, com o fim da crise do petróleo, o projeto foi abandonado. Em 1990, foi lançado na Alemanha, o primeiro produto a partir de PHA, uma embalagem de “shampoo” de uma indústria de cosméticos (HOWELLS, 1982; VOLOVA, 2004).

Em 1996, a empresa Monsanto adquiriu o processo de produção do P(3HB-co-3HV), vendido sobre o nome de BIOPOL, da Zeneca BioProducts, da Inglaterra, empresa resultante da divisão parcial da ICI em 1993 (BRAUNEGG *et al.*, 1998, VOLOVA, 2004). O custo do primeiro lote comercializado pela BIOPOL foi de US\$ 16/kg, comparado ao preço de US\$ 1/kg dos polímeros derivados do petróleo. Entretanto, em vista do alto custo de produção, e resolvendo manter seu foco em aplicação da biotecnologia para a agricultura, a Monsanto parou a produção do copolímero em 1998. Em maio de 2001, a Metabolix, Inc. comprou o processo de fabricação do BIOPOL da Monsanto, reiniciando sua produção (METABOLIX, 2001; VOLOVA 2004).

No Brasil, a partir de 1991, começaram as pesquisas para produção de P(3HB) por via fermentativa. Em 1998, iniciou-se a operação de uma planta piloto de produção de P(3HB) na Usina da Pedra (Serrana – SP), decorrente de uma parceria do IPT-Copersucar-ICB/USP. Em 2000, teve início à produção de P(3HB) pela indústria brasileira PHB industrial SA. Essa é a única produção industrial de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) a partir de cana-de-açúcar, utilizando produção integrada em usina sucroalcooleira. A resina, comercialmente conhecida como Bio Cycle, está sendo produzida em escala-piloto e destinada a universidades, empresas e centros de pesquisa e desenvolvimento. Os custos de produção da PHB industrial são os menores do mundo. Enquanto na Europa o polímero é produzido a US\$ 15-20 /kg, no Brasil esses custos são inferiores a US\$ 2,5/kg, porém ainda cerca de 4 vezes o custo dos polímeros convencionais, os quais custam de US\$ 0,50-1,20/kg (SANTOS, 2002; VIVEIROS, 2003; SUCRE-ETHIQUE, 2008).

O terceiro estágio do desenvolvimento de pesquisas sobre PHAs envolve a clonagem e a caracterização dos genes envolvidos na biossíntese dos polímeros. O início das pesquisas na área de biologia

molecular no final dos anos 70 forneceu novas ferramentas para a investigação biológica, as quais foram utilizadas com sucesso para decifrar as informações genéticas e compreender então a biossíntese do polímero. Até o final da década de 80, os genes que codificam as enzimas envolvidas na biossíntese de PHAs, a partir de *C. necator*, foram clonados mostrando-se funcionalmente ativos em *Escherichia coli* (LEE e CHANG, 1995; LEE, 1996a; SUDESH 2000).

2.1.2 Descrição e propriedades dos PHAs

Os PHAs constituem uma classe geral de polímeros microbianos sendo que o mais estudado é o P(3HB) (DOI, 1990). 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).

Os grânulos típicos de P(3HB) são geralmente inclusões discretas, esféricas, com diâmetro médio de 0,2 a 0,7 μm localizados no citoplasma das células e visíveis em microscópio óptico por contraste de fase, devido à sua alta refratividade (YOO *et al.*, 1997; KIM e LENZ, 2001; KHANNA, 2004). Além de P(3HB), estes grânulos são circundados por uma membrana composta por cerca de 2% (em massa) de proteínas e 0,5% de lipídios cuja espessura é de 2 nm. Assume-se que os lipídeos estão localizados no centro do grânulo, formando uma membrana interna, enquanto que as proteínas envolvidas no metabolismo dos PHAs (STEINBÜCHEL, 1991a; YOO *et al.*, 1997).

2.1.2.1 Estrutura química

Os PHAs são uma família de homo ou heteropolíesteres biológicos, opticamente ativos, que contém unidades do monômero ácido (R)-hidroxialcanóico, variáveis, determinantes de sua estrutura e propriedades (SUDESH *et al.*, 2000). A estrutura geral dos PHAs é mostrada na Figura 2.1. A natureza do radical R determina a identidade da unidade monomérica e, junto com o valor de x (que pode variar de 600 a 35000), as propriedades do polímero. Mais de 100 unidades monoméricas já foram identificadas como constituintes destes

poliésteres (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995; REDDY *et al.*, 2003).



R = hidrogênio Poli(3-hidroxiopropionato)

R = metil Poli(3-hidroxi butirato)

R = etil Poli(3-hidroxi valerato)

R = propil Poli(3-hidroxi hexanoato)

R = pentil Poli(3-hidroxi octanoato)

R = nonil Poli(3-hidroxi dodecanoato)

Figura 2. 1 - Estrutura geral dos PHAs

O poli-3-hidroxi butirato (P(3HB)) é o polihidroxi alcenoato mais estudado e caracterizado, porém algumas unidades monoméricas compostas por 4-hidroxi butirato e 5-hidroxi valerato também já foram observadas (DOI *et al.*, 1988; MADISON e HUISMAN, 1999; REDDY, 2003). Os copolímeros de P(3HB) podem ser formados através da alimentação de co-substratos resultando na formação de polímeros contendo monômeros formados de 3-hidroxi valerato (3HV) ou 4-hidroxi valerato (4HV). A incorporação de unidades 3HV no polímero resulta no copolímero poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) [P(3HB-co-3HV)] que o torna menos rígido e mais flexível que o P(3HB) (REDDY, 2003).

A variação do comprimento e composição das cadeias é a base da diversidade de polímeros da família de PHAs e de seu vasto potencial de aplicação. Dependendo do número de átomos de carbono presentes na cadeia do monômero, os PHAs podem ser divididos em três grupos: cadeia curta, formado essencialmente por polímeros constituídos de unidades monoméricas compostas por 3 a 5 átomos de carbono; cadeia média, formada por polímeros com unidades monoméricas compostas por 6 a 14 átomos de carbono; e cadeia longa, apresentado mais de 14 átomos carbono (RAMSAY, 1994; LEE, 1996a).

Além da classificação em relação ao comprimento da cadeia, os PHAs podem ser classificados, de acordo com a composição de monômeros na cadeia, em: homopolímeros, apresentando somente um tipo de monômero; e copolímeros, apresentando dois ou mais tipos de

monômero. A principal diferença entre estes polímeros de diferentes comprimentos de cadeia está nas propriedades físicas que delimitam suas aplicações.

2.1.2.2 Propriedades físicas

Os PHAs têm um alto grau de polimerização, confirmado pelas altas massas molares, sendo que com o aumento do comprimento da cadeia, ou aumento do número de monômeros no copolímero sua elasticidade aumenta (REDDY, 2003; KHANNA, 2004). Estes polímeros bacterianos apresentam massa molecular suficientemente alta que proporciona ao polímero características poliméricas similares aos plásticos convencionais, como o polipropileno (MADISON e HUISMAN, 1998; REDDY, 2003). A massa molecular destes compostos varia de 2×10^3 a 3×10^6 g.mol⁻¹, dependendo do microrganismo produtor e das condições de crescimento (KIM *et al.*, 1992a; MADISON e HUISMAN, 1999; KHANNA, 2004).

Os PHAs são considerados altamente cristalinos, com um grau de cristalinidade variando entre 55 a 80%, sendo que a fragilidade do polímero aumenta com o grau de cristalinidade (STEINBÜCHEL, 1996; MADISON, 1999; KHANNA, 2005). Propriedades físicas e mecânicas, como rigidez, ductilidade, ponto de fusão, temperatura de transição vítrea e resistência a solventes orgânicos variam consideravelmente, em função da composição monomérica e da sua aplicabilidade, variando do fortemente cristalino ao elástico (KHANNA, 2004). A temperatura de fusão (T_m) e a temperatura de transição vítrea (T_g) estão intimamente relacionadas à estrutura dos monômeros e à quantidade de comonômeros, em copolímeros e aumentam com o aumento da massa molar (MM), para aqueles com baixa MM; porém, este comportamento é invertido, no caso daqueles com alta MM (BRANDL, 1990, STEINBÜCHEL, 1996).

Como o P(3HB) é o polímero mais amplamente estudado, as propriedades dos demais PHAs têm sido explicadas levando em consideração suas propriedades (KHANNA, 2004). O P(3HB) apresenta resistência aos raios ultravioleta (UV) superior ao polipropileno e apresenta excelente impermeabilidade ao O₂ e à água, tornando-se adequado para o uso na confecção de embalagens alimentícias (HOLMES, 1985; WEINER, 1997; GROTHE *et al.*, 1999).

O ponto de fusão do P(3HB) é próximo da temperatura na qual se inicia sua degradação, aproximadamente 180°C, dificultando os

processos de modelagem por injeção ou sopro (POIRIER *et al.*, 1995). As propriedades mecânicas como módulo de Young e tensão de cisalhamento são semelhantes às do polipropileno, no entanto sua resistência à ruptura (5%) é nitidamente inferior à do polipropileno (400%). Assim, o P(3HB) é um material mais rígido que se torna frágil quando estocado por um período de vários dias sob condições ambientes, podendo limitar sua aplicabilidade (HOLMES 1985; LEE, 1996a, KHANNA, 2004). No entanto, a incorporação de unidades 3HV ao P(3HB) diminui os níveis de cristalinidade e o ponto de fusão do polímero. Isto acarreta na diminuição da rigidez assim como um aumento da resistência ao impacto. Além disso, o decréscimo da temperatura de fusão com aumento da fração de 3HV, sem afetar a temperatura de degradação, permite melhor processamento térmico do copolímero. A capacidade de alongamento até a ruptura também aumenta com a incorporação de unidades 3HV. Assim, as propriedades do polímero podem ser controladas pelo ajuste da fração HV durante o cultivo. Uma porcentagem de 3HV em torno 17 a 20 mol% permite a obtenção de um copolímero com propriedades mais desejáveis, em particular sua flexibilidade e resistência ao impacto (HOLMES, 1985; LEE 1996a, KHANNA, 2004). A Tabela 2.1 apresenta uma comparação entre as propriedades físicas de diferentes PHAs.

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); (Khanna, 2004).

2.1.2.3 Biodegradabilidade

Uma importante característica que torna os PHAs atrativos comercialmente é sua biodegradabilidade em ambientes naturais, determinada pela atividade enzimática dos microrganismos presentes (ANDERSON e DAWES, 1990; KHANNA e SRIVASTAVA, 2004). A biodegradabilidade é a capacidade de decomposição de materiais, especialmente em produtos inócuos, pela ação de 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, MADISON e

HUISMAN, 1999, KHANNA e SRIVASTAVA, 2004). Os microrganismos envolvidos neste processo encontram-se presentes no solo, esgotos, água do mar, lagos e ar. Eles são capazes de degradar o PHA excretando enzimas extracelulares, como as PHAs depolimerases e PHAs hidrolases. A atividade destas enzimas pode variar e depende da composição do polímero, sua forma física (amorfa ou cristalina), das dimensões das amostras e das condições ambientais (BRAUNEGG *et al.*, 1998, MADISON e HUISMAN, 1999, SUDESH, 2000). Eles catalisam a quebra do polímero em compostos solúveis em água, que podem ser aproveitados como nutrientes pelas células. Além disso, os PHAs também podem ser degradados na ausência de atividade microbiana, por um mecanismo de hidrólise química, especialmente em altos valores de pH (SUDESH, 2000; KHANNA e SRIVASTAVA, 2004).

PHAs são degradados em sistemas biológicos tanto aeróbicos como anaeróbicos, sendo que a degradação ocorre mais rapidamente em despejos anaeróbicos e mais lentamente no mar. Podem ser completamente degradados a CO₂ e água (e metano sob condições anaeróbicas) pelos microrganismos no ambiente, sendo facilmente degradado no solo. Durante o processo de degradação, não há produção de intermediários nocivos (LUZIER, 1992; GROTHE *et al.*, 1999). A Tabela 2.2 apresenta a taxa de degradação de um filme de 1 mm de P(3HB-*co*-3HV) em diferentes ambientes.

Tabela 2. 2 - Biodegradação de um filme de 1 mm de P(3HB-*co*-3HV) em diferentes ambientes

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

Fonte: (LUZIER, 1992)

A taxa de degradação dos PHAs é função de vários fatores, relacionados ao ambiente, como população microbiana presente, temperatura, umidade, pH, nutrientes presentes no meio, e outros

relacionados ao próprio PHA, como composição, cristalinidade, aditivos e área superficial dos polímeros. O tamanho da cadeia polimérica também influencia, diminuindo a taxa de degradação e dificultando o crescimento microbiano devido ao aumento da sua hidrofobicidade (ANDERSON e DAWES, 1990; SUDESH, 2000; ASRAR e HILL, 2002; KHANNA e SRIVASTAVA, 2004). A degradação microbiana de PHAs no solo é aumentada com o aumento da temperatura e o copolímero P(3HB-co-3HV) tende a se degradar mais rapidamente do que o homopolímero P(3HB). Os microrganismos presentes no solo e que degradam os PHAs compreendem bactérias Gram-negativas, bacillus Gram-positivos, estreptomicetos e bolores (MERGAERT *et al.*, 1993).

A Figura 2.2 representa o biociclo completo de produção e degradação de PHAs. Neste ciclo através da fotossíntese, as plantas utilizam a luz solar, CO₂ 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 que será purificado e processado formando os mais diversos artigos plásticos (3-6). Após seu uso, os PHAs podem ser depositados em ambientes microbianos ativos e a biodegradação deste polímero formará CO₂ e água (7-8). Uma rota direta através de plantas que produzem PHAs pode ser obtida (9).

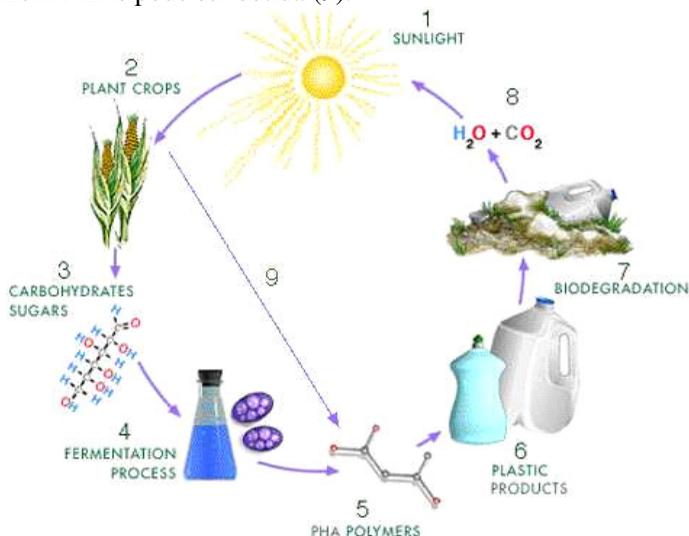


Figura 2.2 - Biociclo dos polihidroxicarboxilatos

Fonte: (METABOLIX, 2004).

2.1.3 Aplicações

Os PHAs são considerados de grande interesse industrial, como plásticos biodegradáveis e/ou biocompatíveis, para diversas áreas de aplicação (LEE, 1996a). O plástico biodegradável deve complementar o plástico petroquímico, conquistando espaços específicos onde suas características de pureza e biodegradabilidade sejam necessárias (ROSSEL, 2002). Polímeros como P(3HB) e P(3HB-co-3HV) podem ser processados em equipamentos convencionais, usados para poliolefinas e outros plásticos. Assim, através de técnicas de extrusão, injeção, moldagem ou sopro, eles podem ser transformados em diferentes materiais, com uma ampla gama de aplicações.

Devido às suas características como material polimérico, os PHAs apresentam uma ampla variedade de aplicações. Inicialmente, foram usados como filmes plásticos, principalmente na fabricação de sacolas, garrafas, utensílios e sacos de proteção para plantas. Além destas utilizações, filmes de PHAs podem ser aplicados em papel ou papelão formando uma película impermeável para 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, REDDY, 2003). Aplicações similares aos produtos plásticos convencionais incluem a fabricação de itens descartáveis, como cabos de lâminas para barbear, fraldas, produtos de higiene femininos, embalagens para cosméticos (shampoo) e copos descartáveis (REDDY, 2004; KHANNA, 2004).

Em adição ao seu potencial como material plástico, os PHAs também são utilizados na área médico-farmacêutica por serem atóxicos e biocompatíveis. São encontrados como compostos estéreo-regulares, os quais servem como precursores quirais para síntese química de compostos opticamente ativos. Estes compostos são particularmente usados como carregadores biodegradáveis para dosagem de drogas por longos períodos de tempo, encapsulamento de fármacos, hormônios, inseticidas e herbicidas. Eles também são usados como materiais osteosintéticos (estimulando o crescimento ósseo), suturas cirúrgicas, enxertos cardiovasculares, projetos de regeneração e reparo de tecidos. No entanto, as aplicações médicas e farmacêuticas são limitadas devido a sua lenta degradabilidade e alta estabilidade à hidrólise em tecidos estéreis (SENIOR & DAWES, 1973; WILLIAMS *et al.*, 1999; ASRAR e HILL, 2000; REDDY, 2003; KHANNA, 2004, CHEN e WU, 2005).

2.2 Microrganismos Produtores

Os microrganismos capazes de acumular PHAs são geralmente as bactérias Gram positivas, Gram negativas e cianobactérias (BYROM, 1987), que podem ser encontradas na natureza, ou seja, no solo, na água do mar, em efluentes, etc. Apesar de terem sido descritos na literatura mais de 300 tipos diferentes de bactérias, capazes de sintetizar PHAs (ANDERSON e DAWES, 1990; STEINBUCHER e VALENTIN, 1995; BRAUNEGG *et al.*, 1998; MADISON e HUISMAN, 1999) apenas algumas estão sendo empregadas na produção industrial. Estas bactérias estão divididas em dois grupos, baseado nas condições de cultivos requeridas para produção. O primeiro grupo de bactérias requer excesso de carbono e limitação de algum dos nutrientes (nitrogênio, fósforo, magnésio, potássio, oxigênio ou enxofre) para a produção de PHAs. Fazem parte deste grupo *Cupriavidus necator*, *Protomonas extorquens*, *Pseudomonas oleovorans*, entre outras. O segundo grupo não requer limitação de nutriente e acumula PHA já durante a fase de crescimento. Tem-se como exemplo: *Escherichia coli* recombinante, cepa mutante de *Azotobacter vinelandii* e *Alcaligenes latus* (LEE, 1996a).

2.2.1 Microrganismos normalmente produtores de PHA

A facilidade do uso de metanol como fonte de substrato de baixo custo para produção de PHA foi demonstrada em bactérias do gênero metilotróficas: *Protomonas*, *Methylobacterium*, linhagens mutantes de *Cupriavidus necator* e *Pseudomonas denitrificantes*. No entanto, investigações detalhadas mostraram que a produção de PHA era muito baixa (50 -60% da biomassa seca) e a síntese do polímero obtido apresentava baixo peso molecular ($4 \times 10^4 - 6 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$). Além disso, a necessidade de utilização de elevadas quantidades de substrato para formação do polímero ($Y_{P(3HB)/S} = 0,18 - 0,20 \text{ g.g}^{-1}$) levaram à procura de outros microrganismos (BYROM, 1987; LEE, 1996a; VOLOVA, 2004).

O segundo microrganismo a ser selecionado para a produção industrial de PHAs foi *Azotobacter* sp., em virtude da sua capacidade de utilizar sacarose e glicose como fonte de substrato. No entanto, a instabilidade do processo e a síntese de polissacarídeos, paralelamente à produção de P(3HB), levaram à rejeição desta bactéria para produção industrial (BYROM, 1987). Na tentativa de melhorar as condições de produção, Page e Knops (1989) estudaram uma cepa mutante de

Azotobacter vinelandii capaz de sintetizar P(3HB) a partir de fontes baratas de substrato, os quais poderiam reduzir à metade os custos de produção, e a adição de propionato induzindo ao acúmulo de P(3HB-co-3HV) (PAGE e KNOSP, 1989). No entanto, é a produtividade obtida é ainda inferior ($1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) quando comparada à produtividade obtida por *C. necator* ($2,4 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (KIM, 1994; RYU, 1997; VOLOVA, 2004).

O terceiro microrganismo estudado, o qual despertou interesse da ICI's, foi a cepa *Cupriavidus necator*, capaz de sintetizar polímeros com elevado peso molecular e em grandes quantidades (acima de 80% de sua biomassa seca), podendo utilizar diferentes substratos com elevada velocidade específica de crescimento (BYRON, 1987; CHEN *et al.*, 1991; BRAUNEGG, 1998). Quando ácido propiônico é adicionado no meio *C. necator* sintetiza o copolímero P(3HB-co-3HV), sendo que a proporção das unidades 3HV dependerá da razão de alimentação de ácido propiônico/glicose, durante a fase de acúmulo do polímero (ANDERSON e DAWES, 1990).

Alcaligenes latus é um gênero de bactéria que produz P(3HB) concomitantemente com o crescimento exponencial. É capaz de utilizar diferentes substratos, como sacarose e resíduos industriais, com uma velocidade específica de crescimento elevada (CHEN *et al.*, 1991; BRAUNEGG *et al.*, 1995). Além do P(3HB), *A. latus* também pode sintetizar P(3HB-co-3HV). No entanto, o conteúdo de PHA não é elevado (aproximadamente 50%) (RAMSAY *et al.*, 1990, CHEN *et al.*, 1991; YAMENE *et al.*, 1996) e apresenta baixo rendimento de substrato em produto, sendo sensível aos precursores utilizados para a produção do copolímero (RAMSAY *et al.*, 1990).

P. oleovorans tem sido empregada para a produção de polímeros com diferentes composições, tanto PHAs de cadeia lateral média (PHA_{MSC}) quanto de cadeia lateral longa (PHA_{LSC}) (De SMET *et al.*, 1983; FULLER *et al.*, 1988; PREUSTING *et al.*, 1991; LEE, 1996b). Esta produção é obtida a partir de substratos de cadeia de carbono alifática longa, como de n-alcenos, alcanóis ou alcanosatos de cadeia médias, entretanto, melhoramentos são necessários para que a produção desses polímeros seja economicamente viável. Como é uma cepa estável, de difícil contaminação, o cultivo contínuo pode ser boa estratégia para a produção de PHA_{MSC}, com alta produtividade (LEE, 1996a). Apesar de *P. oleovorans* não ser capaz de utilizar glicose e outros açúcares, outras pseudomonas como *P. putida* e *P. aeruginosa* o fazem. Os PHAs, formados de gluconato e outros açúcares, têm composição diferente dos formados a partir de ácidos graxos, prevalecendo nos primeiros o 3-hidroxicanoato e pequenas parcelas

de monômeros insaturados, enquanto que nos últimos, prevalece como maior constituinte o 3-hidroxiocetanoato (HAYWOOD *et al.*, 1990; HUIJBERTS *et al.*, 1992; TIM e STEINBÜCHEL, 1990).

O gênero *Burkholderia* está sendo estudado para produção de PHAs. Este microrganismo foi isolado do solo e pode acumular PHAs contendo unidades 3HB e 3HB-4-ácido pentenóico (3HPE), a partir de fontes simples de carbono como sacarose ou gluconato (RODRIGUES *et al.*, 2000). Uma das linhagens isoladas, a *Burkholderia* sp. IPT 101 apresenta boa produção do copolímero P(3HB-co-3HV), entretanto, com baixa conversão de ácido propiônico em unidades 3HV (GOMEZ *et al.*, 1996). 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 deste ácido.

2.2.2 Microrganismos recombinantes

Técnicas de DNA recombinante podem ser utilizadas para modificar ou introduzir novos caminhos metabólicos no desenvolvimento de novas linhagens de microrganismos que apresentem características importantes na produção de PHAs, como alta eficiência na conversão dos substratos em produtos, utilização de substratos mais baratos, alta produtividade e conteúdo de PHAs, deve proporcionar redução dos custos de produção do polímero (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997; CHOI e LEEa, 1999; LEE, 1996a).

A análise da estrutura dos genes das enzimas que codificam a biossíntese do P(3HB), a *phbA* (para β -cetotiolase), a *phbB* (NADPH-dependente acetoacetil-CoA redutase) e a *phbC* (PHB sintetase) a partir de acetil-CoA, são agregados e devidamente organizados em um único opéron *phbCAB* (SCHUBERT *et al.*, 1991; MADISON e HUISMAN, 1999).

Bactérias como *E. coli* não têm capacidade de sintetizar ou degradar PHA, entretanto, crescem rapidamente, a uma temperatura um pouco mais alta e sofrem fácil lise. O crescimento rápido possibilita o acúmulo de uma grande quantidade de polímero, diminui o tempo do processo de produção e a facilidade de lise das células economiza no processo de purificação dos grânulos de PHA (MADISON e HUISMAN, 1999; REDDY *et al.* 2003). A transferência de plasmídeos contendo o opéron *phbCAB* de *C. necator* confere às linhagens

recombinantes de *E. coli* a capacidade de sintetizar e acumular P(3HB) (SCHUBERT *et al.*, 1991; LEE, 1994). O acúmulo nesse microrganismo pode chegar a 80-90% do peso seco da célula, com alta produtividade. Sua síntese não requer limitação de um nutriente, mas é dependente da quantidade de acetil-CoA disponível (LEE, 1996a).

A produção de P(3HB-*co*-3HV) por *E. coli* recombinante é observada quando são utilizadas como fonte de substrato glicose e propionato. No entanto, apenas P(3HB) é produzido quando é administrado glicose e valerato (YIM *et al.*, 1996). A principal dificuldade na utilização de *E. coli* recombinante está na grande demanda de oxigênio requerida durante a alta densidade celular (LEE, 1996a). Outra desvantagem é a formação de filamentos, durante a síntese do polímero, causando redução na velocidade de crescimento celular e menor atividade metabólica gerando, conseqüentemente, menor acúmulo de polímero (LEE *et al.*, 1994). Contudo, um baixo custo requerido nos processos de recuperação pode compensar os elevados custos de produção (LEE e CHANG, 1995).

A cepa selvagem, *C. necator* H16, não utiliza glicose nem sacarose como fontes de carbono. A cepa utilizada na produção industrial de P(3HB) e P(3HB-*co*-3HV) é a mutante *C. necator* DSM 545, com habilidade de consumir glicose (RAMSAY *et al.*, 1990; MADISON e HUISMAN, 1999). Outra mutante de *C. necator* é *C. necator* 290/sac, construída a partir da DSM 545, porém com capacidade para consumir sacarose (FAVA, 1997). Para aumentar a eficiência de conversão do ácido propiônico em unidades 3HV, foram obtidas cepas mutantes incapazes de utilizar o ácido propiônico para crescimento celular. Nesse caso, estão a *C. necator* BK 23 (LEE *et al.*, 1996b) e o clone mutante *C. necator* UV1 (SARTORI, 1998), ambas derivadas de mutantes capazes de utilizar glicose como fonte de carbono.

2.2.3 Plantas transgênicas

A clonagem e expressão dos genes de biossíntese de PHAs de microrganismos em plantas superiores podem se constituir em uma importante forma de redução dos custos de produção de PHAs, uma vez que eliminaria a necessidade de substratos como carboidratos e ácidos orgânicos, os quais representam importante parcela dos custos de produção do polímero em processos fermentativos. A planta necessitaria apenas do CO₂ atmosférico, da energia solar e de alguns nutrientes

obtidos através do solo para fazer a síntese do polímero (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997). A primeira demonstração de transgenia ocorreu com a expressão dos genes de biossíntese de PHA de *C. necator*, no citoplasma de *Arabidopsis thaliana*, resultando em baixo conteúdo de P(3HB) e crescimento retardado da planta (POIRIER *et al.*, 1992). Quando os genes foram expressos nos cloroplastos da planta, esta exibiu crescimento normal e acumulou 14% de seu peso seco em P(3HB) (¹NAWRATH *et al.*, 1994 e ²SOMERVILLE *et al.*, 1995 citados por STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998). Recentemente, os genes de *C. necator* têm sido expressos em *Gossypium hirsutum* e *Zea mays* (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998).

Algumas dificuldades que estão sendo transpostas no estudo com plantas transgênicas são: a síntese do polímero deve ocorrer em grande quantidade em órgão específico da planta, facilitando sua extração e purificação posterior; a síntese de PHA não deve ocorrer em detrimento do desenvolvimento global da planta e a obtenção de outros PHAs além do P(3HB) (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997).

2.3 Produção por *Cupriavidus necator*

Cupriavidus necator é um microrganismo procariótico, Gram-negativo, encontrado naturalmente no solo e na água. É uma bactéria aeróbica, com metabolismo respiratório, sendo que o oxigênio e o nitrato podem servir de receptor final de elétrons na cadeia respiratória (HOLDING e SHEWAN, 1974; BRAUNEGG *et al.*, 1998). As enzimas fermentativas são ausentes nas condições normais de cultura e são formadas somente em condições de aeração e respiração extremamente reduzidas (SCHLEGEL e VOLLBRECHT, 1980). Possui células na forma de bastonete com dimensões de 0,5 por 1,8 a 2,6 µm. É móvel, possuindo de 1 a 4 flagelos peritríquios. Na fase estacionária de crescimento, ou seja, no acúmulo de polímero, as células podem se tornar esféricas e são observados de 8 a 13 grânulos por célula (BRAUNEGG *et al.*, 1998). A Figura 2.3 apresenta a bactéria em fase

¹ NAWRATH, C.; POIRIER, Y.; SOMERVILLE, C. R. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 91, p. 12760-12764, 1994.

² SOMERVILLE, C. R.; NAWRATH, C.; POIRIER, Y. PCT Patent Application WO95/05472, 1995.

de crescimento e em fase de acúmulo de polímero.

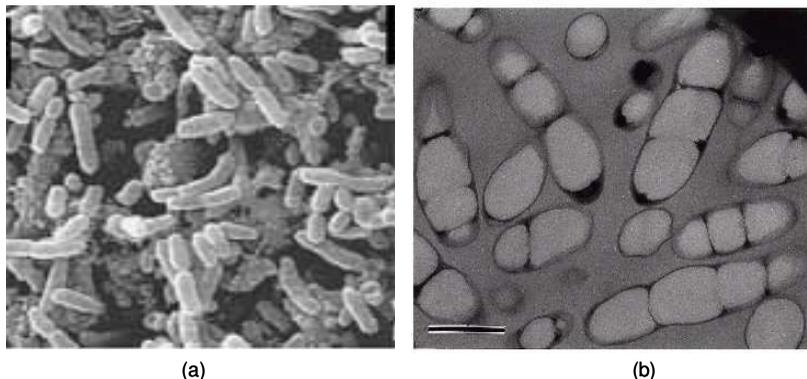


Figura 2. 3 - *Cupriavidus necator* em fase de crescimento (a), Fonte: (Ampe, 1995); e fase de produção (a barra representa 0,5 μm) (b).
Fonte: (Sudesh et al. 2000).

2.4 Metabolismo em *Cupriavidus necator*

2.4.1 *Biossíntese de P(3HB)*

A biossíntese do P(3HB) consiste em uma série de reações enzimáticas catalisadas por diferentes enzimas. O conhecimento da organização estrutural e funcional do ciclo intracelular de uma molécula de PHA fornece a chave para o controle do processo e para síntese de PHAs com novas propriedades (VOLOVA, 2004). As condições sob as quais a síntese de proteínas cessa e as células iniciam os processos de síntese e acúmulo de P(3HB) são determinadas pelo estado redox do citoplasma e pela concentração intracelular de piruvato e CoA disponível (SENIOR e DAWES, 1973). Durante o crescimento balanceado, o piruvato e os equivalentes redutores (NADH e NADPH) são geralmente despendidos no ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA), sendo terminalmente oxidado a CO_2 para formação de aminoácidos e geração de energia na célula, na forma de ATP. O nível de CoA disponível permanece alto, o qual dificulta a síntese do P(3HB). Em condições de crescimento desbalanceado, limitação de algum nutriente essencial ao crescimento, o piruvato não entra no TCA, mas é descarboxilado, formando acetil-CoA. Assim, o nível de CoA disponível é reduzido, o qual favorece a ativação do ciclo enzimas que sintetizam o

P(3HB) (BRAUNEGG *et al.*, 1998; VOLOVA, 2004).

Em *C. necator* a síntese do P(3HB) ocorre a partir de acetil coenzima-A por três reações sequenciais catalisadas por β -cetotiolase; acetoacetil-CoA redutase e PHA sintase (DAWES e SENIOR, 1973). A primeira enzima, β -cetotiolase, condensa, reversivelmente, duas moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA. Esta molécula é então reduzida, através da ação da enzima acetoacetil-CoA redutase NADPH-dependente, à R-3-hidroxi-butiril-CoA, que é incorporado à cadeia de polímero pela ação da enzima PHA sintase (SUDESH, 2000).

2.4.2 Enzimas envolvidas na síntese de P(3HB)

2.4.2.1 β -cetotiolase

β -cetotiolase é a primeira enzima da síntese do polímero. Ela catalisa a condensação, reversível, de duas moléculas de acetil-CoA. A enzima também catalisa a última reação da degradação endógena do polímero. Assim, esta enzima é considerada uma enzima-chave para o ciclo metabólico do polímero. A atividade da enzima não é inibida por concentrações fisiológicas de metabólitos celulares, mas o acúmulo de CoA livre, liberadas quando o acetil-CoA entra no ciclo de Krebs, reduz drasticamente a reação de condensação desta enzima (VOLOVA, 2004).

Existem tipos diferentes de 3- β -cetotiolase, possuindo especificidades de acordo com o substrato. A enzima denominada tipo A, é ativa somente para os substratos com C₄ e C₅, enquanto que a denominada tipo B, é ativa para substratos de cadeia de C₄ a C₁₀. Os dois tipos de enzimas podem ser ativas na síntese de P(3HB) (HAYWOOD *et al.*, 1988).

2.4.2.2 Acetoacetil-CoA redutase

No segundo estágio de síntese de PHAs, os produtos da reação da β -cetotiolase são reduzidos para ácidos hidroxialcanóicos. Esta reação é catalisada pela segunda enzima da via metabólica do PHA – acetoacetil-CoA redutase. Haywood *et al.* (1988) encontraram duas enzimas redutases – NADH e NAPH dependente – em *C. necator*. Apenas a NADPH-dependente esta envolvida na síntese do polímero (ANDERSON e DAWES, 1990; BRAUNEGG, 1998; VOLOVA,

2004). O fator crítico determinante da atividade de enzima é a razão de NADPH/NADP⁺ na célula. Quando esta razão é alta, a atividade da enzima é aumentada (LEE *et al.*, 1996a). Verificou-se assim que a taxa de síntese em *C. necator*, crescida em diferentes substratos, é estritamente dependente da concentração de NADPH na célula (VOLOVA, 2004).

2.4.2.3 PHA sintase

A terceira enzima chave na biossíntese, a qual determina o tipo de PHA produzido, é a PHA sintase. Mais de 50 tipos de estruturas genéticas para PHA sintase a partir de várias bactérias tem sido clonados e analisados (RHEN e STEINBUCHER, 1999; STEINBUCHER, 2001). A PHA sintase têm sido classificada em três diferentes classes de acordo com sua estrutura e substrato que assimila (STEINBUCHER *et al.*, 1991b). A PHA sintetase de *C. necator* pertencem a Classe I, a qual consiste de apenas um tipo de subunidade com peso molecular de aproximadamente 64 kg.mol⁻¹ e é codificada pelo gene *phbC* (VOLOVA, 2004).

Nas células, 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 em grânulos associados, com concomitante rápido desaparecimento da forma solúvel (ANDERSON e DAWES, 1990). Ambas as formas atuam sobre polímeros de cadeia lateral curta (de 3 a 5 átomos de carbono) 3-hidroxiacil-CoA (ANDERSON e DAWES, 1990; VOLOVA, 2004).

2.4.3 Biossíntese de P(3HB-co-3HV)

C. necator cataboliza os carboidratos pela via Entner-Doudoroff a piruvato, o qual é oxidativamente descarboxilado a acetil coenzima A (acetil-CoA). Assim, o monômero predominante encontrado em *C. necator* é o P(3HB), uma vez que é sintetizado a partir de acetil-CoA. Quando se administra aos cultivos precursores para formação de copolímeros, como ácidos propiônico ou valérico, ocorre a formação do copolímero P(3HB-co-3HV), cujas unidades (3HV) são formadas a partir de propionil-CoA, produto gerado a partir da degradação dos

ácidos utilizados (HOLMES, 1985; ANDERSON e DAWES, 1990; FAVA, 1997; BRAUNEGG *et al.*, 1998). Estes substratos podem ser utilizados sozinhos ou na presença de outros substratos, como frutose e glicose, que se torna mais conveniente em virtude do alto preço destes precursores (STEIBUCHEL e PIEPER, 1992).

O copolímero apresenta uma distribuição aleatória das unidades 3HB e 3HV. A via de síntese deste polímero foi estudada por Doi *et al.* (1987), que demonstrou que quando o ácido propiônico está presente no meio, a enzima 3- β -cetotiolase condensa uma molécula de propionil-CoA com uma molécula de acetil-CoA formando 3-cetovaleril-CoA que é polimerizado após redução a monômeros de 3-hidroxivalerato pela PHA sintase. O acetil-CoA também pode ser formado pela descarbonilação do propionil-CoA, de forma que ambos monômeros, 3HB e 3HV, possam ser sintetizados quando o ácido propiônico é utilizado. Os estudos demonstraram que a fração molar de 3HV no copolímero restringe-se a 50% em razão do rápido metabolismo de propionil-CoA em acetil-CoA na célula. Copolímeros com 90 mol% de 3HV são produzidos a partir de ácido pentanóico como fonte de carbono (DOI *et al.*, 1988). O ácido valérico também serve como precursor de unidades 3HV e é diretamente incorporado ao polímero via valeril-CoA e sua β -oxidação a 3-hidroxivaleril-CoA. O uso do ácido valérico leva à formação de um maior conteúdo de unidades 3HV no copolímero do que o ácido propiônico (DOI *et al.*, 1987). A Figura 2.4 mostra a via de síntese de P(3HB-*co*-3HV) a partir do ácido propiônico.

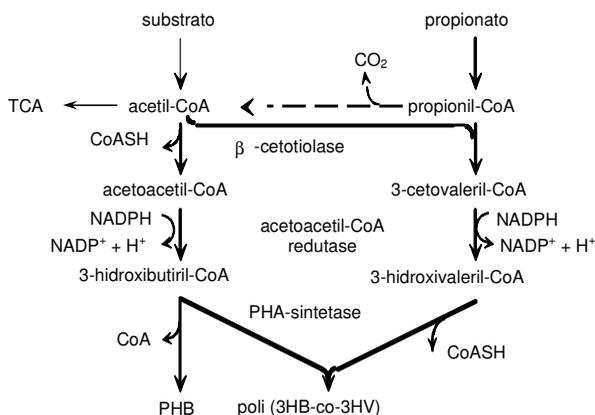


Figura 2.4 - Via de biossíntese de produção de P(3HB-*co*-3HV) a partir de glicose e propionato, adaptado de Doi (1990).

2.4.4 Regulação da síntese de PHAs

A regulação da biossíntese de P(3HB) em *C. necator* está centralizada na ação da enzima β -cetotiolase. Ambas β -cetotiolase já descritas exibem uma pronunciada inibição pela coenzima A livre (HAYWOO *et al.*, 1988; OEDING e SCHLEGEL, 1973).

A inibição da síntese do polímero pela CoA livre é um aspecto muito importante na regulação metabólica da célula. Quando a concentração da CoA é elevada, os substratos são principalmente usados na reações de biossíntese de proteínas, ácidos nucleicos e outras macromoléculas primárias. Desta forma, o acetil-CoA é largamente utilizado no TCA; sendo que na primeira fase do TCA, a enzima citrato sintase utiliza a CoA livre. Sobre estas condições, a concentração de CoA livre é significativamente maior do que sobre as condições de crescimento desbalanceado. Como resultado, a alta concentração de CoA inibe a atividade de β -cetotiolase e, conseqüentemente, a síntese do polímero (VOVOLA, 2004). Ao mesmo tempo, a atividade das duas primeiras enzimas do TCA é inibida pelo aumento nas concentrações de nicotinamida reduzidas (NADH e NADPH) e pelas altas razões NADH/NAD⁺ e NADPH/NADP⁺ no crescimento desbalanceado (SENIOR e DAWES, 1973, LEE, 1995). Assim, a síntese do polímero, em *C. necator*, inicia quando a atividade das enzimas do TCA (citrato sintase e isocitrato desidrogenase) é inibida. Como resultado, a concentração intracelular de acetil-CoA e nucleotídeos piridinas reduzidos aumentam, enquanto que a concentração de CoA e dos nucleotídeos reduzidos decrescem (LEE, 1995; VOLOVA, 2004).

Várias formas de desbalanceamento no meio podem causar diminuição dos níveis de CoA livre, desinibindo a enzima β -cetotiolase, e estimulando o acúmulo de P(3HB). A limitação nutricional para produção de P(3HB) pode ser em oxigênio, nitrogênio, fosfato, entre outros (DAWES e SENIOR, 1973). 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 esta limitação, a velocidade de reoxidação das coenzimas NADH e NADPH decresce, e ocorre preferencialmente na via biossíntese de P(3HB) em detrimento da via de transporte de elétrons até o oxigênio (aceptor final) (RITCHIE, 1971; SENIOR e DAWES, 1971).

Sob limitação em nitrogênio, as células não produzem mais proteínas e ocorre acúmulo de ATP. O excesso de ATP provoca diminuição da fosforilação oxidativa, e assim, acúmulo das coenzimas reduzidas (NADH e NADPH), que leva 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 na energética celular. O magnésio por sua vez, é essencial para o crescimento da célula e tem várias funções como manter a integridade dos ribossomos, participa 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 de PHAs são a elevada concentração de NADH e NADPH, baixa concentração de CoA livre e a elevada concentração de acetil-CoA. Foi proposto por Dawes e Senior, (1973) que os PHAs 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 2.5 (item 2.4.5).

2.4.5 Degradação intracelular do P(3HB)

O catabolismo intracelular do polímero começa quando ocorre limitação das fontes exógenas de carbono e energia (DAWES e SENIOR, 1973). O P(3HB) pode ser degradado intracelularmente por uma seqüência de reações envolvendo as enzimas PHA despolimerases, D(-)-3-hidroxi butirato desidrogenase e acetoacetil sintetase, para formar o ácido D-3-hidroxi butírico e acetil-CoA, a fim de mobilizar o PHA na ausência de uma fonte exógena de carbono (DOI, 1990; JENDROSEK, 1996).

A primeira etapa de degradação do P(3HB) ocorre através da ação da enzima PHA despolimerase que conduz a formação D(-)-3-hidroxi butirato. A enzima PHA despolimerase em *C. necator* é capaz de degradar tanto o P(3HB) como o seu copolímero P(3HB-co-3HV) (DOI, 1990). Através da ação da enzima D(-)-3-hidroxi butirato desidrogenase, NADH dependente, D(-)-3- hidroxi butirato é então convertido em acetoacetato e por fim em acetoacetil-CoA através da ação da enzima acetoacetil sintetase (DOI *et al.*, 1992). Dessa forma, o acetil-CoA é um intermediário comum para as vias de síntese e degradação de P(3HB) (DOI, 1990; JENDROSEK, 1996).

Em condições balanceadas de cultivo, os altos níveis de NADH, bem como a alta concentração acetoacetato e baixa concentração de CoA livre, podem inibir a ação da enzima 3-hidroxi butirato

desidrogenase, interrompendo, portanto a despolimerização do P(3HB), até que os níveis de CoA sejam novamente reduzidos (SENIOR e DAWES, 1973; STEINBÜCHEL, 1991a; STEINBÜCHEL, 1991b). Sob condições de limitação de nitrogênio, em *C. necator*, ocorre o ciclo natural do metabolismo de PHA, onde a biossíntese de PHA procede concomitantemente com sua degradação (DOI *et al.*, 1990). Entretanto, a degradação do polímero é dez vezes mais lenta do que sua síntese (DOI *et al.*, 1992). Em casos de deficiência de energia, quando o suprimento exógeno de carbono é exaurido, o ciclo move-se no outro sentido, conforme Figura 2.5, sendo que a degradação do polímero é controlada pela inibição da enzima 3-hidroxibutirato desidrogenase, pelo acetoacetato, e acompanhada pela formação de NADH, que pode ser reoxidado com continua formação de energia para a célula (SENIOR e DAWES, 1973; BYROM, 1987). Um esquema geral da biossíntese e degradação do P(3HB) está apresentado na Figura 2.5.

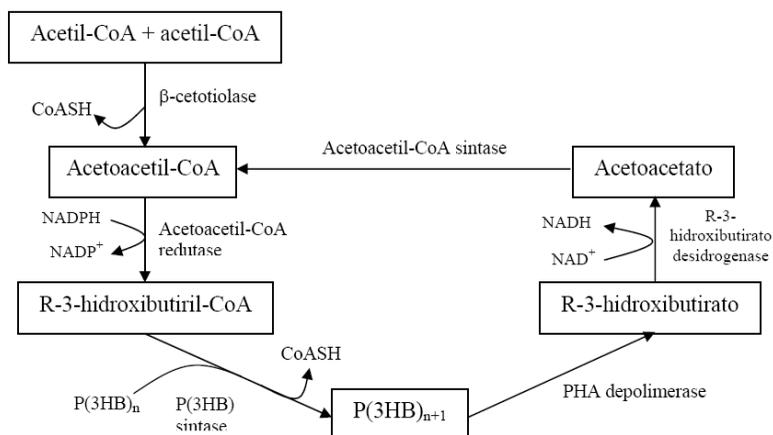


Figura 2.5 Biossíntese e degradação do P(3HB)

Fonte: Byrom (1987)

2.5 Estratégias de cultivo

2.5.1 Modos de cultura

A síntese de PHA a partir de *C. necator* é favorecida por condições de crescimento limitado (DAWES e SENIOR, 1973) e a produção é feita normalmente em duas fases: uma primeira fase de

crescimento não limitado (acúmulo de biomassa) e uma segunda fase de crescimento limitado (produção de PHA).

O desenvolvimento de estratégias de cultura é importante por permitir uma produção eficiente de PHA, além disso, os estudos de diferentes modos de cultura permite a otimização do processo de produção. A produção de PHA em regime descontínuo é um processo simples de produção, porém devido à limitação de substrato, não se consegue obter nessas culturas uma densidade celular elevada o suficiente para a produção industrial do polímero (BYRON, 1987). O método mais empregado para a obtenção de altas concentrações celular, os quais são freqüentemente necessários para atingir alta produtividade do polímero, tem sido cultura em batelada alimentada (fed-batch). Sistemas de cultura contínua podem oferecer alta produtividade tanto quanto cultivos em batelada alimentada, mas somente quando a cultura puder ser mantida estável e sem contaminação (KOYAMA e DOI, 1995).

Para a produção do copolímero P(3HB-co-3HV), durante a fase de acúmulo, o aporte de um precursor com ácido propiônico ou pentanóico, é necessário. Como estes ácidos são tóxicos mesmo em concentrações baixas, as culturas descontínuas não permitem atingir concentrações elevadas do copolímero, e as culturas descontínuas alimentadas se tornam obrigatórias (RAMSAY *et al.*, 1990). Uma concentração de ácido propiônico de 3,0 g.L⁻¹ (RAMSAY *et al.*, 1990) ou 1,5 g.L⁻¹ (KIM *et al.*, 1992b) é considerada como inibidora da produção do copolímero. Uma concentração máxima de 1,0 g.L⁻¹ deste ácido é utilizada pela ICI Bio Products & Fine Chemicals para produção industrial do copolímero (BYROM, 1987).

As culturas contínuas são interessantes do ponto de vista comercial, pois eliminam as etapas de preparação repetidas das culturas e a produtividade pode se manter por um período mais longo (MORI, *et al.*, 1983). Em termos de rendimento (quantidade de PHA produzido / quantidade de substrato consumido) as culturas descontínua alimentada e contínua são equivalentes (RAMSAY *et al.*, 1990). Contudo, as culturas em regime contínuo não são utilizadas industrialmente em razão dos riscos de contaminação e pela instabilidade da cultura. O método mais utilizado para aplicações industriais são as culturas em batelada alimentada (KIM *et al.*, 1994b).

2.5.2 Culturas em regime batelada alimentada

O processo descontínuo alimentado é definido, basicamente, como uma técnica em processos microbianos, onde um ou mais nutrientes são adicionados ao bioreator durante o cultivo e em que os produtos aí permanecem até o final (CARVALHO e SATO, 2001). A alta concentração de biomassa atingida em processos por batelada alimentada conduz a uma produção de grandes quantidades de polímero, diminuindo os custos de produção (LEE, 1996a). Durante a cultura em batelada alimentada, os nutrientes são introduzidos no reator intermitentemente, ou constantemente, pelo monitoramento de inúmeros parâmetros de “fed-batch”, tais como oxigênio dissolvido e pH. No entanto, a concentração de substrato no reator não pode ser precisamente medida devido à natureza da estimativa indireta. A partir de estudos cinéticos para o crescimento e acúmulo em *C. necator*, foi encontrado que a concentração de substrato deve ser mantida em valor ótimo para promover uma produção eficiente de PHA. Para tal, o desenvolvimento de métodos para monitorar e controlar precisamente as concentrações da fonte de carbono é essencial. Culturas em fed-batch em *C. necator* para produção de P(3HB-co-3HV) são também conduzidas usando estratégias de alimentação similares (LEE e CHANG, 1995).

Na batelada alimentada, os métodos de cultivo, de acordo com a bactéria utilizada, envolvem, ou não, o efeito de limitações nutricionais. No caso de bactérias cujo acúmulo de PHAs está condicionado à limitação de um nutriente, um cultivo em duas etapas é realizado. Na primeira etapa, uma dada concentração de biomassa é obtida, sem limitação nutricional; na segunda, um nutriente essencial é mantido numa concentração limitante, conduzindo ao acúmulo de biopolímero. Em relação à limitação empregada, ela pode ser total (cultivo de *C. necator*) ou parcial (cultivo de *P. extorquens*). No caso de bactérias cujo acúmulo não está condicionado à limitação nutricional (*A. latus*, *A. vinelandii* e *E. coli* recombinante), a estratégia de fornecimento dos nutrientes é importante, para conduzir a uma grande produtividade do biopolímero. Fontes complexas, como extrato de levedura e peptona de peixe, podem ser utilizadas para melhorar tanto o crescimento celular, como o acúmulo de PHAs (BRAUNEGG, 1998; LEE, 1996a).

O processo industrial de produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) em batelada alimentada tem sido realizado pela ICI's a partir de *C. necator* (BYROM, 1987). Neste processo, *C. necator* cresce em um meio contendo glicose e sais minerais, sendo fósforo o nutriente limitante durante a fase de produção de P(3HB). A primeira fase da

cultura, sem limitação, dura aproximadamente 60 horas. O tempo total de cultura é de 110 a 120 horas e a quantidade de polímero acumulada é superior a 75% da biomassa total seca. Para a produção do copolímero, a forma de cultura é similar, a única diferença está na adição de ácido propiônico juntamente com a glicose na segunda fase. A incorporação das unidades 3HV ao polímero é controlada pelo aporte de uma mistura de glicose/ácido propiônico durante a alimentação (BYROM, 1987). A cepa utilizada é uma mutante que assimila o propionato mais eficientemente que a cepa selvagem (BYROM, 1992).

2.6 Custos de produção

O uso de P(3HB) e de outros PHAs em geral, em substituição aos plásticos convencionais, tem sido inibido pelo alto custo de produção destes biopolímeros, quando comparado ao custo dos polímeros de origem petroquímica. Estes custos tornam os PHAs até cinco vezes mais caros que os polímeros petroquímicos, como polietileno e polipropileno, cujo preço, por quilo, varia entre US\$ 1,40 e US\$ 2,50 (CHEMICAL MARKET REPORTER, 2005; BASTOS, 2007). Para implementação bem sucedida de sistemas de produção comerciais de PHAs tem-se como pré-requisito a otimização de todos os aspectos das condições de cultivo. O preço de um produto obtido de PHA dependerá finalmente de parâmetros como custo do substrato, rendimento de PHA e eficiência da formulação do produto no processo de purificação. Isto significa que altos níveis de PHA e um conteúdo de massa de célula seca elevado são desejáveis, assim como uma alta produtividade em termos de gramas do produto por unidade de volume e tempo (KONING *et al.*, 1997a, 1997b).

Para que isto ocorra, é necessária a seleção adequada do microrganismo. É desejável que as cepas tenham velocidade específica de crescimento e de produção de PHA elevados, que possam utilizar substratos de baixo custo, que apresentem uma porcentagem elevada de PHA em relação à massa total seca e finalmente, é importante que haja um fator de conversão de substrato em PHA bastante elevado (RAMSAY, 1991).

O elevado custo de produção de PHA se deve, 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 (RAMSAY *et al.*, 1990). Além disso, uma avaliação econômica do processo de produção de P(3HB)

indica que o custo do substrato também tem uma contribuição importante no custo global da produção, podendo representar mais de 38%, segundo CHOI e LEE (1999). Desta forma, estudos têm sido realizados para tentar minimizar os custos de produção através da utilização de fontes de carbono de baixo custo, desenvolvimento de novas linhagens e técnicas mais eficientes para recuperação de polímeros (MARANGONI *et al.*, 2002; DU *et al.*, 2001a; DU *et al.*, 2001b; FIORESE, 2004; IENCZAK, 2006), além de uma melhor compreensão do metabolismo dos microrganismos produtores (BRAUNEGG *et al.*, 1998) a fim de alcançar melhores valores de velocidade específica de produção, produtividade e a obtenção de melhores fatores de conversão de substrato em produto, através do aperfeiçoamento dos sistemas de controle e desenvolvimento de novas técnicas de produção (SIM, *et al.* 1997; BRAUNEGG *et al.*, 1998).

2.6.1 Custo do substrato

O custo do substrato é um fator de grande importância na determinação dos custos de produção de PHAs (YAMANE, 1993). Do ponto de vista econômico, o custo com o substrato contribui significativamente para o custo total do processo, podendo atingir até 40% do custo total (KIM, 2000). 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 PHAs, 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).

Para a produção do copolímero, ainda há que se levar em conta o custo dos co-substratos precursores de 3HV, que normalmente são mais caros que a fonte principal de carbono (CHOI e LEE, 1999a). Assim, para a redução de custos é importante a definição dos substratos que possam ser utilizados como precursores e o aumento da eficiência de conversão desse substrato em unidades 3HV com o uso, por exemplo, de mutantes incapazes de utilizá-los para crescimento (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997). Marangoni (2000) com o objetivo de reduzir o custo de produção de P(3HB-co-3HV) por *C. necator*, estudou a utilização de soro de leite e a mistura de soro de leite e açúcar invertido como fonte de carbono, obtendo uma velocidade específica máxima de crescimento foi de $0,20 \text{ h}^{-1}$ e de $0,23 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Comparando-se esses dois

resultados, percebe-se que tanto o soro de leite, quanto a mistura de soro e açúcar invertido são alternativas atrativas para a utilização como fonte de carbono.

2.6.1.1 Melaço cítrico como fonte de carbono para a produção de *P(3HB-co-3HV)*

Um dos principais problemas enfrentados pelas indústrias processadoras de suco de laranja é o grande volume de resíduos sólidos e líquidos, produzidos diariamente. Dados fornecidos pela empresa Citrusuco Paulista S.A mostram que seus resíduos líquidos são utilizados no processo de produção de álcool e o excedente deste resíduo (parte sólida) constituído por cascas, sementes e polpas são, na grande maioria transformados em "pellets", os quais são utilizados como componente de ração animal. Dentre os despejos líquidos, o "melaço cítrico", formado por óleos essenciais, pectinas, açúcares, ácidos orgânicos e sais, é aquele que mais preocupa, pelos seus altos índices de matéria orgânica, o que o torna um agente de alto potencial poluidor.

Microrganismos, em função de suas características de reprodução e crescimento, adaptam-se a uma grande variedade de substratos, entre eles, resíduos gerados por indústrias processadoras de alimentos, resíduos agrícolas e agro-industriais. Ao se desenvolverem nesses meios, consomem nutrientes (açúcares, sais, pectinas, etc.), promovendo a redução de sua capacidade poluidora. Isso permite ao mesmo tempo a bioconversão do substrato residual em biomassa microbiana, a qual tem servido para a extração de proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, ou mesmo para uso direto em ração animal, além do aproveitamento de compostos como ácidos orgânicos, vitaminas e enzimas, excretados pelo microrganismo durante seu crescimento (TAVARES *et al.* 1998).

As características apresentadas pelo resíduo melaço cítrico, bem como as características requeridas para o crescimento e produção de PHAs por *C. necator*, tornam a utilização deste resíduo promissora no aspecto ambiental uma vez que, minimiza a geração de resíduos orgânicos industriais, auxilia na produção e substituição de plásticos petroquímicos por plásticos biodegradáveis, além de agregar valor a este resíduo.

2.7 Extração

Após a fermentação, as células contendo PHAs são separadas por processos convencionais como centrifugação, filtração ou floculação-centrifugação. Em seguida, as células precisam ser rompidas para a recuperação do polímero. Há vários métodos desenvolvidos para essa recuperação, e a maior parte aplicados à produção por *C. necator* (KESSLER *et al.*, 2001).

A maioria dos processos de purificação de PHAs propostos na literatura envolve sua remoção das células com uso de solventes. No entanto, pela alta viscosidade de soluções contendo PHA são necessárias grandes quantidades de solvente, os quais são tóxico e/ou volátil (aproximadamente 20 partes de solvente para 1 parte de polímero), o que aumenta os custos de produção e causa danos ao meio ambiente (HOLMES *et al.*, 1980; LEE, 1996a).

Os polímeros são prontamente extraídos de microrganismos por hidrocarbonetos clorados, como cloreto de metila, clorofórmio e dicloroetano. Estes solventes rompem as células, solubilizando seus componentes, inclusive os PHAs. Compostos orgânicos polares, como acetonas e alcoóis, também podem ser usados. Eles rompem o material celular não polimérico, deixando os grânulos de PHA intactos (HOLMES *et al.*, 1980). Combinações dos dois processos podem ser utilizadas. Inicialmente, é feita a lavagem com clorofórmio; a solução resultante, com o polímero solubilizado, é filtrada, para remover células debris e concentrada. O polímero é precipitado com gotejamento em metanol ou etanol, deixando lipídios de baixo peso molecular em solução (BRAUNEGG *et al.*, 1998).

Outro processo que envolve a quebra de material celular não polimérico utiliza soluções alcalinas de hipoclorito de sódio. Os grânulos insolúveis de PHA são separados da fase aquosa por centrifugação. No entanto, durante a digestão há grande degradação de P(3HB), podendo resultar em 50% de redução do peso molecular. O pré-tratamento das células com surfactantes ajuda a melhorar as características do polímero extraído, reduzindo significativamente esta degradação. Normalmente, obtém-se um polímero com pureza maior que 95% a partir deste processo (LEE, 1996a). No processo de recuperação de P(3HB), dispersões de hipoclorito de sódio e clorofórmio também podem ser usadas, garantindo, simultaneamente, o rompimento do material celular e a migração dos polímeros para a fase orgânica, com recuperação do polímero de 91% e com 97% de pureza utilizando uma solução de hipoclorito de sódio 30% e um tempo de

tratamento de 90 minutos (HANH *et al.*, 1994).

Métodos de digestão enzimática em meio aquoso foram desenvolvidos pela empresa Zeneca Bioproducts, como alternativa à extração com solventes (HOLMES e LIM, 1990). Eles consistem em tratamento térmico da biomassa contendo o PHA, para ruptura das células e desnaturação dos ácidos nucleicos, que poderiam interferir nos passos subsequentes. Em seguida, realiza-se um tratamento enzimático, com uma mistura de várias enzimas hidrolíticas (lisozimas, fosfolipases, lecitinasas, proteinases, entre outras) e lavagem com surfactantes aniônicos, para solubilizar o material celular não desejado (debris celulares). A maior parte do material é hidrolisado por estas enzimas enquanto o polímero permanece intacto. Após a lavagem e floculação, o polímero é recuperado com um pó branco, que é convertido em chips para ser comercializado (BYROM, 1987; KESSLER *et al.*, 2001). O elevado custo das enzimas e a necessidade de passos adicionais de digestão resultam em maior custo de extração por este processo (CHOI e LEE, 1999b). CHOI e LEE (1999b) desenvolveram um método simples de digestão alcalina para recuperar 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 recuperado 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.

2.8 Caracterização

As características térmicas dos PHAs, como temperatura de fusão e temperatura de degradação, são importantes de serem quantificados, pois influem na aplicabilidade e processabilidade dos polímeros. A caracterização dos mesmos pode ser realizada avaliando-se propriedades como densidade, temperatura de transição vítrea, resistência à UV, permeabilidade ao oxigênio, biodegradabilidade, resistência ao impacto e a ruptura, distribuição do peso molecular, entre outras (DUARTE *et al.*, 2004).

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 (MOTHÉ, 2002 citado por SPIER 2005). Em outras palavras a 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). É uma técnica que 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 copolímeros obtidos e dos polímeros puros.

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 de transições físicas ou reações químicas. As variações de entalpia são chamadas transições de primeira ordem, como fusão, cristalização, vaporização e solidificação (GALEGO *et al.*, 2000). A transição térmica dita de segunda ordem, conhecida com transição vítrea (T_g) é acompanhada pela variação da capacidade calorífica da amostra, juntamente com variações dimensionais e viscoelásticas, mas não apresentam variação de entalpia. Assim sendo, essas transições geram picos nas curvas de DSC, manifestando-se na alteração da 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 podem ser empregada na medição de temperaturas de transição vítrea (T_g), fusão (T_m) e cristalização (T_c); na determinação da cristalinidade, 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).

CAPÍTULO III

3 MATERIAIS E MÉTODOS

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

3.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado em todos os ensaios foi a linhagem bacteriana *Cupriavidus necator* DMS 545, por apresentar grande capacidade de acúmulo de polímero e possibilidade de crescimento em glicose como fonte de carbono (mutante espontâneo).

Na preservação da linhagem por longos períodos, a cepa foi congelada a -80°C em glicerol (COSTA, 1991), enquanto que a manutenção da linhagem por períodos curtos foi realizada por repiques quinzenais em tubos inclinados, contendo meio ágar nutriente (NA), composto de $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona de carne, $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de carne e 1,5 % de Ágar estocados sob refrigeração.

3.2 Meios de cultura

Dois meios de cultura líquidos foram utilizados, sendo o primeiro para reativar a cepa e outro para propiciar a adaptação da bactéria ao meio e promover o aumento da concentração celular. Inicialmente, as células foram cultivadas numa primeira pré-cultura, em um meio enriquecido, N.B. (Nutrient Broth), o qual é utilizado para reativação da cepa, possuindo a seguinte composição: 5 g.L^{-1} de peptona de carne e 3 g.L^{-1} de extrato de levedura.

O meio mineral (MM) foi utilizado na segunda pré-cultura (sem limitação de nitrogênio) e como meio final (com limitação em nitrogênio). Este meio foi baseado em Aragão (1996) e sua composição, sem limitação, utilizada na segunda pré-cultura, está apresentada nas Tabelas 3.1 e 3.2.

Para realização das culturas em bioreator, utilizou-se o mesmo meio da Tabela 3.1, porém limitado em nitrogênio, com concentração final da fonte de nitrogênio ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) no meio de 1 g.L^{-1} , baseado no

rendimento de biomassa a partir do nitrogênio, suficiente para obtenção de 7,14 a 8,33 g.g⁻¹ no momento da limitação (REPASKE e MAYER, 1976).

Tabela 3. 1 - Composição do meio mineral (MM)

	Componente	Solução Conc.(g.L ⁻¹) ^a	Volume adic. (mL.L ⁻¹ de meio)	Conc. no meio (g.L ⁻¹)
SOLUÇÃO 1	Ácido nitriлотriacético	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	KH ₂ PO ₄	122,4	64,6	2,64
SOLUÇÃO 3	Fonte de carbono ^d			30
SOLUÇÃO 4	Fonte de nitrogênio (uréia)	100	65.2	1

^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 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 da Tabela 3.1 foram preparadas separadamente e armazenadas como solução estoque. O pH final da solução 1 foi ajustado a 7,0 com soluções de NaOH 2,5 mol.L⁻¹ ou HCl 2,7 mol.L⁻¹. Em seguida, as soluções 1, 2 e 3 foram autoclavadas por 15 minutos a 121°C e adicionadas assepticamente para compor o meio final.

3.3 Condições de cultura

O MM foi então conduzido à incubação em shaker rotatório, a 150 rpm, na temperatura de 35°C por um período de 24 h. O volume do primeiro pré-inóculo, transferido para os frascos contendo o meio mineral, representa uma fração de 10% do volume final do mesmo. As concentrações dos substratos utilizados com fonte de carbono foram glicose 500 g.L⁻¹ para experimentos em meio sintético e melaço cítrico 80 g.L⁻¹ de forma a obter no meio uma concentração inicial de 40 g.L⁻¹.

3.3.1 Pré-culturas

As pré-culturas foram preparadas em várias etapas a partir da linhagem bacteriana mantida sob refrigeração em tubo inclinado. O primeiro pré-inóculo foi realizado em frasco erlenmeyer aletado de 500 mL contendo volume útil de 150 mL do meio NB, previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos, com a inoculação de três alçadas da cepa, mantida em Ágar inclinado. Este pré-inóculo foi mantido em um agitador rotatório, a 35°C e 150 rpm por um período de 24 horas. Após este período, as células foram transferidas para o segundo pré-

inóculo, em frasco erlenmeyer aletado de 1000 mL contendo 300 mL de meio MM, não limitado, o qual recebeu uma fração de 10% de seu volume final de inoculo, proveniente do meio NB. Da mesma forma, este meio foi incubado em shaker rotatório a 35°C e 150 rpm por um período de 24 horas.

3.3.2 Culturas em bioreator

As culturas foram realizadas em bioreator de 5 L (New Brunswick Scientific CO, modelo BIOFLO 110), com o volume de líquido inicial igual a 3 L. O bioreator, contendo a solução 1 do meio mineral (Tabela. 3.1), foi autoclavado durante 30 min a 121°C. Em todos os ensaios, as soluções de glicose, de base, de ácido, a fonte de fosfato e o antiespumante (polipropilenoglicol Mn.ca. 2000, Sigma-Aldrich) foram esterilizados separadamente por 15 min a 121°C e adicionados ao bioreator assepticamente. A fonte de nitrogênio foi esterilizada utilizando-se microfiltração e o melaço cítrico obteve sua carga microbiana reduzida por um processo de ultrafiltração. A taxa de inoculação foi correspondente a 10% do volume útil final do bioreator, proveniente da segunda pré-cultura. Os cultivos foram todos limitados em nitrogênio.

A temperatura do bioreator foi mantida a 35°C e o pH ajustado a 7,0 com soluções de NaOH 2,5 mol.L⁻¹ ou HCl 2,73 mol.L⁻¹. As condições iniciais de agitação e aeração foram de 450 rpm e 0,5 vvm respectivamente e aumentadas gradualmente até 950 rpm e 1,5 vvm, respectivamente, de maneira a manter a pressão parcial de oxigênio dissolvido superior a 30% de saturação. O bioreator é conectado a um computador, o qual possui um *software* de aquisição de dados que permite o registro *on-line* da velocidade de agitação, temperatura, pH e pressão parcial de oxigênio dissolvido.

Após executada a inoculação, amostras foram retiradas do bioreator em intervalos regulares de tempo (aproximadamente a cada 2 h) para determinação das concentrações de biomassa total, glicose, nitrogênio, proteína, P(3HB) e P(3HB-co-3HV). Valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) e velocidade de respiração do microrganismo ($QO_2 X$), foram calculados com auxílio do *software* de aquisição de dados interfaceado a um microcomputador. A Figura 3.1 apresenta o equipamento utilizado no experimento.



Figura 3. 1 - Bioreator Bioflo 110 utilizado nos experimentos

3.3.3 Fontes de carbono

Foram utilizadas duas fontes de carbono de acordo com os experimentos realizados. As fontes de carbono utilizadas neste trabalho foram glicose P.A. (NUCLEAR) e melão cítrico (Citrosuco Paulista S.A.). Todas as fontes de carbono foram adicionadas separadamente ao meio mineral limitado em nitrogênio.

3.3.3.1 Glicose

Foram realizadas culturas em bioreator, utilizando glicose como fonte de carbono, devido ao fato deste substrato ser considerado como meio padrão e desta forma verificar se a estratégia de alimentação em ácido propiônico (substrato precursor) seria a mais favorável para a produção do copolímero P(3HB-co-3HV). Para tal, foi preparada uma solução concentrada de glicose (500 g.L^{-1}) e adicionada ao meio de maneira a propiciar uma concentração inicial de cultivo de 40 g.L^{-1} .

3.3.3.2 *Melaço cítrico*

O melaço cítrico utilizado como substrato, fornecido pela empresa Citrosuco Paulista S.A., foi congelado, em frascos de 1 L e mantidos a -24°C até sua utilização. O melaço utilizado apresenta em sua composição a presença de açúcares redutores (na concentração de aproximadamente 80 g.L^{-1}), além da presença de etanol, metanol, sacarose, ácidos orgânicos entre outros. A Tabela A.1 apresentada no Anexo I, apresenta a composição do melaço cítrico utilizado como substrato para realização dos experimentos.

3.4 Estratégias de cultivo

As estratégias de alimentação aqui descritas foram realizadas a partir do início da fase de produção que foi caracterizada a partir da concentração da biomassa presente no momento no meio e do aumento da porcentagem de oxigênio dissolvido no momento da limitação, conforme item 4.1.1.

3.4.1 *Alimentação em Açúcar e Ácido propiônico*

O açúcar foi alimentado quando sua concentração decresceu a aproximadamente 10 g.L^{-1} . Este valor foi monitorado, durante a cultura, através do método de DNS, conforme descrito no item 3.5.3.1. A alimentação foi realizada a partir das fontes de substratos utilizados para realização dos cultivos. A alimentação em glicose foi realizada a partir de uma solução concentrada de 500 g.L^{-1} e a alimentação em melaço cítrico foi proveniente de uma solução com concentração de 80 g.L^{-1} . Ambas as alimentações foram realizadas de maneira a proporcionar uma concentração final de 40 g.L^{-1} . Para estimular a produção do copolímero foi realizada alimentação contínua de ácido propiônico à uma vazão de 18 mL.h^{-1} , a partir de uma solução de 80 g.L^{-1} de ácido.

3.4.2 *Alimentação em nitrogênio*

A estratégia de alimentação ocorreu da seguinte forma: ao início da fase de produção administrou-se uma alimentação contínua de uréia, com concentração de aproximadamente 10 g.L^{-1} de nitrogênio, na vazão

de $12,5 \text{ mL.h}^{-1}$, após o momento de limitação deste nutriente de maneira a manter no meio uma velocidade de produção de biomassa residual de $0,2 \text{ g}_{\text{Xr}}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Esta concentração foi baseada em estudos realizados por Aragão (1996).

3.4.3 Pré-tratamento do melão cítrico

A presença de elevada concentração de sólidos suspensos presente no melão cítrico provoca problemas na determinação da massa seca e no processo de *downstream* para a recuperação do polímero. Portanto, foi necessária a realização de um pré-tratamento com o intuito de reduzir a concentração destes do melão. Como foi adaptado um novo método para o pré-tratamento do melão cítrico neste estudo, a metodologia se encontra em resultados e discussão.

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Amostragem

No ensaio em bioreator, a amostragem foi realizada periodicamente, a cada 2 h, por um tempo de aproximadamente 30 h, tempo necessário para se atingir uma concentração final de substrato de aproximadamente 10 g.L^{-1} . O volume de amostra retirado foi de aproximadamente 20 mL, sendo 1 mL destinado para leitura da absorbância em espectrofotômetro e o restante foi centrifugado em tubos eppendorf de 2 mL cada em centrifuga MCD-2000 a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi separado e congelado para posterior análise de açúcares redutores e nitrogênio e o centrifugado foi ressuscitado duas vezes em pequeno volume de água destilada e, após a última centrifugação, parte foi congelado para posterior análise do polímero e do conteúdo protéico e parte foi submetida à determinação da biomassa seca.

3.5.2 Determinação da concentração de biomassa

A concentração celular é determinada por dois métodos distintos: por espectrofotometria (durante a cultura) e por gravimetria.

3.5.2.1 Medida por espectrofotometria

A medida de densidade celular das amostras coletadas é estimada através da leitura em um espectrofotômetro (modelo GENESYS 10 Vis, marca Spectronic Unicam, USA) no comprimento de onda de 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.

3.5.2.2 Medida por gravimetria

Nos cultivos em bioreator, a determinação da biomassa por gravimetria foi obtida a partir de um volume conhecido de amostra e realizada durante todo o cultivo. A concentração celular foi obtida a partir da centrifugação de 2 mL do meio em tubos *ependorf*. Os tubos foram previamente pesados. A centrifugação foi realizada a 14000 rpm por 3 minutos, e o precipitado foi ressuspenso com água destilada e centrifugado duas vezes para a lavagem. O material retido foi submetido à secagem em estufa a 105°C por 24 h. Após esse período, as amostras foram resfriadas em dessecador por 20 min e pesadas em balança analítica, obtendo-se a massa seca presente no volume amostrado. A amostragem foi realizada em triplicata.

3.5.3 Dosagem de substratos

3.5.3.1 Glicose

Em todas as culturas, a glicose foi dosada, após o cultivo, 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 tetra hidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 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, utilizou-se um volume de 400 μL de amostra do sobrenadante, previamente diluído, adicionou-se a 400 μL de

reativo DNS e depois este foi colocado em ebulição durante 5 minutos em banho-maria. Então, fez-se o resfriamento em banho de gelo e adicionou-se 4 mL de água destilada. Após ser mantido em repouso em ambiente sem a presença de luz por 15 minutos, foi realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm contra um branco de água destilada que passou pela mesma reação. A curva de calibração expressou a concentração de glicose (g.L^{-1}) *versus* absorvância 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.

3.5.3.2 Nitrogênio

O nitrogênio determinado no meio de cultura é 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, é decomposta em nitrogênio amoniacal, que é determinado por colorimetria. O fundamento do método foi o seguinte:



onde: NP = nitroprussiato

Os reagentes usados são os seguintes:

- 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} ;
- solução enzimática de urease > 500 U.mL^{-1} ;
- solução padrão aquosa de uréia 50 g.dL^{-1} ;
- o reagente de trabalho foi a 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 feito da seguinte forma (Equação 3.1):

$$NH_4^+ = \frac{abs.teste}{abs.padrão} \times 0,5 \quad (g.L^{-1}) \quad (0.1)$$

Um exemplo de curva de padrão é apresentada no Anexo I - Figura A.2.

3.5.3.3 Proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Biureto, baseado em uma reação colorimétrica permitindo a determinação do número de ligações peptídicas (STICKLAND, 1951). Para tal, amostras de 2 mL do meio de cultura foram centrifugadas a 14000 rpm por 3 minutos em centrífuga MCD-2000 e o precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e congelado para posterior análise. O precipitado foi ressuspenso em 5,5 mL de água destilada e a lise celular provocada por adição de 1mL de NaOH 20% (p/v) e incubação em banho-maria a 100°C durante 5 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 170 µL de CuSO₄.5H₂O 25% (p/v), agitados e deixados em repouso por 5 minutos. O sobrenadante obtido, após centrifugação a 5000 rpm durante 10 minutos, foi analisado por espectrofotometria em um comprimento de onda de 560 nm. A concentração em g.L⁻¹ foi obtida através de uma curva de calibração de proteína (g.L⁻¹) vs absorbância (560nm), utilizando albumina bovina (BSA) entre 0 e 3 g.L⁻¹ como padrão conforme ilustrado no Anexo I - Figura A3.

3.5.4 Dosagem de P(3HB-co-3HV)

O P(3HB-co-3HV) 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 ressuspensionado em um volume de 2 mL de clorofórmio e 2 mL de metanol acidificado (H₂SO₄ 15%), contendo ácido benzóico 0,4 g.L⁻¹ como padrão interno, e a mistura foi então aquecida a 100°C durante 140 minutos. Depois de 1 hora de aquecimento, a mistura foi agitada durante alguns segundos e devolvida ao aquecimento. Após resfriamento à temperatura ambiente, 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 seringa e armazenada sob refrigeração para posterior análise em cromatografia gasosa. A curva padrão (Anexo I - Figura A4) foi feita utilizando-se o P(3HB-co-3HV) (Sigma) com um teor definido de 12% de 3HV, como padrão externo, com massa variando entre 0,0010 g e 0,030 g. Submeteram-se os padrões à mesma metanólise que as amostras. A curva padrão foi estabelecida através da relação das áreas de P(3HB-co-3HV)/padrão interno versus a massa do polímero.

3.5.5 Determinação do oxigênio dissolvido

A concentração do oxigênio dissolvido (OD) no meio de cultura foi medida continuamente através de um eletrodo polarográfico (Mettler-Toledo, Germany) e dados gerados foram salvos com auxílio de um *software* de aquisição de dados para posterior análises do coeficiente global de transferência de oxigênio ($k_L a$) e velocidade de respiração celular (QO₂X).

3.6 Transferência de massa

3.6.1 Transferência e consumo de oxigênio durante o cultivo: determinação do $k_L a$ e QO₂

Durante o cultivo, enquanto o bioreator transfere oxigênio da fase

gasosa para a fase líquida, o microrganismo consome o oxigênio dissolvido. Assim sendo, o equacionamento mais adequado surge através de um balanço de oxigênio no meio líquido, ou seja:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a(C_S - C) - QO_2 X \quad (0.2)$$

onde: QO_2 = velocidade específica de respiração ($gO_2 \cdot g_{cél}^{-1} \cdot h^{-1}$), $k_L a$ = coeficiente volumétrico de transferência de O_2 (h^{-1}), C_S = concentração de saturação de O_2 dissolvido no líquido ($gO_2 \cdot L^{-1}$), C = concentração de oxigênio no meio líquido ($gO_2 \cdot L^{-1}$) e X = concentração de biomassa ($g_{cél} \cdot L^{-1}$)

A variação da concentração de OD no líquido é o resultado da diferença entre a quantidade que se consegue dissolver ($k_L a (C_S - C)$) e o oxigênio consumido pelo microrganismo ($QO_2 X$). A cinética do cultivo está considerada pela equação anterior, pois X varia com o tempo e QO_2 varia com μ_X , atingindo-se seu valor máximo quando $\mu_X = \mu_{máx}$.

A determinação do $k_L a$ e da QO_2 foi realizada com emprego do método dinâmico (SCHMIDELL, 2001). Em determinado instante, interrompe-se a aeração para anular a transferência de oxigênio. Conforme ilustra a Figura 3.2, a concentração de OD (C_0), no instante inicial, começa a diminuir, e o sinal do sensor é registrado continuamente. Ao se atingir certo valor (C_{01}), retoma-se a aeração nas condições anteriores e registra-se o aumento da concentração de OD até atingir novamente o valor inicial (C_0). Este procedimento deve levar somente alguns minutos, dependendo do estágio do cultivo, sendo importante que a concentração não atinja valores críticos que afetariam o metabolismo. Nesse curto espaço de tempo, pode-se supor que não ocorre aumento de X e que QO_2 se mantém constante.

Para o trecho sem aeração, resulta da Equação (3.2) que:

$$\frac{dC}{dt} = -QO_2 X \quad (0.3)$$

Com a consideração anterior de que QO_2 é constante, a Equação (3.3) pode ser integrada resultando:

$$C = C_0 - QO_2X(t - t_0) \quad (0.4)$$

A Equação (3.4) prevê uma variação linear com o tempo no trecho sem aeração. Assim, foi obtido o valor de QO_2 através do coeficiente angular QO_2X e do valor de X obtido da análise da amostra retirada no momento da realização desse ensaio.

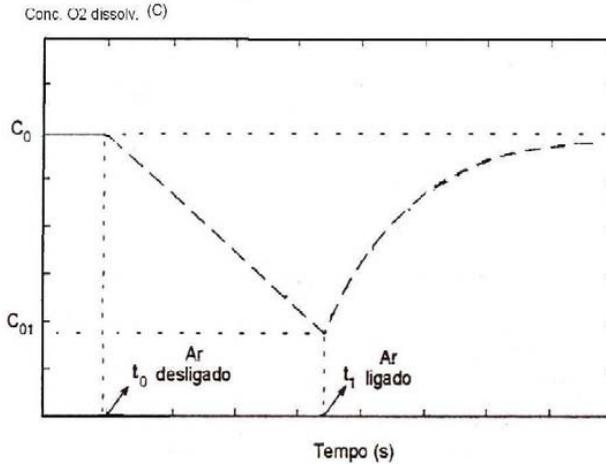


Figura 3.2 - Ilustração para explicar o método dinâmico utilizado para determinar k_La e QO_2 (adaptado por SCHMIDELL, 2001)

O valor de k_La foi determinado com a utilização dos dados obtidos durante o aumento da concentração do OD, ilustrado pelo segundo trecho da Figura 3.2, onde a Equação (3.2) foi aplicada integralmente. Assim, rearranjando-se a Equação (3.2), obtém-se:

$$\frac{dC}{dt} = k_La \left(C_s - \frac{QO_2X}{k_La} \right) - k_LaC \quad (0.5)$$

Considerando estado estacionário no momento que antecede a interrupção da aeração ($C = C_0$), verifica-se que:

$$C_0 = C_s - \frac{QO_2X}{k_La} \quad (0.6)$$

Introduzindo-se a Equação (3.5) na Equação (3.6), obtém-se:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C_0 - C) \quad (0.7)$$

Essa equação pode ser integrada, lembrando que para o instante inicial de retomada da agitação e aeração, ou seja, para $t = t_1$, tem-se $C = C_0$, obtendo-se:

$$\ln \left(\frac{C_0 - C}{C_0 - C_{01}} \right) = -k_L a (t - t_1) \quad (0.8)$$

Então, locando-se $C = f(t)$, conforme a Equação (3.8), obtém-se uma reta cujo coeficiente angular fornece o valor de $k_L a$. Na verdade o valor de $k_L a$ estaria correto, caso a sonda apresentasse um perfeito acompanhamento do aumento da concentração de O_2 no líquido, o que pode não ocorrer em virtude do atraso do sinal, podendo necessitar de correção.

3.6.2 Constante de atraso do eletrodo (k_p) de oxigênio dissolvido

Considerando que o sinal do sensor (C_p) varia no tempo proporcionalmente à diferença entre a concentração real do OD (C) e o sinal (C_p) (AIBA e HUANG, 1969), tem-se:

$$\frac{dC_p}{dt} = k_p (C - C_p) \quad (0.9)$$

Onde: C_p = concentração de OD lida pelo eletrodo ($\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$), k_p = constante de atraso do eletrodo (h^{-1})

As constantes de atraso do eletrodo (k_p) foram determinadas previamente, através de um ensaio degrau na ausência de microrganismos onde, primeiramente, zerou-se a leitura do sensor imerso em água através da injeção de nitrogênio e, posteriormente, ele foi introduzido em líquido saturado de O_2 e registraram-se as leituras obtidas. Foram realizados três ensaios em meio de cultura sob agitação intensa e aeração, caso em que se minimiza o efeito do filme estagnado

na membrana do sensor. Nas condições do ensaio degrau tem-se desde o instante $t = 0$ com $C = 0$ até $C = C_s$, segundo a Equação (3.10):

$$\frac{dC_p}{dt} = k_p (C_s - C_p) \quad (0.10)$$

a qual integrada fornece:

$$\ln\left(1 - \frac{C_p}{C_s}\right) = -k_p \times t \quad (0.11)$$

Ou:

$$\frac{C}{C_s} = (1 - e^{-k_p \times t}) \quad (0.12)$$

Locando-se os valores de $\ln(1 - C_p/C_s)$, em função do tempo, obtém-se o valor de k_p .

3.6.3 Correção do $k_L a$ em função do atraso na resposta do eletrodo

Para corrigir o atraso de sinal do sensor, segundo o procedimento proposto por Schmidell (2001), introduziu-se na Equação (3.10) o valor de C em função do tempo, obtido a partir da Equação (3.8), e a integração da equação resulta em:

$$\frac{C_p}{C_s} = 1 + \frac{k_L a}{k_p - k_L a} \times e^{-k_p \times t} - \frac{k_p}{k_p - k_L a} \times e^{-k_L a \times t} \quad (0.13)$$

Ajustando-se a Equação (3.13) aos dados experimentais ($C_p = f(t)$), utilizando uma rotina de cálculo, obtém-se o valor correto de $k_L a$. O valor da constante de atraso do sensor foi determinado conforme descrito no item 3.6.2.

3.6.4 Correção do $k_L a$ e do QO_2 em função da constante de atraso

Pela mesma razão apresentada no item 3.6.1, poderá ser necessária a correção do $k_L a$ e da QO_2 . Isso pode ser realizado, seguindo novamente o procedimento de Schmidell (2001). Retomando a Equação (3.4) e fazendo-se $t_0 = 0$ (instante inicial da interrupção da aeração), e introduzindo o valor de C na Equação (3.10), fica-se com:

$$\frac{dC}{dt} = k_p (C_0 - QO_2 X.t - C_p) \quad (0.14)$$

Que após a integração fornece:

$$C_p = C_0 - QO_2 X \left(t - \frac{1}{k_p} + \frac{1}{k_p \cdot e^{k_p \cdot t}} \right) \quad (0.15)$$

Onde: $C_0 = C_{p0}$ = concentração de O_2 antes da interrupção da aeração, coincidente com o sinal do eletrodo.

Ajustando-se a Equação (3.15) aos dados experimentais ($C_p = f(t)$), obtém-se o valor correto de QO_2 . Analogamente, para a correção $k_L a$ levando em conta o atraso do sensor, retoma-se a Equação (3.7) e integra-se a partir de um instante t_2 (atraso), cuja concentração de oxigênio dissolvido é C_{02} , resultando em:

$$C = C_0 - (C_0 - C_{02}) e^{-k_L a t} \quad (0.16)$$

A substituição deste valor de C na Equação (3.10), e a integração da equação resultante fornecem:

$$C_p = C_{p02} e^{-k_p t} + C_0 (1 - e^{-k_p t}) + \frac{k_p (C_0 - C_{02})}{k_p - k_L a} (e^{-k_p t} - e^{-k_L a t}) \quad (0.17)$$

Onde: C_{p02} = sinal do eletrodo no instante $t_2 = 0$ considerado para integração

C_{02} = concentração real de O_2 no instante $t_2 = 0$.

Ajustando-se a Equação (3.17) aos dados experimentais ($C_p = f(t)$), obtém-se o valor correto de $k_L a$.

3.6.5 Velocidade específica de consumo de oxigênio para a manutenção e fator de conversão de oxigênio para células

Microorganismos com alta velocidade específica de crescimento (μ_x) devem apresentar alta velocidade específica de respiração (Q_{O_2}) (SCHMIDELL, 2001). Pirt (1975) sugeriu uma relação linear para relacionar as velocidades:

$$Q_{O_2} = m_o + \frac{1}{y_o} \mu_x \quad (0.18)$$

Onde: m_o = velocidade específica de consumo de oxigênio para a manutenção ($\text{gO}_2 \cdot \text{g}_{\text{cél}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

Y_o = fator de conversão de oxigênio para células ($\text{g}_{\text{cél}} \cdot \text{gO}_2^{-1}$)

A velocidade específica de respiração para manutenção celular (m_o) significa o consumo de oxigênio para $\mu_x = 0$, ou seja, a velocidade específica de consumo de O_2 para manter as células viáveis. Plotando-se os dados de Q_{O_2} em função de μ_x , obtêm-se o valor de m_o e Y_o por meio do coeficiente linear e coeficiente angular da reta de ajuste obtida, respectivamente.

3.7 Extração e caracterização

3.7.1 Extração de P(3HB-co-3HV)

A técnica utilizada para a recuperação intracelular de P(3HB-co-3HV) foi baseada em um novo método estudado e adaptado Dalcanton (2006). Neste método, os filmes eram preparados empregando-se a técnica de solubilização em clorofórmio seguido de evaporação do solvente. A extração do P(3HB-co-3HV), a partir das células de *C. necator* cultivada nos diferentes substratos testados, foi realizada através da melhor condição estudada por Dalcanton (2006), descrita na Figura 3.3.

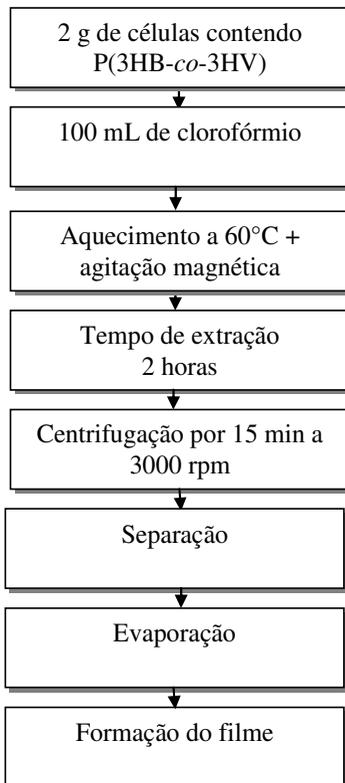


Figura 3.3 - Fluxograma do método de extração das células de *C. necator* cultivada em diferentes substratos para obtenção de P(3HB-co-3HV) (baseado em Dalcanton, 2006)

Ao término do cultivo, as células foram separadas do caldo fermentativo por centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos. O precipitado foi congelado para posterior recuperação do polímero. Foram pesadas 2 g de células, que foram solubilizadas em 100 mL de clorofórmio, em frasco fechado para evitar a evaporação do solvente sob agitação magnética, durante um período de 2 horas. Segundo, Dalcanton (2006), o clorofórmio foi escolhido como solvente na realização de seus estudos em virtude do P(3HB) ser completamente solúvel no mesmo e por ser um dos solventes mais estudados e utilizados para a extração de biopolímeros. A temperatura de extração foi fixada em 60°C, em função do ponto de ebulição do solvente que é de aproximadamente 61,3°C. Após a extração, a solução de clorofórmio e P(3HB-co-3HV) foi

centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos para separação do conteúdo não polimérico. Para evaporação do solvente, a solução contendo o P(3HB-co-3HV) e o solvente foi vertida em placa de Petri, que foi colocada em uma cuba de vidro fechado, obtendo-se assim uma evaporação lenta com melhor formação dos filmes.

A extração foi realizada nas diversas condições de cultivo estudadas, utilizando como fonte de carbono a glicose e o melão cítrico. Os filmes obtidos foram comparados com os filmes padrões adquiridos da P(3HB) Industrial. Depois da extração, foram determinadas as porcentagens de recuperação e pureza para o método utilizado e os filmes foram então caracterizados pelas análises de calorimetria de varredura diferencial (DSC) e por termogravimetria (TGA).

3.7.2 Determinação da porcentagem de pureza e de recuperação de P(3HB-co-3HV)

Uma massa conhecida do filme formado pelo no método de extração foi submetida à metanólise e posterior dosagem de P(3HB-co-3HV) por cromatografia gasosa como descrito no item 3.5.4, para a determinação da porcentagem de pureza do filme, que está expressa na Equação (3.19):

$$\% \text{ pureza} = \frac{m_{PHB}}{m_{filme}} 100 \quad (0.19)$$

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, que é expressa pela Equação (3.20):

$$\% \text{ recuperação} = \frac{m_p}{m_i} 100 \quad (0.20)$$

Sendo:

$$m_p = m_f \cdot \% \text{ pureza} \quad (0.21)$$

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) vezes sua respectiva pureza (Equação 3.21) e m_i é a massa total de P(3HB) nas células antes da extração.

3.7.3 Caracterização de P(3HB-co-3HV)

As análises de caracterização dos filmes de P(3HB-co-3HV) 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-co-3HV) fornecido pela PHB Industrial.

3.7.3.1 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.

3.7.3.2 Termogravimetria (TGA)

As amostras foram avaliadas por análise de TGA 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 $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, sob atmosfera de nitrogênio.

3.8 Tratamento de dados

3.8.1 Ajuste dos dados experimentais

Os dados experimentais obtidos foram ajustados com auxílio *software* Matlab 7.0 e pelo programa *Lissage*, desenvolvido pelo laboratório do “Institut National des Sciences Appliquees de Toulouse”, França, por Ardaillon-Silmoes, Arroyo, Uribelarrea.

3.8.2 Análise cinética

Como o acúmulo de P(3HB-co-3HV) é intracelular, as taxas específicas de crescimento celular e de produção de P(3HB-co-3HV) devem ser calculadas em relação à biomassa residual (X_r), obtida pela diferença entre a quantidade de biomassa total (X_t) e a quantidade de P(3HB-co-3HV) [$X_r = X_t - P(3HB-co-3HV)$].

3.8.2.1 Velocidades específicas de crescimento

As velocidades específicas máximas de crescimento na fase de crescimento não limitado foram calculadas a partir do coeficiente angular da curva linearizada pelo logaritmo neperiano da biomassa residual com o tempo de acordo com a Equação (3.22):

$$\ln(X_r) = \ln(X_{r_0}) + \mu \times t \quad (0.22)$$

Onde: X_r = biomassa residual (g); X_{r_0} = biomassa residual inicial (g); μ = velocidade específica máxima de crescimento celular (h⁻¹) e t = tempo (h)

3.8.3 Fatores de conversão

O fator de conversão foi obtido a partir do coeficiente angular da porção linear do gráfico da quantidade analisada (biomassa, biomassa residual, ou P(3HB-co-3HV)) contra a quantidade de substrato de acordo com a Equação (3.23).

$$Y_{Q/S} = -\frac{dQ}{dS} \quad (0.23)$$

Onde: $Y_{Q/S}$ = fator de conversão de substrato S no componente Q (g.g^{-1});
 Q = componente que pode representar a biomassa, biomassa residual ou P(3HB-co-3HV) (g) e S = substrato utilizado (g).

3.8.4 Produtividade média de P(3HB-co-3HV)

A produtividade média (Equação 3.24) foi calculada pela diferença entre a quantidade de P(3HB-co-3HV) em um instante de tempo t e a quantidade inicial de P(3HB-co-3HV), dividida pelo intervalo de tempo correspondente.

$$Pr = \frac{P(3HB-co-3HV)_t - P(3HB-co-3HV)_{t_0}}{t - t_0} \quad (3.24)$$

Onde: Pr = produtividade média de P(3HB-co-3HV) ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$);
 P(3HB-co-3HV)_t = quantidade de P(3HB-co-3HV) no instante de tempo t (g);
 P(3HB-co-3HV)_{t0} = quantidade de P(3HB-co-3HV) no tempo t0 inicial (g).

3.8.5 Produtividade de P(3HB-co-3HV) na fase de produção

A produtividade na fase de produção (Equação 3.25) foi calculada pela diferença entre a quantidade de P(3HB-co-3HV) em um instante de tempo t após o início da fase de produção e a quantidade de P(3HB-co-3HV) no início da fase de produção, dividida pelo intervalo de tempo correspondente a estas concentrações.

$$Pp = \frac{P(3HB-co-3HV)_t - P(3HB-co-3HV)_{t_i}}{t - t_i} \quad (0.24)$$

Onde: P_p = produtividade na fase de produção ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$); P(3HB-co-3HV)_t = quantidade de P(3HB-co-3HV) no instante de tempo t após o início da fase de produção (g) e P(3HB-co-3HV)_{t_i} = quantidade de P(3HB-co-3HV) no tempo t_i inicial da fase de produção (g).

3.9 Modelagem do crescimento microbiano

3.9.1 Modelos Primários

Os modelos primários utilizados para o ajuste das curvas de crescimento foram: modelo de Gompertz Modificado, modelo Logístico e modelo de Barany Roberts. Os modelos foram usados para derivar uma expressão para os parâmetros biológicos de formação de biomassa 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 3.4, foram calculados para o modelo que melhor se ajustou às curvas de crescimento de *C. necator*. Os modelos primários utilizados para o ajuste são descritos a seguir.

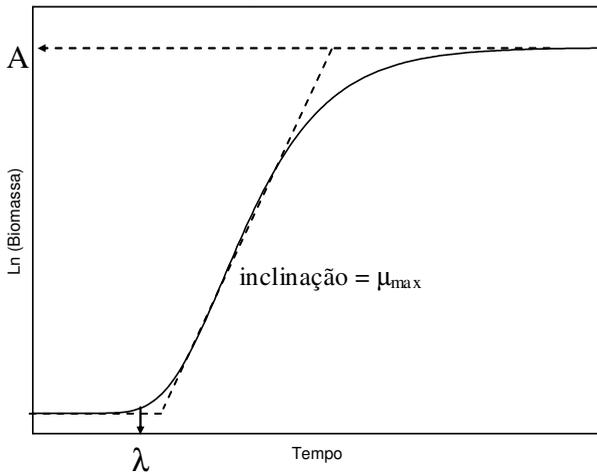


Figura 3. 4 - Curva típica de crescimento microbiano em função do tempo, apresentando os parâmetros biológicos de crescimento

3.9.1.1 Modelo de Gompertz Modificado

O ajuste do modelo de Gompertz aos dados experimentais é descrito pela Equação (3.26), segundo Erkmen, (2000):

$$\ln\left(\frac{x}{x_0}\right) = A \cdot \exp\left[-\exp\left[-B \cdot (t - M)\right]\right] \quad (0.25)$$

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 o aumento logaritmo da população, obtido por $\text{Ln}(X_\infty/X_0)$ 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, pode-se calcular a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max} = B.A/e$ (h^{-1}), onde $e=2,7182$) e a duração da fase lag ($\lambda = M - (1/B)$ (h)).

O modelo de Gompertz Modificado é a reparametrização do modelo apresentado anteriormente (Equação 3.26) e para a conclusão direta dos parâmetros de crescimento é expresso pela Equação (3.27) (Erkmen, 2002):

$$\text{Ln}\left(\frac{X}{X_0}\right) = A \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_{\max} \cdot e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (0.26)$$

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 $t = \infty$, 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 Matlab 7.0.

3.9.1.2 Modelo Logístico

O modelo Logístico foi aplicado de acordo com a Equação (3.28) (Erkmen, 2000):

$$\text{Ln}\left(\frac{X}{X_0}\right) = \frac{A}{[1 + \exp(D - B.t)]} \quad (0.27)$$

onde: $\text{Ln}(X/X_0)$ 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 ($\mu_{\max} = A.B/4$ [h^{-1}]) e a duração da fase lag ($\lambda = (D-2)/B$ [h]). Os dados experimentais foram ajustados segundo o modelo Logístico com auxílio do *software* Matlab 7.0

Estes modelos foram numericamente ajustados às curvas de crescimento de *C. necator* nas diferentes fontes de carbono e experimentos testados.

3.9.1.3 Modelo Barany e Roberts

Barany e Roberts introduziram um modelo mecanístico para avaliar o crescimento bacteriano. Brevemente, a fase lag é atribuída à necessidade de sintetizar um substrato desconhecido q , o qual é crítico para o crescimento. Uma vez que as células tenham se adaptado ao novo ambiente, elas irão crescer exponencialmente até que ocorra alguma limitação no meio de crescimento, como descrito pela Equação (3.29) (McKELLAR e LU, 2004):

$$\frac{dx}{dt} = \frac{q(t)}{q(t) + 1} \mu_{\max} \left(1 - \left(\frac{x(t)}{x_{\max}} \right)^m \right) x(t) \quad (0.28)$$

Onde x é o número de células no tempo t , x_{\max} é a máxima densidade celular atingida, e $q(t)$ é a concentração limitante de substrato, a qual muda com o tempo conforme a Equação (3.30):

$$\frac{dq}{dt} = \mu_{\max} \cdot q(t) \quad (0.29)$$

O valor inicial de q (q_0) é a medida do estado fisiológico inicial das células. A transformação mais estável para (q_0) pode ser definido pela equação (3.31):

$$h_0 = \ln \left(1 + \frac{1}{q_0} \right) = \mu_{\max} \lambda \quad (0.30)$$

O parâmetro m caracteriza a curvatura antes da fase estacionária. Quando $m=1$, a função reduz para uma curva logística, e uma simplificação do modelo é assumida. Assim, o modelo final possui quatro parâmetros: x_0 , o número inicial de células; h_0 ; $x_{m\acute{a}x}$ e $\mu_{m\acute{a}x}$.

Uma versão explícita do modelo de Barany e Roberts é obtida pela derivação da Equação (3.29), conforme apresentado nas Equações (3.32) e (3.33):

$$y(t) = y_0 + \mu_{m\acute{a}x} A(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m\mu_{m\acute{a}x} A(t)} - 1}{e^{m(y_{m\acute{a}x} - y_0)}} \right) \quad (0.31)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{v} \ln \left(\frac{e^{-vt} + q_0}{1 + q_0} \right) \quad (0.32)$$

Onde $y(t) = \ln x(t)$, $y_0 = \ln x_0$, e v é a taxa de aumento do substrato limitante, geralmente assumido como $\mu_{m\acute{a}x}$. Os dados experimentais foram ajustados segundo o modelo de Barany e Roberts através da aplicação do programa DMFit, distribuído pelo Institute of Food Research in U.K. (<http://www.ifr.bbsrc.ac.uk/Safety/DMFit/default.html>) (McKELLAR e LU, 2004).

3.10 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 3.34), melhor é o ajuste do modelo aos dados experimentais.

$$MSE = \frac{RSS}{n} = \frac{\sum (\text{Valor}_{\text{observado}} - \text{Valor}_{\text{predito}})^2}{n} \quad (0.33)$$

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 (3.35):

$$\text{fator bias} = 10^{\left(\frac{\sum \log(\text{Valor}_{\text{observado}} / \text{Valor}_{\text{predito}})}{n} \right)} \quad (0.34)$$

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 3.36) é uma medida da diferença média absoluta entre os valores preditos e observados.

$$\text{fator de exatidão} = 10^{\left(\frac{\sum |\log(\text{Valor}_{\text{observado}} / \text{Valor}_{\text{predito}})|}{n} \right)} \quad (0.35)$$

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 Produção de P(3HB-co-3HV) por *Cupriavidus necator* utilizando glicose como fonte de carbono

A fonte de carbono é talvez o parâmetro que mais influencie no crescimento do microrganismo. Tal fato levou à realização de cultivos buscando estudar as condições de crescimento do microrganismo *C. necator* em meio sintético (glicose), que servirão de base para estudo em substrato de baixo custo.

4.1.1 Identificação da fase de produção de P(3HB-co-3HV) por *Cupriavidus necator*

Em culturas de *C. necator*, a identificação do início da fase de produção é uma etapa muito importante do processo, pois é neste momento que se iniciam as alimentações de ácido propiônico para a formação do copolímero. Além disso, se o ácido propiônico for alimentado antes do início da fase de produção, o microrganismo pode utilizá-lo para crescimento em detrimento da produção do copolímero, levando a um desperdício do co-substrato, com maiores custos de produção.

A identificação do início da fase de produção/limitação de nitrogênio foi efetuada em duas etapas. A primeira com estimativa da biomassa presente no bioreator pela análise de absorvância e, uma vez atingida esta biomassa, deu-se início a segunda etapa determinada através da observação da rápida elevação de oxigênio dissolvido no meio pela leitura em eletrodo polarográfico.

A estratégia escolhida para este trabalho foi a produção de P(3HB-co-3HV) em cultivo sob carência de nitrogênio e com alimentação contínua em ácido propiônico, na fase de produção, para promover a incorporação das unidades 3HV. A alimentação contínua em ácido propiônico foi baseada em estudos anteriores realizados por Anderson e Madden (1998), Marangoni (2000) e Squio (2003). A alimentação de uma solução com concentração de 80 g.L⁻¹ de ácido propiônico foi iniciada no momento em que foi detectada a fase de produção.

Dessa forma, o objetivo desta etapa foi definir uma metodologia para determinar o momento da limitação do cultivo, referente ao início da fase de produção.

4.1.1.1 Estimativa do momento da limitação

A concentração de nitrogênio na fase de crescimento foi de 1 g.L^{-1} , suficiente para produzir cerca de 8 g.L^{-1} de biomassa, baseado no fator de conversão de nitrogênio em células, $Y_{X/N}=8,33 \text{ g}_{\text{célula}} \cdot \text{g}_{\text{nitrogênio}}^{-1}$ (REPASKE, 1976). Durante a cultura foi feito o acompanhamento da medida de absorbância que, através de uma relação anteriormente estabelecida, pode ser convertida em concentração de biomassa. Estudos anteriores do grupo mostraram que existe uma relação linear entre a biomassa residual e a absorbância, válida apenas na fase de crescimento, que é dada pela Equação 4.1:

$$X_r = 0,332 \cdot \text{Abs} \quad (0.1)$$

Onde: Abs representa a leitura de absorbância e X_r é a biomassa residual expressa em g.L^{-1} .

Portanto, medindo-se a absorbância e usando a Equação (4.1) tem-se o valor aproximado da biomassa presente no reator e, através da aplicação da Equação (4.2), pode-se estimar o momento do início da fase de produção.

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu \cdot t \quad (0.2)$$

Onde: X = biomassa a ser atingida ao final da fase de crescimento; X_0 = biomassa inicial do cultivo (estimada pela relação absorbância *versus* biomassa); μ = velocidade específica de crescimento; t = tempo necessário para atingir a exaustão de nitrogênio.

Próximo ao momento da limitação, o qual é acompanhado pela concentração de biomassa estimada pela Equação (4.2), observa-se o eletrodo polarográfico para acompanhar o rápido aumento da concentração de oxigênio dissolvido no meio. Quando ocorre a limitação de um nutriente essencial ao crescimento celular, o

metabolismo da célula diminui, assim como a sua velocidade específica de crescimento e respiração, correspondendo à fase estacionária de crescimento. Com isso, a concentração de oxigênio dissolvido disponível no sistema tende a aumentar visto que a velocidade em que este é consumido diminui. A Figura 4.1 apresenta o momento em que ocorre o aumento da porcentagem de O_2 dissolvido no meio, indicando a limitação de um nutriente no caso o nitrogênio, e o início da fase de produção de copolímero P(3HB-co-3HV). Neste momento se inicia a efetiva limitação do elemento limitante, como pode ser observado na Figura 4.1.

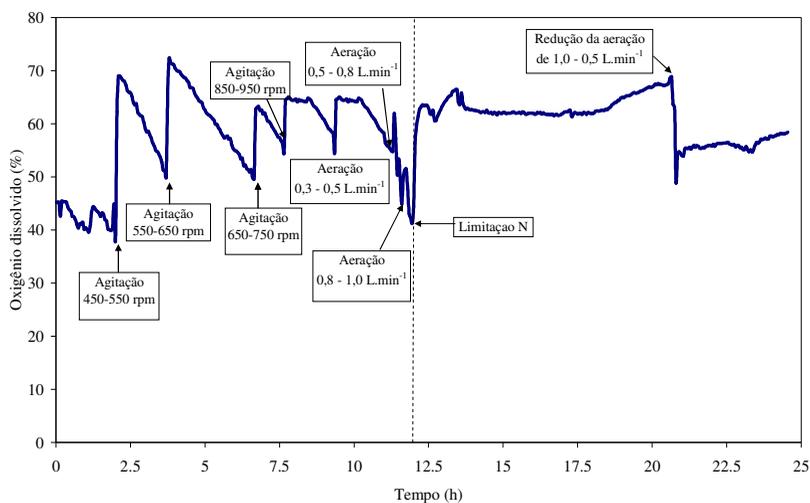


Figura 4.1 - Momento da limitação em nitrogênio observado pelo aumento da porcentagem de oxigênio dissolvido no cultivo em meio sintético (glicose) para a produção de P(3HB-co-3HB) por *C. necator*

A Figura 4.2 apresenta a evolução da curva de crescimento do microrganismo, expresso em $\ln(\text{abs}/\text{abs}_0)$ e a concentração de nitrogênio em função do tempo (h) de cultivo. A linha pontilhada representa o momento da limitação do cultivo. Neste ponto são administrados o pulso de carbono (glicose) e a alimentação contínua de ácido propiônico.

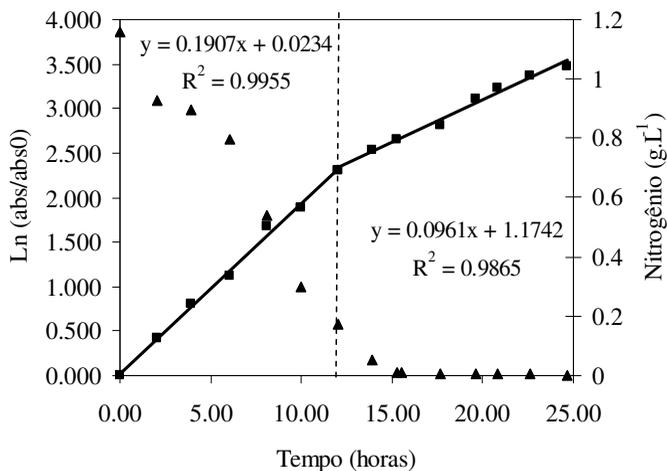


Figura 4.2 - Acompanhamento do crescimento de *C. necator*, expressado em $\text{Ln}(\text{Abs}/\text{Abs}_0)$ e da concentração de nitrogênio versus o tempo, durante o cultivo em meio sintético para produção de P(3HB-*co*-3HV). A linha pontilhada indica o momento da limitação

Observa-se na Figura 4.2 a definição de duas distintas fases de crescimento. Na primeira fase ocorre o crescimento exponencial, não limitado, com uma velocidade específica máxima de crescimento de $0,19 \text{ h}^{-1}$, tendo duração de aproximadamente 12 h. A segunda fase é definida como fase de produção do polímero. A cultura não apresentou fase lag, ou seja, fase de baixa velocidade de crescimento, onde o microrganismo se adapta às condições do meio. O valor encontrado para velocidade específica máxima de crescimento de *C. necator* em glicose ($0,19 \text{ h}^{-1}$) está de acordo com os valores relatados na literatura ($0,20 \text{ h}^{-1}$) por Kim e Lee (1993) e ($0,23 \text{ h}^{-1}$) por Marangoni (2000).

Na Figura 4.3, encontra-se a evolução da massa de biomassa total versus a concentração de nitrogênio em função do tempo. Observa-se que no momento da limitação do cultivo ($0,179 \text{ g.L}^{-1}$ de nitrogênio, caracterizado pela linha pontilhada) a concentração celular era de aproximadamente $7,5 \text{ g.L}^{-1}$, fator indicativo da limitação em nitrogênio no meio. Visto que a limitação foi atingida, realizou-se então o pulso de carbono e a alimentação contínua de ácido propiônico para promover a produção do copolímero P(3HB-*co*-3HV).

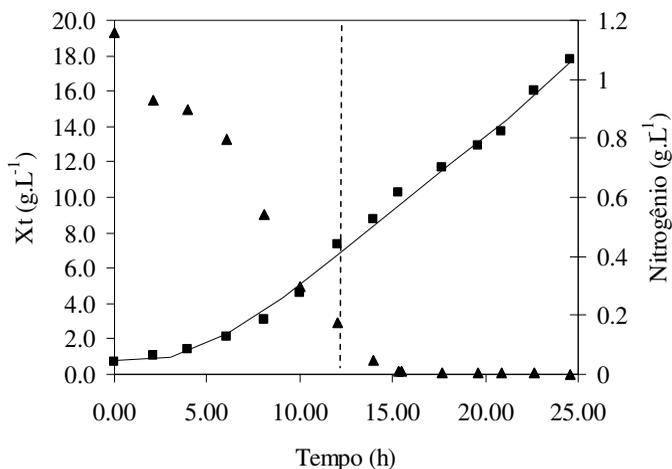


Figura 4.3 - Evolução da biomassa total e da concentração de nitrogênio em função do tempo para a cultura conduzida em meio sintético para produção do copolímero P(3HB-co-3HV)

4.1.2 Características gerais da fase de crescimento e de produção de P(3HB-co-3HV) por Cupriavidus necator a partir de meio sintético (glicose) como fonte de carbono

Dois cultivos (A e B) foram realizados para produção do copolímero P(3HB-co-3HV) em meio sintético, utilizando-se glicose como substrato, com alimentação contínua em ácido propiônico (substrato precursor de 3HV). Serão apresentados apenas os gráficos dos dados de cultivo da cultura A. No Anexo I, Figura A.5, A.6 e A.7, encontram-se as curvas que ilustram o comportamento da cultura B. Os cultivos foram conduzidos em batelada alimentada. A evolução da concentração de proteínas, biomassa total (X_t), biomassa residual (X_r), concentração de nitrogênio e produção do copolímero P(3HB-co-3HV) para a cultura A é apresentada na Figura 4.4.

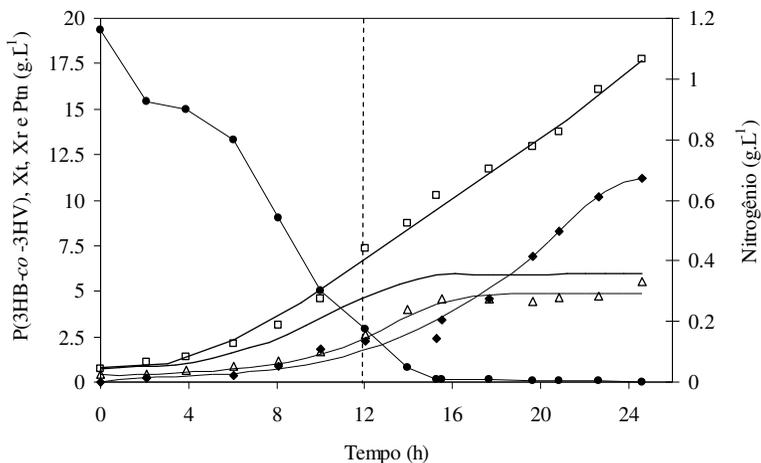


Figura 4.4 - Evolução das concentrações de biomassa total (X_{total} ; □) e residual (X_r ; □□□), proteína (Ptn; Δ), nitrogênio (●) e produção do copolímero (P(3HB-co-3HV); ◆) para o cultivo realizado em glicose. Os pontos representam os dados experimentais e as linhas o ajuste pelo *software Lissage*

As culturas foram realizadas por um período de aproximadamente 25 horas. A fase de produção inicia-se quando ocorre a limitação do nitrogênio, representada pela linha pontilhada, e teve duração de aproximadamente 13 horas. Durante a fase de crescimento não limitado (fase à esquerda) ocorre o crescimento exponencial da biomassa total e do conteúdo de proteínas. Quando o microrganismo produz um material de estocagem intracelular, a biomassa total (X_{total}) corresponde de duas fases: a concentração de P(3HB-co-3HV) e a concentração de biomassa residual (X_r), onde X_r é calculado através da diferença entre a biomassa total e a concentração de P(3HB-co-3HV) ($X_r = X_{total} - X_{P(3HB-co-3HV)}$) (HEINZLE e LAFFERTY, 1980; citado por SUZUKI *et al.* 1986b).

Na fase de crescimento, o aumento da biomassa total (X_t) resulta no aumento da biomassa residual (X_r), que não corresponde integralmente ao valor da biomassa total, indicando um pequeno acúmulo do polímero durante a fase de crescimento. A concentração de copolímero acumulado até o momento da limitação em nitrogênio foi de $2,3 \text{ g.L}^{-1}$, correspondentes à massa 6,4 g de copolímero, que representam 22,7 % da biomassa total. A partir deste momento a produção de P(3HB-co-3HV) é acelerada. A quantidade final de polímero acumulada foi de 52,5 g, correspondentes à concentração de $11,2 \text{ g.L}^{-1}$, a qual representa 67,7 % de acúmulo intracelular, com 4,4 mol% de unidades

3HV incorporadas ao copolímero.

Um resumo dos dados gerais obtidos nas culturas A e B estão apresentados na Tabela 4.1. Nesta Tabela 4.1 foram adicionados dados de cultivo para Cultura A, equivalentes ao mesmo período de duração da fase de produção para Cultura B, como base de comparação. Observa-se comportamento similar para ambas as culturas com produção do copolímero de $10,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de P(3HB-co-3HV), correspondentes a 63,7 % de acúmulo intracelular para a cultura A e de $10,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de P(3HB-co-3HV), correspondentes a 51,9 % de acúmulo intracelular para cultura B.

Tabela 4.1 - Resumo dos dados gerais obtidos nas culturas realizadas com glicose como fonte de substrato para produção de P(3HB-co-3HV)

Fase de crescimento									
Cultura	Tempo (h)	N ₂ (g·L ⁻¹)	X _i (g·L ⁻¹)	PHBV (g·L ⁻¹)	X _r (g·L ⁻¹)	P _{tn} (g·L ⁻¹)	Y _{Xi/S} (g _{cél.} ·g _S ⁻¹)	Y _{Xi/N} (g _{cél.} ·g _{N2} ⁻¹)	PHBV (%)
A	12,0	0,99	7,5	1,7	5,8	2,6	0,52	7,8	22,7
B	14,0	0,98	8,4	2,6	5,8	2,8	0,48	8,9	30,9
Fase de produção									
Cultura	Tempo (h)	N ₂ (g·L ⁻¹)	X _i (g·L ⁻¹)	PHBV (g·L ⁻¹)	X _r (g·L ⁻¹)	P _{tn} (g·L ⁻¹)	Y _{Xi/S} (g _{cél.} ·g _S ⁻¹)	Y _{PHBV/S} (g _{PHBV} ·g _S ⁻¹)	PHBV (%)
A	10,5	----	16,0	10,2	6,6	5,5	0,3034	0,3553	63,7
B	10,9	----	20,6	10,7	9,9	4,5	0,4238	0,3128	51,9

Na fase de crescimento, os resultados obtidos para os valores de $Y_{Xi/S}$ e $Y_{Xi/N}$ foram de $0,52 \text{ g}_{\text{célula}}\cdot\text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ e $7,8 \text{ g}_{\text{célula}}\cdot\text{g}_{\text{nitrogênio}}^{-1}$, para cultura A e de $0,48 \text{ g}_{\text{célula}}\cdot\text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ e $8,9 \text{ g}_{\text{célula}}\cdot\text{g}_{\text{nitrogênio}}^{-1}$, para a cultura B, respectivamente. Na fase de produção, observa-se valor superior de $Y_{Xi/S}$ ($0,43 \text{ g}_{\text{célula}}\cdot\text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$) para cultura B em comparação à cultura A ($0,30 \text{ g}_{\text{célula}}\cdot\text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$). Para o cálculo do fator de conversão ($Y_{PHBV/S}$) foi considerado o consumo do substrato total adicionado ao cultivo, ou seja, glicose e ácido propiônico. No entanto, para esta fase o valor para o fator de conversão do copolímero P(3HB-co-3HV) apresentou-se ligeiramente superior para cultura A ($0,36 \text{ g}_{\text{polímero}}\cdot\text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$) em relação à cultura B ($0,31 \text{ g}_{\text{polímero}}\cdot\text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$), justificando desta forma o maior acúmulo de polímero para esta cultura (63,7 %, com 4,4 mol% de unidades 3HV) em comparação à cultura B (51,9 %, com 2,7 mol% de frações 3HV). Estes valores apresentaram perfil característico em

relação aos valores teóricos sugeridos para *C. necator* ($Y_{X/S} = 0,5 \text{ g}_{\text{célula}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$, $Y_{X/N} = 8,33 \text{ g}_{\text{célula}} \cdot \text{g}_{\text{nitrogênio}}^{-1}$ e $X_{\text{PHVB/S}} = 0,33 \text{ g}_{\text{polímero}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$) (REPASKE, 1976, ARAGÃO, 1996). A porcentagem de acúmulo do polímero P(3HB-co-3HV) e dos monômeros P(3HB) e P(3HV) foram determinadas através da análise de cromatografia gasosa, conforme método de metanólise descrito no item 3.5.4.

Para investigar a baixa porcentagem de acúmulo das unidades 3HV foi realizado o cálculo da conversão de substrato em biomassa e conteúdo de polímero, expressos na convenção C-mol (ROELS, 1983), para avaliar se a fonte de co-substrato administrada para incorporação das unidades 3HV foi consumida para promover o crescimento celular em detrimento do acúmulo de polímero. Os fatores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$), o fator de conversão de substrato em P(3HB) ($Y_{3\text{HB}/\text{glicose}}$) e fator de conversão de substrato em P(3HV) ($Y_{3\text{HV}/\text{ác. prop}}$) estão apresentados na Tabela 4.2. As culturas A e B, realizadas em glicose para produção do copolímero P(3HB-co-3HV), foram comparadas a uma cultura, também realizada em glicose, para produção do homopolímero P(3HB). Segundo Marangoni (2000), que também estudou a estratégia de alimentação contínua de ácido propiônico nas mesmas condições deste estudo e determinou a concentração deste substrato ao longo da cultura, todo ácido é consumido à medida que o mesmo é adicionado ao meio. Como não foram realizadas análises para determinação de ácido propiônico em nossos estudos, a evolução do consumo deste substrato foi calculada baseando-se na concentração da solução (aproximadamente $0,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e no volume adicionado no decorrer do tempo do cultivo, considerando-se que tudo o que foi adicionado foi consumido.

Observa-se na Tabela 4.2, que os fatores de conversão $Y_{3\text{HB}/\text{glicose}}$ para as culturas A e B foram inferiores e de $0,50 \text{ Cmol} \cdot \text{Cmol}^{-1}$ e $0,43 \text{ Cmol} \cdot \text{Cmol}^{-1}$, respectivamente, comparados ao da cultura C, que apresentou valor de $0,57 \text{ Cmol} \cdot \text{Cmol}^{-1}$. O fator de conversão $Y_{\text{Pol}/\text{substrato}}$ apresentou valores de $0,41 \text{ Cmol} \cdot \text{Cmol}^{-1}$ e $0,42 \text{ Cmol} \cdot \text{Cmol}^{-1}$ para as culturas A e B, respectivamente. Este fator de conversão deveria apresentar valores superiores para as culturas A e B, em relação à cultura C, pelo fato desta cultura apresentar administração de co-substrato para incorporação das unidades 3HV. No entanto, este fato não foi observado, sugerindo que o microrganismo *C. necator* pode ter utilizado este co-substrato para crescimento celular em detrimento do acúmulo de polímero. Desde que o ácido propiônico gera tanto precursores propionil-CoA, para incorporação das unidades 3HV, como precursores acetil-CoA, que pode ser disponível tanto para acúmulo do

homopolímero P(3HB) quanto para crescimento celular via ciclo dos ácidos tricarbóxicos, o microrganismo pode desviar sua rota metabólica para geração de biomassa.

Tabela 4.2 - Fator de conversão de substrato em polímeros e monômeros para as culturas com adição de ácido propiônico (A e B) para formação de copolímero e sem (C) para formação de homopolímero

Fator de conversão (Cmol.Cmol ⁻¹)	Cultura A	Cultura B	Cultura C*
Y _{3HB/glicose}	0,50	0,43	0,57
Y _{3HV/ác. prop}	0,14	0,09	-----
Y _{Pol/substrato}	0,41	0,42	0,57

*Cultura C: estudos anteriores realizados produção de homopolímero P(3HB) a partir de glicose (dados não apresentados)

A Tabela 4.3 apresenta os resultados de consumo de substrato e produção de polímero para ambas as culturas, expressos na convenção C-mol (Roels, 1983).

Tabela 4.3 - Conteúdo de carbono consumido e polímero produzido para as culturas (A e B) para produção de copolímero e cultura (C) para produção de homopolímero

		Cultura A	Cultura B	Cultura C*
Consumo de substrato (C-mol)	Glicose	9,51	7,42	4,86
	Ácido propiônico	1,18	0,85	---
Produção de polímero (C-mol)	3HB	2,75	2,75	2,32
	3HV	0,14	0,08	---
	P(3HB-co-3HV)	2,89	2,83	---
	(%) acúmulo	67,7	56,8	78,1

*Cultura C: estudos anteriores realizados produção de homopolímero P(3HB) a partir de glicose (dados não apresentados)

Os resultados de consumo de substrato e produção de polímero

(Tabela 4.3) indicam claramente que o ácido propiônico atuou como indutor do crescimento celular em detrimento do acúmulo das unidades 3HV. Comparando-se as culturas A e B, com a cultura C, em relação à produção do monômero 3HB, observa-se que houve maior consumo de substrato nestas culturas com menor porcentagem de acúmulo do polímero. Quando se avaliou a produção dos monômeros 3HV pelas culturas A e B, observa-se que a cultura A apresentou valor ligeiramente superior ($0,14 \text{ Cmol.Cmol}^{-1}$) quando comparada à cultura B ($0,08 \text{ Cmol.Cmol}^{-1}$), o que é comprovado também pela porcentagem de incorporações de unidades 3HV, que apresentaram valores de 4,4 mol% e 2,7 mol% para as culturas A e B, respectivamente.

O valor máximo teórico para o fator de conversão $Y_{3\text{HV}/\text{ác.prop}}$ foi estimado, considerando-se que, para a síntese do copolímero, todo ácido propiônico adicionado entraria na forma de propionil-CoA, a ser condensado com uma molécula de acetil-CoA, oriunda da degradação do carboidrato, ou seja, cada molécula de ácido propiônico seria integralmente incorporada à unidade HV em formação, de modo que seriam gerados $1,35 \text{ g}_{3\text{HV}} \cdot \text{g}_{\text{ác.prop}}^{-1}$ (GOMEZ *et al.*, 1996). Convertendo este valor para a convenção C-mol, obtém valor de $1,77 \text{ Cmol.Cmol}^{-1}$ equivalente ao fator de conversão máximo teórico para $Y_{3\text{HV}/\text{ác.prop}}$. Desta forma, o baixo acúmulo das unidades 3HV observado para ambas as culturas (Tabela 4.2) foi indicativo da presença de outras vias metabólicas que atuariam competitivamente com a via de síntese de HV direcionando o ácido propiônico para gerar biomassa, energia e CO_2 .

Certamente, o tempo de adição do ácido propiônico também é um fator chave que influencia no acúmulo do copolímero e das frações 3HV. Em nosso estudo, como demonstrado anteriormente (item 4.1.1), o ácido propiônico foi adicionado no tempo ótimo, ou seja, no momento da limitação em nitrogênio e início de acúmulo do polímero (DU *et al.*, 2001b). No entanto, no início da fase de acúmulo o microrganismo já havia sintetizado uma quantidade relativamente alta de P(3HB) e, conseqüentemente, as unidades 3HV no copolímero foram então relativamente baixas. Segundo Du *et al.* (2001b), o acúmulo de P(3HB) superior a 10% durante a fase de crescimento celular irá promover uma queda na velocidade de síntese do polímero na fase de produção, promovendo dessa forma uma pobre utilização do ácido propiônico, e conseqüentemente a concentração das unidades 3HV no copolímero será baixa. Isso possibilita um acúmulo de ácido propiônico no meio de cultura, o qual leva ao aumento de propionil-CoA nas células, as quais aumentam a velocidade de conversão de propionil-CoA à acetil-CoA e CO_2 , de modo correspondente. Conseqüentemente, a conversão de ácido

propiónico em unidades 3HV decresce, desviando então o ácido propiónico para acúmulo de biomassa.

A produtividade média em P(3HB-co-3HV) para as culturas A e B está ilustrada na Figura 4.5 (a). Observa-se um valor de produtividade média máxima de $0,54 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ determinado para a cultura A e $0,50 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ determinado para a cultura B. Na Figura 4.5 (a), percebe-se que a curva de produtividade em polímero tanto para a cultura A quanto para a cultura B, ainda está em ascensão, sugerindo a possibilidade de aumento deste valor. Quando se avaliam os valores de produtividade média na fase de produção, observa-se que os experimentos apresentaram valores máximos em torno de $1,07 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $1,11 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, para as culturas A e B, respectivamente (Figura 4.5 (b)). Apesar do valor da produtividade média na fase de produção ser maior para a cultura B, não foi possível manter o valor máximo obtido para essa cultura ao contrário do comportamento obtido na cultura A, que manteve os valores próximos à produtividade máxima até o final da cultura, justificando o maior acúmulo de polímero para a mesma.

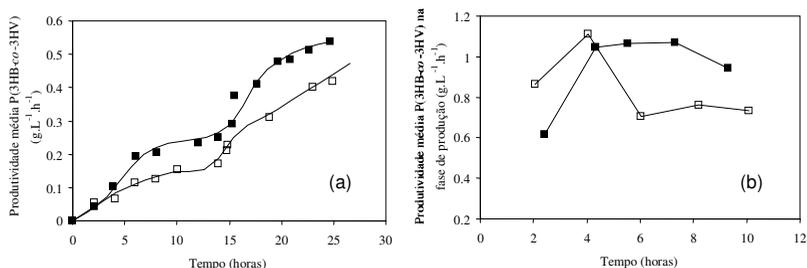


Figura 4.5 - Produtividade de P(3HB-co-3HV) em toda a cultura (a) e na fase de produção (b) para as culturas A (■) e B (□) tendo como fonte de substrato glicose

Baseado na análise destes resultados foi possível avaliar o comportamento do microrganismo *C. necator* em meio sintético, com definição de parâmetros importantes do cultivo e definição do momento exato da limitação para posterior comparação com cultivo realizado em melaço cítrico, verificando assim a viabilidade de produção de P(3HB-co-3HV) neste substrato.

Este estudo demonstrou que o rápido aumento da porcentagem de oxigênio dissolvido no meio no momento da limitação, que pode ser acompanhado pela estimativa da biomassa presente no cultivo,

apresentou-se como bom método para indicar o início da fase de produção de P(3HB-co-3HV) e marcar o início da alimentação em ácido propiônico. Como este método é simples e prático e pode ser monitorado durante a cultura, a partir desta etapa, este método foi adotado para identificação da fase de produção dos demais cultivos realizados.

4.2 Produção de poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) em melão cítrico

A avaliação econômica do processo de produção de P(3HB-co-3HV) indica que a fonte de substrato tem uma contribuição importante no custo de produção do polímero. Estudos já comprovaram a viabilidade de produção de P(3HB) a partir de melão cítrico (FIORESE, 2004; IENCZAK, 2006). Com o objetivo de reduzir os custos de produção do copolímero P(3HB-co-3HV) e sendo que os resultados obtidos para produção de P(3HB) com melão cítrico por Fiorese (2004) e Ienczak (2006) mostraram-se satisfatórios, realizaram-se ensaios com este substrato com o objetivo de reduzir o custo de produção e avaliar a viabilidade do mesmo na produção do copolímero P(3HB-co-3HV). No entanto, os resíduos presentes no melão cítrico provocam problemas na determinação da massa seca e no processo de *down stream* para a recuperação do polímero. No intuito de diminuir a quantidade destes resíduos, se fez necessária a pesquisa de uma técnica que possa suprir essas necessidades. Dessa maneira, foi utilizada a técnica de ultrafiltração do melão com o intuito de diminuição destes resíduos.

4.2.1 Estudo de pré-tratamentos necessários para utilização do melão como substrato

4.2.1.1 Teste de filtração em membrana Millipore Pelicon XL

O teste de ultrafiltração foi realizado com uma membrana PELICON XL da marca Millipore. A membrana possui diâmetro de poro de 0,2 μm e área de filtração de 50 cm^2 . O teste visou à filtração de melão cítrico utilizando duas membranas para a filtração, tendo como finalidade aumentar a área (no caso da utilização de uma única membrana) e, conseqüentemente a vazão de filtração.

4.2.1.1.1 Filtração do melão utilizando membrana de ultrafiltração

As etapas realizadas no processo de filtração do melão cítrico em membrana de 0,2 μm estão representadas no Fluxograma exposto na Figura 4.6.

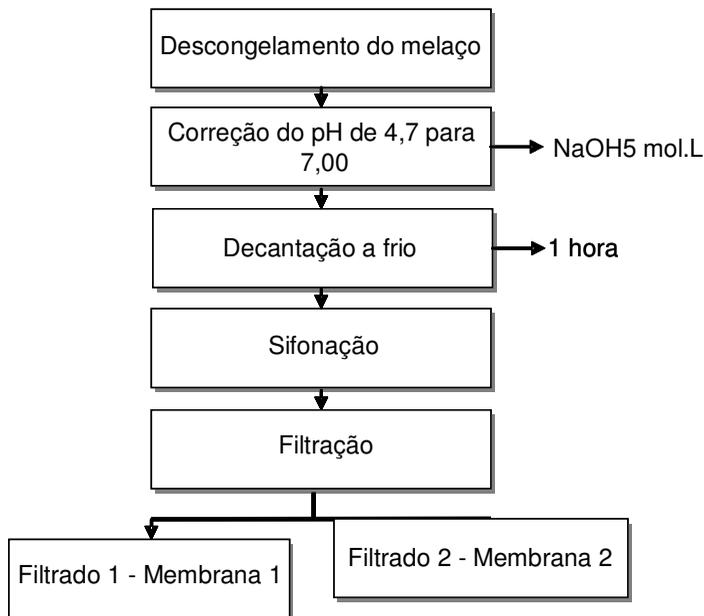


Figura 4.6 - Fluxograma de pré-tratamento do melão para o ensaio de filtração

Para o processo de filtração, o melão foi inicialmente descongelado em temperatura ambiente, havendo a correção do pH inicial de 4,70 para 7,00 com uma solução de NaOH 5 mol.L⁻¹. Após esta etapa, o melão foi mantido resfriado, em geladeira, por um período de aproximadamente 1 hora para que ocorresse a decantação de compostos. Em seguida, realizou-se a separação do sobrenadante através de sifonação, com o auxílio de mangueiras de silicone previamente esterilizadas e posterior filtração, com o auxílio de duas membranas de ultrafiltração, obtendo-se dessa forma o filtrado 1 e o filtrado 2. O uso de duas membranas se fez necessário para promover o aumento da vazão e da área de filtração. As condições de filtração estão descritas a seguir:

Temperatura de filtração: 35°C

Área de filtração (para cada membrana): 50 cm²

Tamanho do poro: 0,2 μm

Agitação constante do melaço a fim de evitar sua precipitação.

Volume inicial de filtração: 3L

Para a filtração do melaço fez-se necessária a preparação da membrana com o processo de transbordamento, na qual água destilada foi circulada pela membrana para remoção de elementos traço presentes na solução de estocagem contida na mesma. Em seguida, circulou-se solução tampão fosfato pH 7,00 com o objetivo de pré-condicionar a membrana para etapas de filtração. Análises de açúcares redutores totais (ART) e nitrogênio foram realizadas para verificar se estes compostos ficariam ou não retidos pela membrana. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Resultados das análises de ART e Nitrogênio para o teste de filtração do melaço cítrico utilizando duas membranas de ultrafiltração

Amostras	ART (g.L^{-1})	N(g.L^{-1})
Antes de filtrar	73,22	0,066
Filtrado 1	72,10	0,053
Filtrado 2	71,84	0,055

Através da Tabela 4.4, pode-se observar que a concentração de ART para as amostras antes e após o processo de filtração apresentou pouca diferença, indicando que, no processo de filtração, os açúcares redutores totais não ficaram retidos na membrana de ultrafiltração. Na análise de nitrogênio, o mesmo comportamento foi observado. A Figura 4.7 apresenta a redução dos sólidos suspensos presentes no melaço após o método de ultrafiltração, com a utilização de duas membranas, processo no qual foi possível manter uma vazão de filtração de 200 mL de filtrado. h^{-1} .

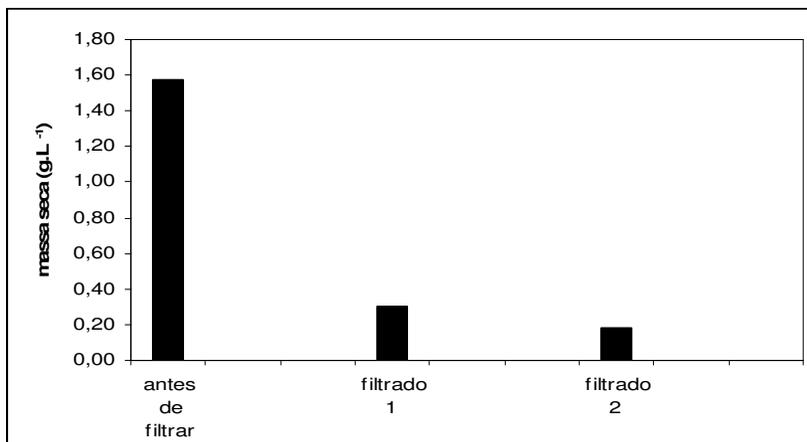


Figura 4.7 - Concentração de massa seca para o teste de filtração do melão em membrana de ultrafiltração

Os dados apresentados na Figura 4.7 indicam claramente a redução dos sólidos suspensos presentes no melão através do método de ultrafiltração, apresentando-se como um método eficiente para a eliminação destes resíduos em escala laboratorial e facilitando assim sua utilização para realização de cultivos visando à produção do copolímero P(3HB-*co*-3HV).

Este procedimento é de fundamental importância para os estudos em escala laboratorial. No entanto, para ampliação a nível de escala industrial, seria necessária a otimização deste processo, através da utilização de membranas com maior área de filtração e, que permitissem dessa forma, maior aplicação de pressão para consequente obtenção de maior vazão de filtrado.

4.2.2 Uso de melão cítrico ultrafiltrado como fonte de carbono

Três cultivos foram realizados visando à produção do copolímero P(3HB-*co*-3HV) a partir de melão cítrico. Para ambos os cultivos, A, B e C utilizou-se melão cítrico filtrado em membrana de ultrafiltração (processo descrito no item 4.2.1.1.1). Após a filtração, o melão cítrico foi armazenado em *freezer* e, para sua utilização, foi descongelado em temperatura ambiente. O melão utilizado para o cultivo A foi pasteurizado em bico de Bunsen até a fervura, visando à destruição de microrganismos presentes no mesmo. Enquanto que o melão utilizado para o cultivo B e C, não foi pasteurizado, pois se queria verificar a

eficiência do processo de ultrafiltração como uma fonte de descontaminação do melão, evitando a etapa de pasteurização e, conseqüentemente, gerando economia no pré-tratamento do melão e aumentando dessa forma a produtividade do processo. O melão, utilizado para a realização dos cultivos, seguiu as seguintes etapas: correção do pH para 7,00 e adição de sais. Quando se adicionaram os sais, observou-se o turvamento e a precipitação de muitos compostos em ambos os cultivos. Estes compostos foram removidos através da sifonação do sobrenadante e centrifugação em centrífuga FANEM, modelo 204-N com rotação de 3500 rpm por 5 minutos para obtenção do volume necessário para a realização do cultivo. A partir deste instante, realizou-se a adição do substrato ao bioreator estéril e houve a inoculação do sistema com o acréscimo do pré-inóculo.

A Figura 4.8 apresenta as etapas de pré-tratamento para o substrato utilizado nos cultivos A, B e C.

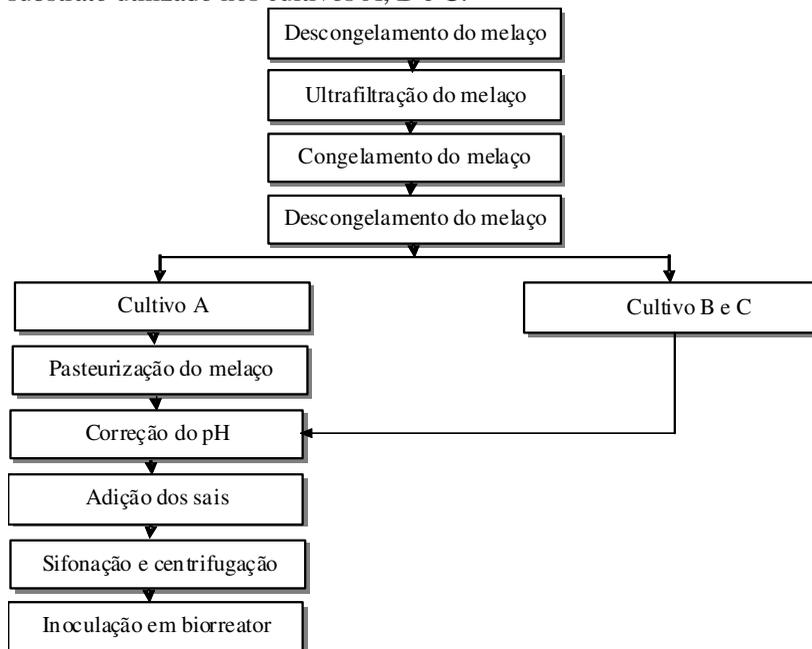


Figura 4.8 - Fluxograma de pré-tratamento do melão para os cultivos A, B e C na produção de P(3HB-co-3HV)

Nesta etapa será realizada a avaliação do melão cítrico pasteurizado (cultura A) como fonte de substrato para produção do

copolímero P(3HB-co-3HV). O cultivo realizado com melaço cítrico, sem a etapa de pasteurização (cultura B), será avaliado no próximo item e comparado a um cultivo, também realizado em melaço cítrico não pasteurizado, alimentado em nitrogênio na fase de produção (cultura C).

4.2.2.1 Cultivo com melaço cítrico ultrafiltrado e pasteurizado para produção do copolímero P(3HB-co-3HV) por *Cupriavidus necator*

A Figura 4.9 apresenta a evolução da curva de crescimento do microrganismo, expresso em $\ln(\text{abs}/\text{abs}_0)$ em função do tempo (h) de cultivo. A linha pontilhada representa o ponto no qual são administrados no cultivo o pulso de carbono (melaço cítrico) e a alimentação contínua de ácido propiônico.

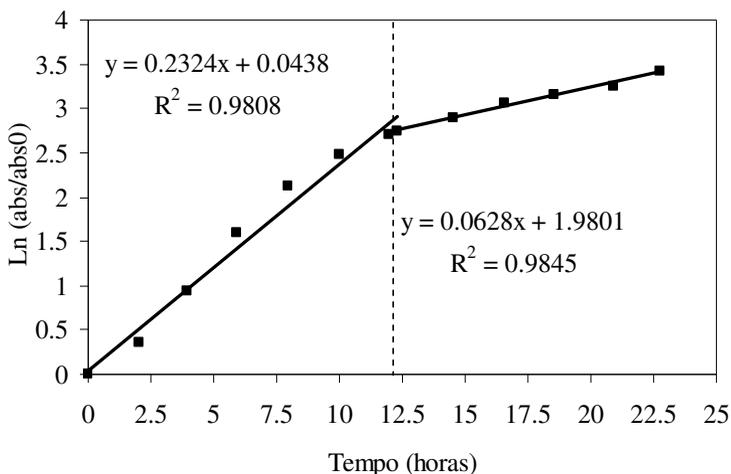


Figura 4.9 - Acompanhamento do crescimento de *C. necator*, expresso em $\ln(\text{Abs}/\text{Abs}_0)$ versus o tempo, durante o cultivo em melaço cítrico pasteurizado

Observa-se na Figura 4.9 a definição de duas fases características de crescimento. Na primeira fase (à esquerda da linha pontilhada) ocorre o crescimento exponencial, não limitado, com uma velocidade específica máxima de crescimento de $0,23 \text{ h}^{-1}$, tendo duração de aproximadamente 12h. A segunda fase, fase de desaceleração (à direita da linha pontilhada), considerada a fase de declínio do crescimento do microrganismo, onde deveria ocorrer carência de algum nutriente essencial para o crescimento e início da fase de produção, apresentou

uma velocidade específica de crescimento de em torno de $0,06 \text{ h}^{-1}$. O valor encontrado para velocidade específica máxima de crescimento de *C. necator* em melão cítrico ($0,23 \text{ h}^{-1}$) foi ligeiramente superior aos cultivos apresentados no item anterior (item 4.1.1.1) realizados em glicose para produção do copolímero P(3HB-co-3HV) ($0,19 \text{ h}^{-1}$) e aos valores relatados na literatura ($0,20 \text{ h}^{-1}$) por Kim e Lee (1993). Estes resultados sugerem que possa existir um efeito potencializador do crescimento em melão cítrico em virtude da complexa composição deste substrato.

A Figura 4.10 apresenta os resultados em concentração para biomassa total (X_t), biomassa residual (X_r), proteína (Ptn) e copolímero P(3HB-co-3HV) para o cultivo utilizando melão cítrico ultrafiltrado e pasteurizado como fonte de substrato para produção de P(3HB-co-3HV).

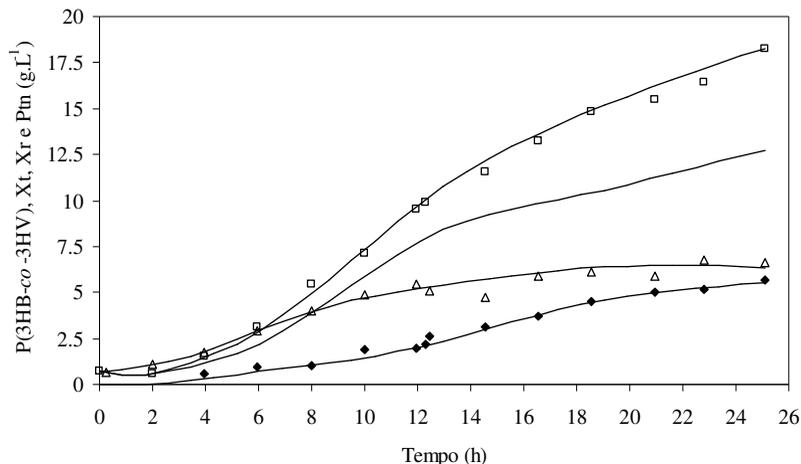


Figura 4.10 - Evolução das concentrações de biomassa total (X_{total} ; \square) e residual (X_r ; \square), proteína (Ptn; Δ) e produção do copolímero (P(3HB-co-3HV); \blacklozenge) para o cultivo realizado em melão cítrico pasteurizado. Os pontos representam os dados e as linhas o ajuste pelo *software Lissage*

A cultura foi realizada por um período de aproximadamente 25 horas. De acordo com a Figura 4.10, o aumento da biomassa total ocorreu até a obtenção de aproximadamente 70 g, correspondente à concentração no meio de $18,3 \text{ g.L}^{-1}$. Durante a fase de crescimento não limitado ocorreu o crescimento exponencial da biomassa total, biomassa residual e do conteúdo de proteínas. A massa de polímero acumulado

durante esta fase de crescimento exponencial foi de 6,0 g, correspondentes à concentração de 2,2 g.L⁻¹, a qual representa aproximadamente 21% da biomassa total. Observa-se que apenas após 16 horas de crescimento não limitado, a curva da biomassa residual assume um comportamento linear, indicando a limitação de nutriente neste instante. O mesmo comportamento é demonstrado pela curva da concentração de proteínas nas células. A produção de P(3HB-*co*-3HV) a partir deste momento é então acelerada. A quantidade de polímero final acumulada foi de 24,5 g, correspondentes a uma concentração de P(3HB-*co*-3HV) no meio de 6,5 g.L⁻¹, representando um acúmulo intracelular de 35,4%, com 9,2 mol% de unidades 3HV incorporadas ao copolímero.

A Figura 4.11 apresenta a evolução da concentração de biomassa total e da concentração de nitrogênio em função do tempo. No entanto, o cultivo não apresentou exaustão do nutriente nitrogênio conforme o esperado. A Figura 4.12 apresenta as variações efetuadas para promover o aumento da agitação e aeração do sistema. Estas variações foram realizadas com o intuito de manter a concentração de OD no meio acima de sua concentração crítica de saturação (30%). No momento da limitação da cultura, como citado anteriormente no item 4.1.1.1, o metabolismo da célula diminuiu, assim como a sua velocidade específica de crescimento e respiração. Dessa forma, a concentração de OD disponível aumenta, comportamento o qual foi observado para este cultivo, fator indicativo da limitação da cultura, sugerindo que a mesma deve ter limitado em algum outro nutriente essencial, como pode ser observado na Figura 4.12.

A alimentação da solução de ácido propiônico e o pulso de melaço cítrico foi administrada com 12 horas de cultivo, como indicado pelo aumento da porcentagem da concentração de oxigênio. Foi promovido um único pulso de melaço, no início da fase de produção, de maneira a restabelecer no sistema a concentração de 40 g.L⁻¹. O fato de o ácido propiônico ter sido adicionado antes da limitação efetiva do cultivo (parece não haver limitação em N) pode justificar a baixa porcentagem de acúmulo intracelular do copolímero (35,4%) e baixa porcentagem de incorporação das unidades 3HV (9,22 mol%).

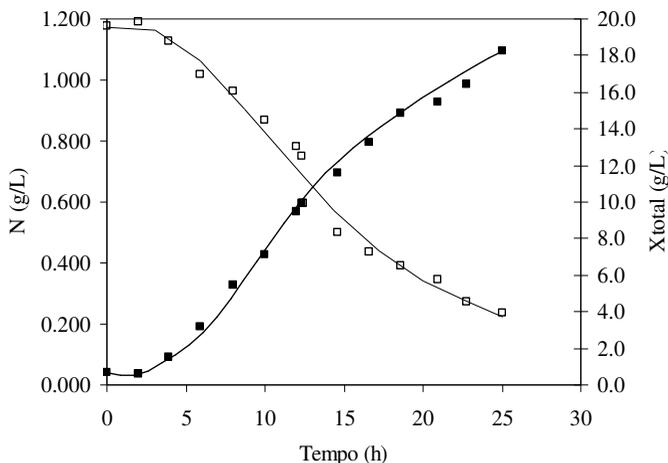


Figura 4.11 - Evolução da concentração de biomassa total (■) e de nitrogênio (□) versus o tempo de cultivo durante cultura utilizando melão cítrico pasteurizado como fonte de substrato para produção de P(3HB-co-3HV) por *Cupriavidus necator*

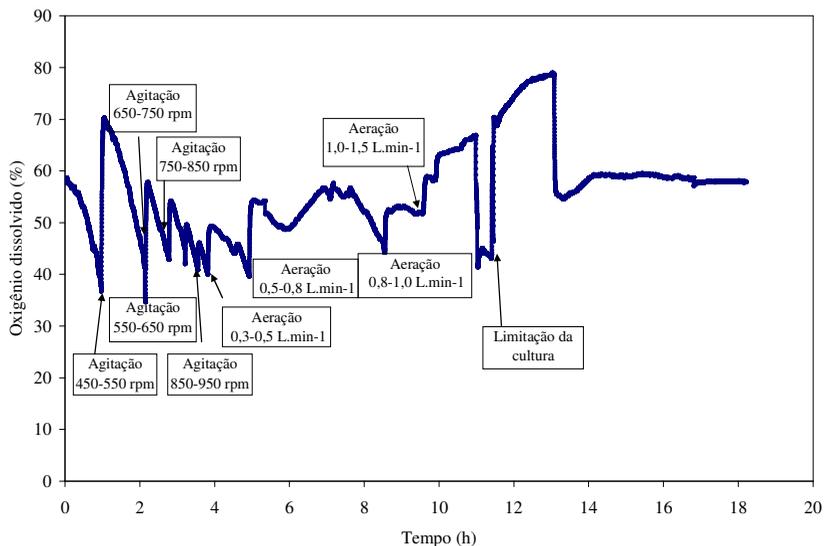


Figura 4.12 - Momento da limitação da cultura observado pelo aumento da porcentagem de OD no cultivo em melão cítrico para a produção de P(3HB-co-3HB) por *C. necator*

As Figuras 4.13 (a), (b) e (c) apresentam os dados básicos para o cálculo dos parâmetros $Y_{Xt/S}$, $Y_{Xt/N}$ e $Y_{\text{ác.prop}/3HV}$, respectivamente, para o cultivo realizado em melão cítrico pasteurizado na produção do copolímero P(3HB-co-3HV).

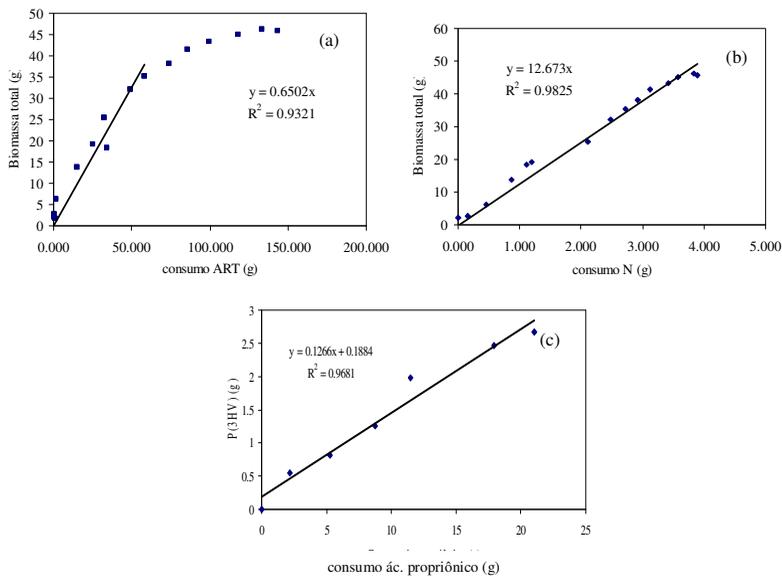


Figura 4.13 - Determinação dos fatores de conversão de ART em célula ($Y_{Xt/S}$), de nitrogênio em células ($Y_{Xt/N}$), e ácido propiônico em unidades 3HV ($Y_{\text{ác. prop}/3HV}$)

Os resultados obtidos para os valores de $Y_{Xt/S}$ e $Y_{Xt/N}$ no cultivo com melão pasteurizado foram de $0,65 \text{ g}_{\text{célula}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ e $12,7 \text{ g}_{\text{célula}} \cdot \text{g}_{\text{nitrogênio}}^{-1}$, respectivamente. Estes valores são mais elevados em relação aos valores teóricos sugeridos para o crescimento do microrganismo *C. necator* em glicose ($Y_{Xt/S} = 0,5 \text{ g}_{\text{célula}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ e $Y_{Xt/N} = 8,33 \text{ g}_{\text{célula}} \cdot \text{g}_{\text{nitrogênio}}^{-1}$). Pode-se atribuir este resultado ao fato do melão conter vários outros compostos, como ácidos orgânicos, etanol e metanol que também são utilizados como fonte de carbono para o crescimento de células, assim como a glicose. O melão também apresenta uma pequena quantidade de nitrogênio, não contabilizado no cálculo do fator de conversão. Portanto, conclui-se que os resultados obtidos apresentam uma superestimação devido ao fato de que somente o ART presente no melão foi analisado e foi considerado somente o nitrogênio adicionado ao cultivo. O valor encontrado para o fator de conversão de ácido propiônico em unidades 3HV foi de 0,13

$\xi_{3HV} \cdot \xi_{\text{ác. prop}}$, o qual apresentou comportamento similar as culturas A e B conduzidas em glicose (4.1.2), no entanto com maior acúmulo de unidades 3HV (9,2 mol%).

A maior porcentagem em unidades 3HV, obtida para este cultivo em relação aos cultivos anteriores realizados em glicose (item 4.1.2), pode ter ocorrido devido ao fato da alta fração de nitrogênio no meio (0,748 g.L⁻¹), observada no momento em que se deu início à alimentação contínua em ácido propiônico. Nessas condições, a viabilidade da célula de converter o acetil-CoA intracelular em unidades 3HB é comprometida, pois em elevadas concentrações de nitrogênio no meio, este precursor (acetil-CoA) é preferencialmente conduzido ao acúmulo de biomassa. Em estudos realizados por Lee *et al.* (2008), os autores verificaram que a biossíntese de P(3HB) é inibida em altas concentrações de uréia (30nM) e que o acréscimo das frações 3HV no copolímero ocorre principalmente devido à redução na geração de monômeros 3HB. Além destes fatores, como foi comprovado anteriormente em estudos realizados com glicose como fonte de substrato para produção do copolímero P(3HB-co-3HV), o microrganismo parece utilizar o ácido propiônico administrado para geração de biomassa em detrimento do acúmulo das unidades 3HV.

Os resultados obtidos para este cultivo mostram que o melão cítrico ultrafiltrado e pasteurizado apresenta bons resultados para o crescimento de *C. necator*, além de confirmar a possibilidade da produção do copolímero P(3HB-co-3HV) em melão cítrico.

Para avaliar a eliminação da etapa de pasteurização deste resíduo, com a finalidade de verificar a eficiência do processo de ultrafiltração como uma fonte de descontaminação do melão e dessa forma aumentar a produtividade do processo, foi realizado, na etapa subsequente, experimentos com melão cítrico ultrafiltrado utilizando estratégias de carência e alimentação em nitrogênio durante a fase de produção do copolímero P(3HB-co-3HV).

4.2.2.2 Cultivo com melão cítrico ultrafiltrado e não-pasteurizado para produção do copolímero P(3HB-co-3HV) por *Cupriavidus necator*: CARÊNCIA X ALIMENTAÇÃO

Com o intuito de aumentar a produção e a produtividade em biopolímero, a estratégia de alimentação de nitrogênio adotada durante a fase de produção foi analisada. De acordo com estudos anteriores de diversos autores, que avaliaram o efeito da alimentação de nitrogênio

durante a fase de produção de PHAs, observou-se que, a adição controlada deste nutriente apresenta resultados de produção e produtividade melhores em relação à carência ou exaustão deste nutriente (SUZUKI *et al.*, 1986; BITAR e UNDERHILL, 1990; RAMSAY, 1990; ARAGÃO *et al.*, 1996; PINTO, 1999).

O que diferencia a limitação (adição controlada) da carência de um nutriente é a manutenção de baixas concentrações do nutriente escolhido (nitrogênio, por exemplo), possibilitando que a célula realize o ciclo dos ácidos graxos tricarboxílicos (TCA), responsável pela elevada relação NADH/NAD⁺, que aumenta a atividade das enzimas envolvidas na produção de PHA. Vale ressaltar que a fonte de carbono deve sempre ser mantida em concentrações elevadas para que se tenha adequados níveis de acetil-CoA na célula, que participa diretamente da síntese de PHA. Por outro lado, a carência de um nutriente evita que este ciclo seja realizado durante a fase de produção, resultando em baixas velocidades de produção de célula e baixos níveis de NADH/NAD⁺, fatores responsáveis pela ativação das enzimas que participam do processo de produção. Com isso, a produção e produtividade de PHA não atingem níveis máximos, havendo a necessidade de se formular uma nova estratégia para a fase de produção, ou seja, administrar pequenas concentrações de nitrogênio durante a fase de produção (LEE, 1995).

Neste sentido, um cultivo utilizando melaço ultrafiltrado como fonte de carbono e adição controlada de nitrogênio na fase de produção foi realizado. Para isto, ao início da fase de produção uma bomba peristáltica foi acionada para alimentar continuamente ao bioreator uma solução de nitrogênio, com concentração de aproximadamente 10 g.L⁻¹, a uma vazão de 12,5 mL.h⁻¹, a fim de manter a velocidade de produção de biomassa residual (r_{Xr}) em 0,2 g_{Xr}.L⁻¹.h⁻¹.

Dessa forma, o objetivo desta etapa foi verificar a influência da estratégia de alimentação de nitrogênio durante a fase de produção, através da manutenção de um crescimento residual controlado e comparar estes resultados com uma cultura submetida à carência. As estratégias utilizadas para produção de P(3HB-co-3HV) (ARAGÃO, 1996) serviram de base para os estudos de produção do copolímero, mantendo-se alimentação contínua de nitrogênio e ácido propiônico durante a fase de produção.

4.2.2.2.1 Cultura em carência de nitrogênio

A Figura 4.14 apresenta o logaritmo da biomassa total e da

concentração residual de nitrogênio no meio ao longo da cultura. A cultura foi realizada por um período de aproximadamente 24 horas. A fase de produção inicia-se quando ocorre a limitação de nitrogênio, representada pela linha pontilhada, e teve duração de aproximadamente 13 horas. A limitação de nitrogênio ocorre a partir do ponto em que o logaritmo neperiano da concentração de biomassa não é mais ajustado por uma reta. A fase de crescimento exponencial apresentou velocidade específica de crescimento de $0,34 \text{ h}^{-1}$. Quando ocorre a limitação em nitrogênio o logaritmo neperiano da concentração de biomassa deixa de ser exponencial, dando início à fase de acúmulo do polímero. Nessa figura, observa-se ainda que esta fase termina com aproximadamente 10,2 horas de cultura, momento no qual a massa de nitrogênio era de $0,33 \text{ g}$ correspondente à concentração de $0,121 \text{ g.L}^{-1}$ no meio com concentração de biomassa de $9,3 \text{ g.L}^{-1}$. A partir deste ponto (indicado pela linha pontilhada) a biomassa começa a crescer de forma linear com μ de aproximadamente $0,037 \text{ h}^{-1}$, indicando início da fase de produção. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Diniz *et al.* (2004), que observaram que a limitação do crescimento se inicia antes do esgotamento total do nitrogênio no meio, em concentrações limitantes abaixo de $0,3 \text{ g.L}^{-1}$.

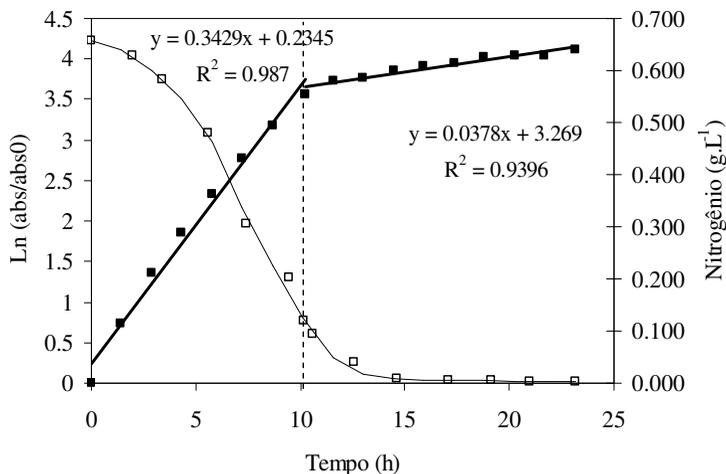


Figura 4.14 - Evolução da biomassa total (expressa em Ln; ■) e da concentração de nitrogênio (g.L^{-1} ; □) em cultura conduzida em carência de nitrogênio na fase de produção

Durante a cultura, o início da fase de produção foi acompanhado através do aumento da concentração de OD no meio no momento da limitação. A partir deste momento, determinou-se o início da alimentação contínua de ácido propiônico para incorporação das unidades 3HV no polímero. Também foi administrado um pulso de melaço para restabelecer na cultura elevada concentração de substrato para acúmulo do polímero. A Figura 4.15 apresenta o momento em que ocorre todas as alimentações realizadas para a cultura conduzida em carência de nitrogênio.

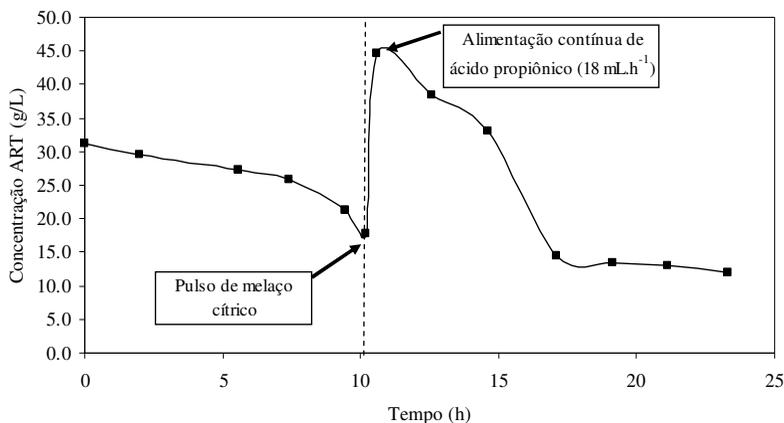


Figura 4.15 - Evolução das concentrações de ART (■) em função do tempo e as alimentações realizadas durante a cultura em carência de nitrogênio

Os resultados das análises das quantidades de biomassa total e residual, concentração de nitrogênio, proteína e copolímero produzido, obtidos para a cultura em carência de nitrogênio, estão apresentadas na Figura 4.16. A linha pontilhada, perpendicular ao eixo das abscissas, representa o momento em que ocorre a limitação pelo nitrogênio, baseado no aumento da porcentagem de OD dissolvido.

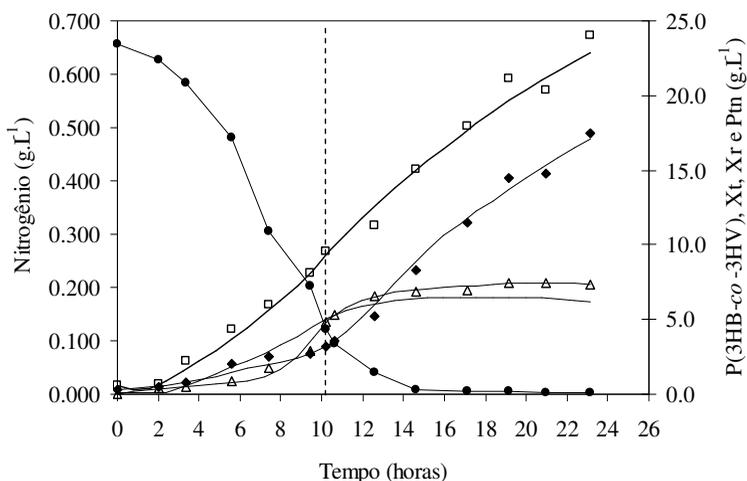


Figura 4.16 - Evolução das concentrações de biomassa total (X_{total} ; □) e residual (X_r ; —), proteína (Ptn; Δ), nitrogênio (●) e produção do copolímero (P(3HB-co-3HV); ♦) em função do tempo para cultura conduzida em carência de nitrogênio. Os pontos representam os dados experimentais e as linhas o ajuste pelo *software Lissage*

A fase inicial (esquerda do gráfico) demonstra a evolução do crescimento exponencial da biomassa total e do conteúdo de proteínas. Na fase de crescimento, a biomassa residual corresponde praticamente ao valor da biomassa total, pois o acúmulo de P(3HB-co-3HV) nesta fase é praticamente nulo. No entanto, o acúmulo de polímero intracelular iniciou-se antes do esgotamento de nitrogênio no meio, indicando que concentrações limitantes de nitrogênio já são suficientes para iniciar o processo de acúmulo. Observa-se que a partir do momento da limitação, em 10,2 horas de cultivo, as curvas de X_r e da produção de Ptn estão estabilizadas, indicando o crescimento limitado. A partir desse momento a produção de P(3HB-co-3HV) é acelerada. A quantidade final do polímero acumulada foi de 76,32 g, correspondente a concentração de aproximadamente 17 g.L^{-1} , a qual representa 73% de polímero acumulado intracelularmente. No entanto, a quantidade de unidades HV acumulada foi baixa, com apenas 2,77 g de unidades 3HV, correspondente a concentração de $0,64 \text{ g.L}^{-1}$, representando dessa forma um acúmulo de 3,7 mol% de frações 3HV no copolímero.

4.2.2.2.2 Cultura em alimentação de nitrogênio

Da mesma forma que exposto para a cultura com carência em nitrogênio, a Figura 4.17 ilustra o momento da limitação quando o crescimento deixa de ser exponencial (12 horas) para a cultura conduzida em alimentação de nitrogênio. A cultura foi realizada por um período de 25 h e as características da fase de crescimento desta cultura são muito semelhantes às relatadas na cultura sob carência em nitrogênio. A fase de crescimento exponencial foi caracterizada pelo ajuste linear do logaritmo da concentração de biomassa, apresentado velocidade específica de $0,27 \text{ h}^{-1}$. Durante a cultura, o início da fase de produção foi acompanhado também pelo aumento da concentração de oxigênio dissolvido no meio, a qual apresentou um ligeiro aumento no momento da limitação, apresentando concentração residual de nitrogênio de $0,184 \text{ g.L}^{-1}$. A partir deste momento (12 horas) determinou-se o início da fase de produção, a qual teve duração de aproximadamente 13 horas, e, deu-se início às alimentações de melaço cítrico, nitrogênio e ácido propiônico para esta cultura. A Figura 4.18 ilustra o momento em que ocorreram essas alimentações e a concentração final promovida na cultura.

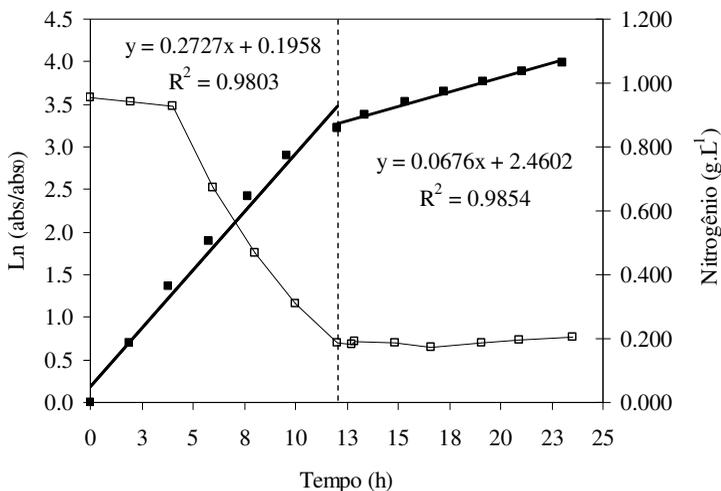


Figura 4.17 - Evolução da biomassa total (expressa em Ln; ■) e da concentração de nitrogênio (g.L^{-1} ; □) em cultura com alimentação de nitrogênio na fase de produção

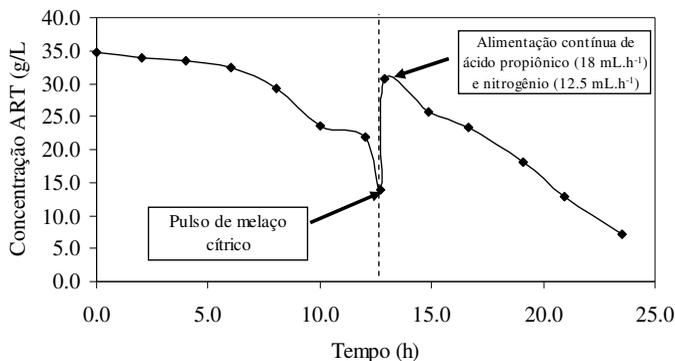


Figura 4.18 - Evolução das concentrações de ART (■) em função do tempo e as alimentações realizadas durante a cultura com alimentação de nitrogênio na fase de produção

Na Figura 4.19 observam-se os resultados da evolução das quantidades da biomassa total e residual, proteína, concentração de nitrogênio e produção do copolímero P(3HB-co-3HV) obtido para a cultura em alimentação em nitrogênio. A linha pontilhada, perpendicular ao eixo das abscissas, representa o momento no qual ocorreu a limitação em nitrogênio. Como no experimento anterior, ocorre em duas fases distintas.

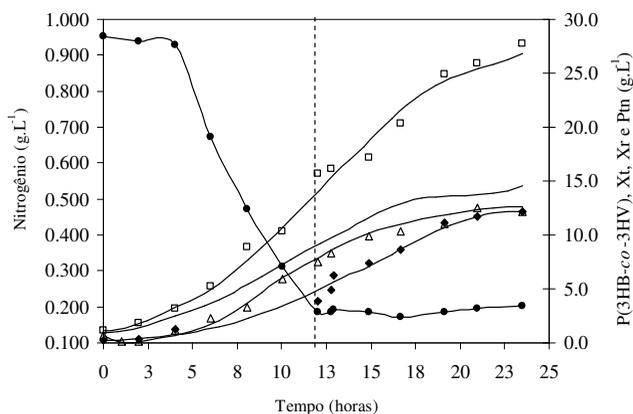


Figura 4.19 - Evolução das concentrações de biomassa total (X_{total} ; □), residual (X_r ; □□), proteína (P_{tn} ; Δ), nitrogênio (●) e produção do copolímero P(3HB-co-3HV; ♦) em função do tempo para cultura conduzida em alimentação de nitrogênio. Os pontos representam os dados experimentais e linhas o ajuste pelo *software Lissage*

O cultivo com alimentação em nitrogênio apresenta evolução similar àquela apresentada pela cultura em carência durante a fase de crescimento. Durante a fase de produção, obtém-se um aumento linear da proteína e da biomassa residual, de acordo com o aporte de nitrogênio. Este é o mesmo período no qual se encontra maior produção de P(3HB-co-3HV). A quantidade final de polímero acumulada foi de 54,6 g de P(3HB-co-3HV), equivalente à concentração de 12,2 g.L⁻¹, a qual corresponde ao acúmulo intracelular de 43,1 % com 5,04 g de unidades 3HV, correspondentes a 9,3 % do polímero total acumulado.

No entanto, no final do cultivo observa-se que ocorre uma estabilização na evolução de proteínas, no acúmulo de biomassa residual e consequentemente na formação do polímero. Entre as hipóteses para o ocorrido está uma provável limitação de carbono no final do cultivo, a qual apresenta concentração abaixo de 10 g.L⁻¹ (Figura 4.18). Segundo Oliveira (1999) concentrações de substrato abaixo de 10 g.L⁻¹ provocam a limitação do crescimento do microrganismo com conseqüente interrupção no acúmulo do polímero. Outra hipótese relevante é que, se for mantida velocidade de crescimento celular constante durante a fase de acúmulo polimérico, o aumento da massa celular provoca uma diminuição na velocidade específica de crescimento celular neste período, o que compromete o metabolismo microbiano e o acúmulo do polímero (ARAGÃO, 1996).

4.2.2.2.3 Comparação entre os cultivos com carência e alimentação de nitrogênio durante a fase de produção

A Tabela 4.5 ilustra um resumo das massas de biomassa total e residual, produção e conteúdo de polímero, de proteína, tempo de cultura e fatores de conversão de substrato em polímero para os cultivos realizados.

Tabela 4. 5 - Resumo dos dados gerais obtidos nos cultivos com carência e alimentação de nitrogênio durante a fase de produção do copolímero P(3HB-*co*-3HV)

Estratégia	Carência	Alimentação
Tempo (h)	23,2	23,5
X _{total} (g)	103,9	126,5
X _r (g)	27,6	71,9
P(3HB- <i>co</i> -3HV) (g)	76,3	54,6
Proteína (g)	33,1	54,7
Volume final (L)	4,45	4,47
P(3HV) (%)	3,67	9,33
P(3HB- <i>co</i> -3HV) (%)	73,4	43,1
Produtividade de P(3HB- <i>co</i> -3HV) (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,74	0,53
Fator de conversão Y _{P(3HB-<i>co</i>-3HV)/S}	0,36	0,28
Fator de conversão Y _{P(3HV/ac. propiônico)}	0,12	0,20

Observa-se na Tabela 4.5 que o resultado para o fator de conversão do copolímero P(3HB-*co*-3HV) apresentou valor superior para a cultura em carência de nitrogênio (0,36) comparada à cultura com alimentação (0,28). A produtividade em P(3HB-*co*-3HV), ao longo de toda a cultura, também apresentou valor superior para cultura em carência (0,74 g.L⁻¹.h⁻¹) comparada à cultura com alimentação de nitrogênio (0,53 g.L⁻¹.h⁻¹). Levando em consideração o conteúdo de polímero, observa-se também menor porcentagem de acúmulo obtida para cultura em alimentação (43,1%) comparada à cultura submetida à carência (73,4%). No entanto, quando se avaliam os resultados para o fator de conversão das unidades 3HV, observa-se que a cultura com alimentação em nitrogênio apresentou valor ligeiramente superior (0,20) à cultura submetida à carência (0,12), fator justificado também pela maior porcentagem de acúmulo das unidades 3HV para esta cultura.

O efeito de várias estratégias de alimentação em nitrogênio na produção de P(3HB-*co*-3HV) em culturas de *C. necator* DSM 545 também foi estudado por Ramsay *et al.* (1990). Os resultados obtidos neste trabalho mostram-se comparáveis aos obtidos por estes autores em relação à porcentagem das unidades 3HV acumuladas, os quais obtiveram 5 mol% de 3HV por mol de PHA para cultura em carência, enquanto as culturas com alimentação de nitrogênio durante a fase de acúmulo, mostraram-se mais favoráveis à produção do copolímero, com

fração de 3HV final de 13 mol% e fator de conversão de ácido propiônico em 3HV de 0,15 mol_{3HV}/mol_{ác. prop.}. A análise do fator de conversão de substrato em polímero, mostrou que uma fração do ácido propiônico poderia, via acetil-CoA, ser convertido em unidades 3HB por vias similares do metabolismo da fonte principal de carbono. Dessa forma, a produção do copolímero foi favorecida pelo uso da estratégia de alimentação de nitrogênio em que o crescimento celular foi mantido, mesmo durante a fase de acúmulo de polímero, melhorando dessa forma a composição molar do polímero que obteve maior fração de unidades 3HV.

A estratégia de alimentação do nutriente limitante durante a fase de produção também foi estudada por Bitar e Underhill (1990) e Aragão *et al.* (1996). Eles utilizaram alimentação de nitrogênio e obtiveram também maiores produtividades de polímero comparadas com culturas sem adição de nitrogênio na fase de produção. Da mesma forma, a adição de pequenas quantidades de nitrogênio durante o período de acúmulo permitiu um pequeno, porém constante crescimento de células, o que levou à produção de grandes quantidades de polímero no estudo de Koyama e Doi (1993). No que diz respeito à produtividade em polímero, os resultados encontrados para este trabalho não estão de acordo com os resultados encontrados na literatura. Isso pode ser justificado, considerando-se o fato de que a quantidade de nitrogênio adicionada durante a fase de produção para manutenção de crescimento residual do microrganismo *C. necator* gerou um elevado aumento da massa celular, provocando uma diminuição na velocidade específica de crescimento celular com o comprometimento do metabolismo microbiano e o acúmulo do polímero. Além disso, conforme visto anteriormente, em altas concentrações de nitrogênio no meio, o acetil-CoA é preferencialmente conduzido à formação de biomassa, reduzindo a viabilidade celular em gerar unidades 3HB, ocorrendo dessa forma acréscimo no acúmulo das unidades 3HV em detrimento da redução na geração do monômero 3HB (LEE, 2008).

Através deste estudo, demonstrou-se que a estratégia de pequena alimentação de nitrogênio durante a fase de produção de P(3HB-co-3HV) por *C. necator* melhorou a composição molar do polímero, no entanto o aumento de produtividade do cultivo não foi observado. Dessa forma, sugere-se a realização de novas estratégias de alimentação em nitrogênio uma vez que dados literários comprovam o aumento da produtividade e pelo fato de nosso estudo ter comprovado a melhoria da composição molar do copolímero.

4.3 Transferência de oxigênio

Estudos sobre a transferência de oxigênio durante o cultivo de *C. necator* foram realizados para estimar parâmetros respiratórios como: velocidade específica de respiração (QO_2), coeficiente de transferência global de oxigênio (k_{La}), velocidade específica de consumo de oxigênio para manutenção celular (m_o) e fator de conversão de oxigênio em células (Y_{GO}), necessários para o estudo de crescimento da bactéria sob diferentes condições. Os estudos foram realizados para descrever o comportamento do microrganismo *C. necator* durante as fases de crescimento e de produção do copolímero P(3HB-co-3HV) nas diferentes fontes de carbono testadas, e, dessa forma, comparar os cultivos.

4.3.1 Constante de atraso (k_p) do oxigênio dissolvido

O atraso na resposta é devido ao tempo necessário para que OD no líquido seja difundido através da membrana do eletrodo, que isola o meio líquido da superfície do cátodo (onde o oxigênio é reduzido gerando o fluxo de elétrons). Além disso, pode existir também uma película estagnada, dependendo das velocidades de passagem de líquido pela superfície do eletrodo (SCHMIDELL, 2001).

Em nossos estudos, o teste degrau para verificar o atraso da sonda foi realizado em meio de cultura, antes da inoculação do microrganismo, sob as condições de aeração e agitação de operação máxima submetidas durante a realização dos cultivos. Como a intenção era apenas determinar a constante de atraso da sonda, sem a interferência do filme líquido, o meio de cultura foi intensamente agitado. Também foram realizados testes para verificar o tempo de uso da membrana, uma vez que os processos de operação durante o cultivo e processos de esterilização podem danificar a membrana do eletrodo comprometendo o acompanhamento do OD e aumentando o atraso do sinal da sonda, ocorrendo dessa forma erros na determinação do k_{La} e QO_2 com conseqüente necessidade de correção.

A resposta do eletrodo, obtida através de teste degrau realizado com o primeiro uso da membrana em meio de cultura sob agitação de 950 rpm e à aeração de 1 vvm, apresentou, para a constante de atraso, o valor foi de aproximadamente 500 h^{-1} , equivalente a $7,2 \text{ s}^{-1}$ (Figura 4.20). O fabricante do eletrodo apresenta um tempo variando entre 45 e 90 s para 98% da resposta, que certamente foi determinado em

condições de agitação. Como se observa, o resultado obtido sob agitação está de acordo com a especificação de fábrica.

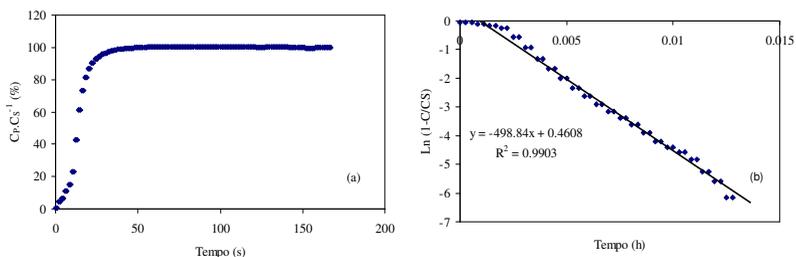


Figura 4. 20 - Teste degrau, com o eletrodo inicialmente zerado com N_2 , colocado em meio de cultura saturado com O_2 e sob agitação, a $35\text{ }^\circ\text{C}$: resposta do eletrodo em função do tempo (a) e determinação do tempo de resposta (b)

Segundo Schmidell (2001) são comuns sensores razoavelmente rápidos apresentarem 90% da resposta em 20 s, atendendo, também, a essa especificação, o que pode ser observado na Figura 4.20.

A Tabela 4.6 apresenta a resposta para os valores de k_p obtidos através da realização do teste degrau efetuado para verificar o número de vezes que a membrana da sonda de oxigênio poderia ser utilizada sem provocar alterações na determinação dos valores de k_{LA} .

Tabela 4. 6 - Resposta da constante de atraso da sonda conforme o número de vezes que a sonda foi utilizada

Utilização	k_p (h^{-1})	Coefficiente de correlação R^2
1 ^a utilização	498,84	0,9908
2 ^a utilização	390,07	0,9864
3 ^a utilização	301,32	0,9951
4 ^a utilização	247,43	0,9951

A Figura 4.21 apresenta uma correlação entre o tempo de uso da membrana versus a resposta da constante de atraso da sonda. Observa-se na Figura 4.21, uma redução dos valores de k_p da ordem de aproximadamente 90 a $100\text{ }h^{-1}$ conforme as três primeiras utilizações da membrana que apresentaram valores de k_p de $498,84\text{ }h^{-1}$, $390,07\text{ }h^{-1}$ e $301,32\text{ }h^{-1}$ para a 1^a, 2^a e 3^a utilização respectivamente. A quarta

utilização da membrana apresentou valor de k_p de $247,43 \text{ h}^{-1}$, com redução na ordem de 50 h^{-1} de sua utilização anterior.

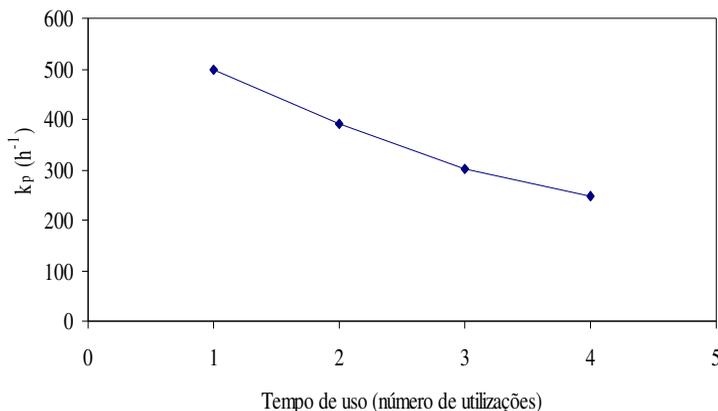


Figura 4. 21 - Variação entre os valores de k_p (h^{-1}) conforme o tempo de utilização da membrana

Tal procedimento permitiu concluir que, apesar da sonda apresentar resposta razoavelmente rápida (obteve-se 90% da resposta em 20 segundos) no teste degrau para todos os ensaios, os valores do k_p apresentaram-se na ordem de aproximadamente 247 h^{-1} já na quarta utilização da membrana. Observa-se dessa forma que estes valores de k_p podem estimar precisamente, sem necessidade de correção, apenas os valores de k_{La} inferiores a aproximadamente 123 h^{-1} . Segundo Schmidell (2001), para as sondas que apresentam valores de k_p duas vezes superior ao k_{La} , pode-se estimar, com uma razoável precisão, sem a necessidade de correção, os valores de k_{La} durante o cultivo. Acima desses valores de k_{La} , os erros tornam-se muito elevados, exigindo que se efetue a correção propostas pela Equação (3.17 – item 3.6.4). Sabe-se através do acompanhamento da análise da transferência de oxigênio de experimentos anteriores que os valores de k_{La} durante cultivo com *C. necator* para produção de P(3HB-co-3HV) aumentam até a ordem de aproximadamente 250 h^{-1} . Dessa forma, para evitar erros muitos elevados na determinação tanto dos valores de k_{La} quanto dos valores de QO_2 , bem como evitar prejudicar o sistema de transferência de oxigênio devido ao estado da membrana, definiu-se o uso máximo de quatro vezes para as mesmas. A análise para determinação do k_p para as demais utilizações da membrana encontram-se no Anexo I, Figuras A.8.

4.3.2 Correção do $k_L a$ em função do atraso na resposta do eletrodo

Para avaliar a necessidade de correção dos valores de $k_L a$ devido ao atraso na resposta do eletrodo, as Figuras 4.22 (a), (b) e (c) apresentam gráficos com a variação da concentração real de oxigênio dissolvido (C) (Equação 3.16 – item 3.6.4) e a concentração prevista pela sonda (C_p) (Equação 3.13 - item 3.6.3), em função do tempo, para os valores de $k_L a$ de 30, 162 e 252 h^{-1} (nas vazões de 0,30, 0,50 e 1,0 vvm, respectivamente, determinados conforme item 4.3.4), e para o k_p de 498,82 h^{-1} (item 4.3.2), obtido em experimento realizado com primeiro uso da membrana. Nesses gráficos pode-se observar que o eletrodo acompanha muito bem os valores reais. A constante de atraso (k_p) foi cerca de 2 vezes superior ao $k_L a$ na maior vazão utilizada para o estudo de transferência de oxigênio (1,0 vvm). Neste caso, conforme indicado por Schmidell (2001), não há necessidade de correção dos valores de $k_L a$.

Um limite com razoável precisão, sem a necessidade de correção seria para um valor de k_p duas vezes superior ao valor do $k_L a$ (SCHMIDELL, 2001), o qual foi obtido por este experimento, com a primeira utilização da membrana, e essa condição cobre uma faixa bastante ampla de $k_L a$ para aplicação em bioreatores agitados.

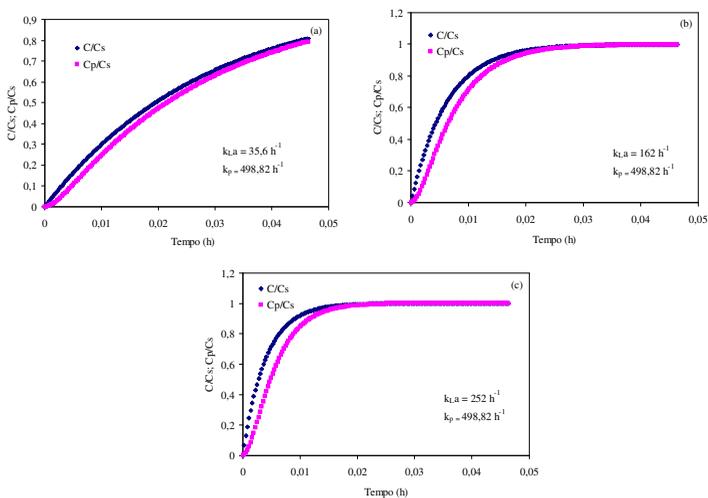


Figura 4. 22 - Variação da concentração real de oxigênio dissolvido ($C \cdot C_s^{-1}$) e sinal de eletrodo ($C_p \cdot C_s^{-1}$), durante execução do método dinâmico. Simulação da Equação 4.4 e Equação 3.13 para valores de $k_L a$ e k_p para a primeira utilização da membrana

As Figuras 4.23 (a), (b) e (c) apresentam gráficos com a variação da concentração real de oxigênio dissolvido (C) e a concentração prevista pela sonda (C_p), em função do tempo para os valores de $k_{L,a}$ de 72, 167 e 233 h^{-1} (nas mesmas vazões de ar avaliadas anteriormente, ou seja, 0,30, 0,50 e 1,0 vvm, respectivamente), e para o k_p de 247,03 h^{-1} , obtido em experimento realizado com a quarta utilização da membrana do eletrodo polarográfico, utilizando melação cítrico como fonte de carbono, para ilustrar uma situação onde seria necessária realizar a correção os valores de $k_{L,a}$.

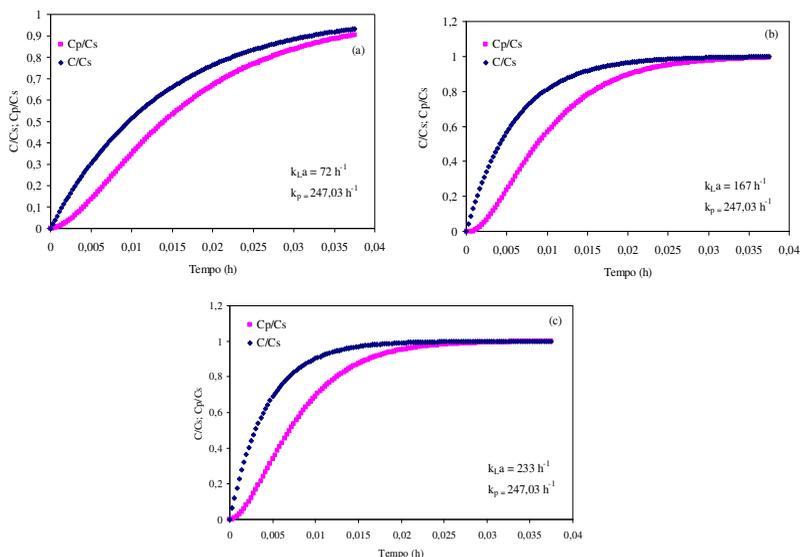


Figura 4.23 - Variação da concentração real de oxigênio dissolvido (\blacklozenge , $C.C_S^{-1}$) e sinal do eletrodo (\blacksquare , $C_p.C_S^{-1}$), durante execução do método dinâmico.

Simulação da Equação 3.16 e Equação 3.13 para os valores de $k_{L,a}$ e k_p para a quarta utilização da membrana

Através da análise dos dados da Tabela 4.6 e da análise da Figura 4.23, observa-se que o valor de k_p obtido através da quarta utilização da membrana pode estimar precisamente, sem necessidade de correção, apenas os valores de $k_{L,a}$ inferiores a aproximadamente 123,5 h^{-1} . Acima desses valores de $k_{L,a}$, observa-se na Figura 4.23 (b) e (c) que os erros na determinação do $k_{L,a}$ apresentam desvios muito elevados, exigindo que se efetue a devida correção.

4.3.3 Determinação do kLa e do QO_2X durante o cultivo

A Figura 4.24 é apresentada uma curva típica obtida durante a execução do método dinâmico, que foi utilizado para a determinação do QO_2X para um determinado tempo de cultivo, onde C_0 corresponde à concentração de oxigênio inicial, ou seja, antes da aeração ser cessada, t_0 é o tempo no instante da interrupção da aeração, a partir do qual C começa a diminuir até que se atinja certo valor C_{o1} , e t_1 é o instante em que a aeração é retomada nas condições que estava sendo praticada.

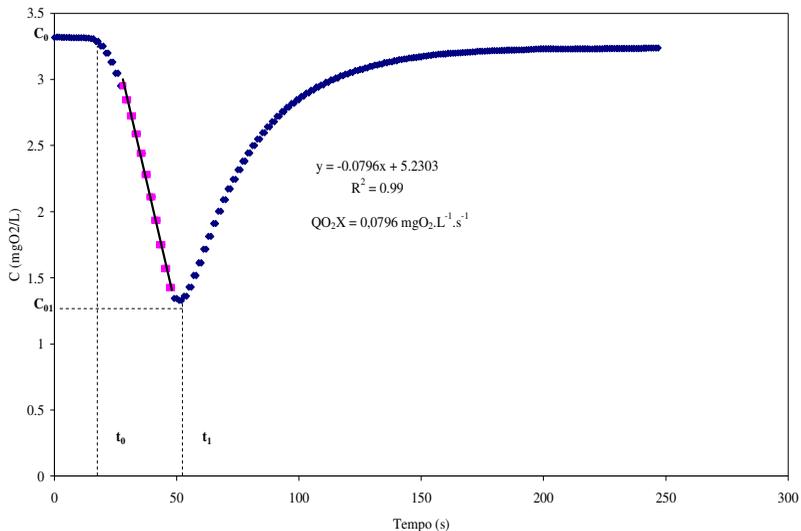


Figura 4. 24 - Variação da concentração de oxigênio dissolvido com o tempo

Tal procedimento deve levar um tempo relativamente curto, não demandando mais do que alguns minutos para sua execução, tempo este que depende obviamente do instante da fermentação, ou mais propriamente da concentração celular existente. Assim sendo, durante este intervalo de tempo, pode-se supor que não haja alteração da concentração celular (X), assim como deve ser mantido constante o valor de QO_2 . Nessas condições, para o trecho sem aeração (Equação 3.3 - item 3.6.1), o produto QO_2X deve ser constante. Dessa forma, a Equação (3.4 - item 3.6.1) prevê que a partir do instante $t_0 = (C = C_0)$, deve ocorrer uma variação linear de C com o tempo, reta cujo coeficiente angular é igual a $(-QO_2X)$, resultando assim determinado valor de QO_2 , conhecendo-se o valor de X neste instante. Como se pode

observar na Figura 4.24, não ocorre variação linear desde o instante da interrupção da aeração, pois há um certo período em que ainda existem bolhas de ar no seio líquido e, portanto, ainda ocorre alguma transferência de O_2 .

Para a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_{L,a}$), em uma dada condição de agitação e aeração, a injeção de ar é retomada quando a concentração de O_2 esteja ainda em valores superiores ao crítico (valor crítico seria aquele no qual essa concentração já inibe a plena respiração das células, considerando-se que este valor está entre 20 e 30% de OD, em relação à concentração de saturação para o microrganismo em estudo). Durante os instantes da retomada da aeração, com o conseqüente aumento da quantidade de oxigênio dissolvido, considera-se que a velocidade de respiração (QO_2X) é constante, ou seja, não tenha sido afetada.

Dessa forma, plotando-se os dados da concentração de oxigênio dissolvido (C) correspondente à retomada da aeração versus o tempo com auxílio do *software* Statística 6.0 e através da Equação (3.8 - item 3.6.1), obtém os valores para o $k_{L,a}$, como exemplificado na Figura 4.25. Deve-se lembrar aqui que, para o instante inicial de retomada da aeração, ou seja, para $t = t_1$, tem-se $C = C_{o1}$ (Figura 4.25)

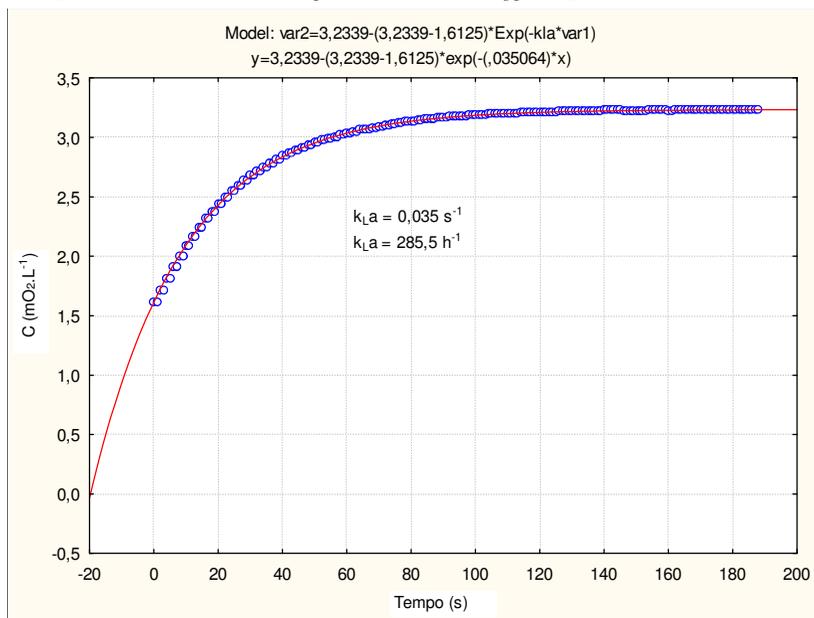


Figura 4.25 - Determinação do coeficiente volumétrico de oxigênio ($k_{L,a}$)

Observou-se que em estágios mais avançados do cultivo, a execução do método dinâmico pode levar a concentração de OD a níveis críticos. Nesses estágios mais avançados, pode-se observar que após a retomada da aeração a concentração de OD estabiliza-se num patamar superior ao do início do ensaio, indicando um consumo de O_2 inferior ao que havia antes da interrupção da aeração, caracterizando um efeito prejudicial ao metabolismo. A diminuição nos níveis de OD somente foi verificada na fase de produção do cultivo, fase na qual o microrganismo diminui sua velocidade de crescimento e conseqüentemente sua velocidade de consumo de oxigênio. Assim, como a concentração crítica de OD no meio está próximo dos 30% da saturação para o microrganismo em estudo, pode-se atingir no interior das células valores mais baixos ainda. Em casos mais avançados do cultivo, na retomada da aeração, pode ainda ocorrer uma queda brusca na concentração de OD medida no eletrodo devida ao início do processo de mistura do meio pobre em oxigênio da base do bioreator, onde a biomassa se acumulou, com o restante do meio da parte superior, durante o restabelecimento da hidrodinâmica. Nesses casos, esses pontos experimentais devem ser desconsiderados na determinação do k_La durante o período de instabilidade, determinado como tempo de mistura para restabelecer o sistema.

4.3.4 Correção do kLa e do QO_2 em função do atraso na resposta do eletrodo

Na Figura 4.26 apresentam-se os dados experimentais da concentração de O_2 dissolvido de um ensaio dinâmico num determinado tempo de cultivo para produção de P(3HB-co-3HV) pelo microrganismo *C. necator*. Também estão locados, no primeiro trecho, a simulação dos pontos teóricos (Equação 3.4 – item 3.6.1) e os dados experimentais corrigidos do atraso na resposta (Equação 3.15 – item 3.6.4), utilizando o k_p obtido para a quarta utilização da membrana ($247,03 \text{ h}^{-1}$), valor o qual apresentou necessidade de correção. No segundo trecho, estão também locados a simulação dos pontos teóricos (Equação 3.7 – item 3.6.1) e os dados experimentais corrigidos para o atraso na resposta do sensor (Equação 3.17 – item 3.6.4), para avaliação dos valores de k_La .

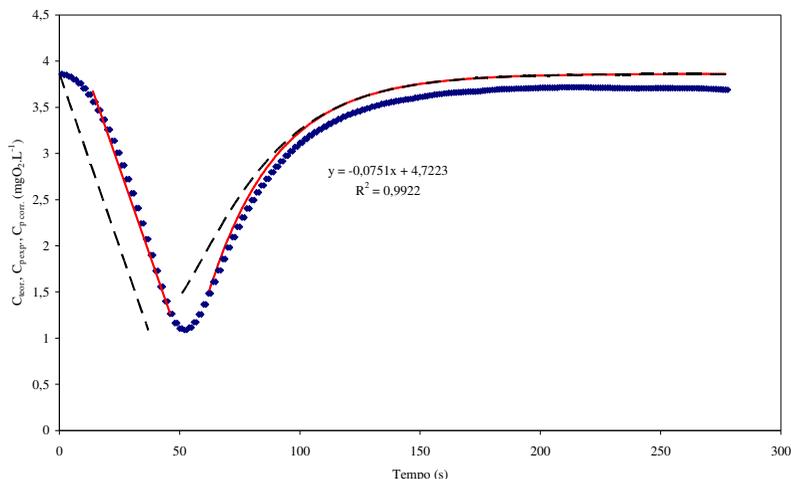


Figura 4. 26 - Dados experimentais do método dinâmico (C_p) obtidos em cultivo para produção de P(3HB-co-3HV) por *C. necator*. A curva vermelha corresponde aos dados teóricos (C_{teor}) e a curva tracejada representa os valores de C_p corrigido o atraso devido ao tempo de resposta ($C_{p,corr}$).

No primeiro trecho da Figura 4.26, verificou-se que a Equação 3.15 não ajustou bem os dados experimentais. O motivo para isso foi o valor muito baixo do k_p . Independente disso, desconsiderando-se os pontos iniciais do estado transiente devido à existência de bolhas de ar em instantes seguidos à interrupção da aeração (não previstos pela Equação 3.15), tanto os dados experimentais, quanto os seus valores corrigidos, acompanham bem os valores de C teóricos. Para tempos elevados no ensaio, o termo $(k_p * e^{k_p * t})^{-1}$ da Equação 3.15 torna-se desprezível, obtendo-se uma reta paralela à representada pelos pontos teóricos (Equação 3.4), podendo-se estimar o valor de QO_2X através do sinal do eletrodo $\{C_p = f(t)\}$ (SCHMIDELL, 2001). Igualmente para valores elevados de k_p (sonda rápida), as Equações (3.4) e (3.15) seriam coincidentes.

Na retoma da aeração (Figura 4.26), depois do estado transiente devido à mistura, observa-se que os dados experimentais corrigidos ($C_{p,corr}$) acompanham bem os valores teóricos previstos pela Equação 3.7. No entanto, os valores experimentais (C_p) não acompanham bem estes valores teóricos. Segundo estudos realizados por Badino Jr. *et al.* (2000), para valores de k_{1A} elevados, como é o caso em bioreatores agitados, a diferença entre o C teórico e o C_p lido pelo eletrodo é maior.

No caso deste trabalho, o transiente definido pelo tempo de mistura abrange um tempo de 50 a 60 s, período em que os dados experimentais devem ser desconsiderados para o cálculo do $k_{L,a}$. Neste espaço de tempo, as leituras do eletrodo conseguem estabilizar e acompanhar os valores reais. Assim, tanto os valores para QO_2 quanto para $k_{L,a}$, necessitam de correção em função do atraso na resposta do eletrodo para valores de k_p encontrados para a quarta utilização da membrana.

4.3.5 Características gerais dos dados de $k_{L,a}$ e QO_2 durante o cultivo

A seguir serão apresentados alguns resultados da análise de respirometria de dois cultivos distintos, um utilizando glicose e outro melação cítrica como fonte de carbono com o objetivo de comparar o comportamento do crescimento celular nos diferentes substratos. A análise de respirometria foi realizada durante a cada amostragem, durante o cultivo, para promover a determinação dos parâmetros respiratórios ($k_{L,a}$ e QO_2) das células.

A Figura 4.27 (a) e (b) apresenta os dados da análise de respirometria durante os cultivos em glicose e melação cítrica, respectivamente, na fase de crescimento do microrganismo e na fase de produção do copolímero P(3HB-co-3HV).

Observa-se através da análise da Figura 4.27 perfil similar para ambas as culturas. Nota-se que, antes da limitação em nitrogênio, (indicada pela linha pontilhada), a qual ocorreu com aproximadamente 12 horas e 10 horas de cultivo, para as culturas em glicose (a) e melação cítrica (b) respectivamente, que a velocidade de respiração (QO_2X) é maior em função da maior velocidade de crescimento das células. A partir do momento da limitação em nitrogênio, essa velocidade decresce, para ambas as culturas, caracterizando a fase de redução de velocidade e fase estacionária de crescimento do microrganismo, a qual corresponde à fase de acúmulo do copolímero P(3HB-co-3HV). Também é apresentada na Figura 4.27 a velocidade específica de respiração (QO_2), a qual corresponde à razão entre a velocidade de respiração da biomassa (QO_2X) e a concentração da biomassa residual (X_r). Esta última representa a concentração da biomassa seca menos a concentração de P(3HB-co-3HV) na célula. Assim, o X_r após a limitação em nitrogênio deve ser praticamente constante em virtude das células entrarem em fase de baixa velocidade de crescimento. Observa-se nos instantes iniciais do processo fermentativo, uma baixa concentração celular e, conseqüentemente mínimos valores de QO_2 , os quais correspondem à

necessidade de baixas transferências de O_2 a fim de satisfazer esta pequena demanda e, conseqüentemente baixos valores de k_La . No entanto, com o decorrer do tempo a concentração celular aumenta, ocorrendo o mesmo com os valores de QO_2 , o qual atingirá seu valor máximo na fase exponencial ($\mu = \mu_{máx}$) aumentando dessa forma o consumo e a transferência de O_2 e, conseqüentemente os valores de k_La .

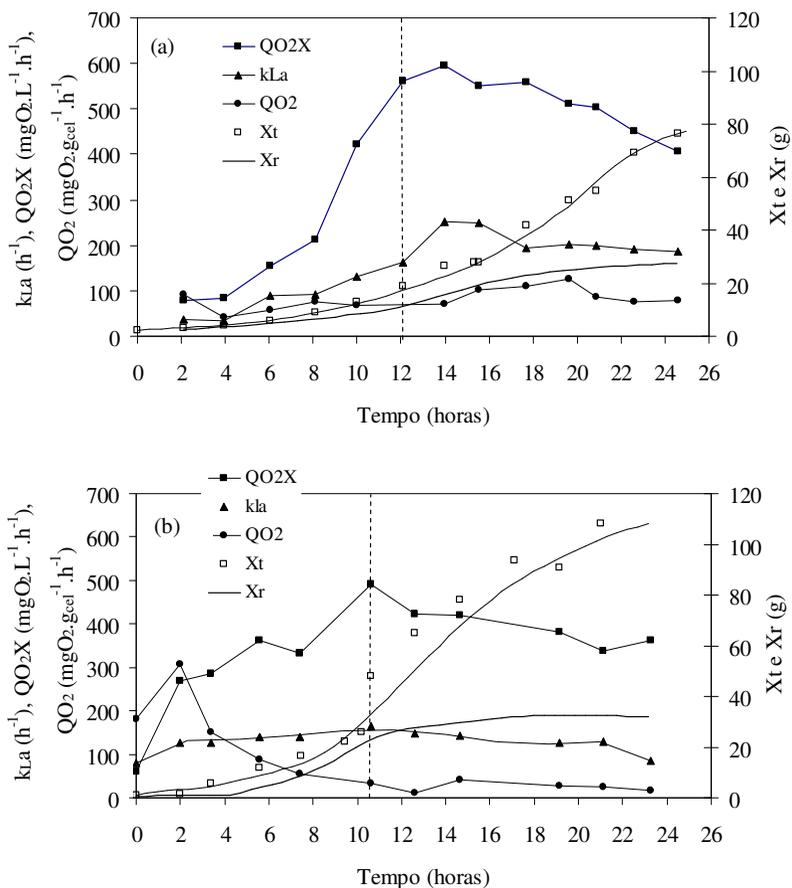


Figura 4.27 - Dados do k_La (▲), QO_2X (■), QO_2 (●), X_t (□) e X_r (—) durante os cultivos para produção do copolímero P(3HB-co-3HV) por *Cupriavidus necator* utilizando como fonte de carbono glicose (a) e melação cítrica (b). A linha pontilhada representa a limitação em nitrogênio e início da fase de produção

Desta forma, como é de se esperar, as determinações de QO_2 são de muito interesse, pois essa velocidade específica está intimamente relacionada com o estado fisiológico da biomassa presente no bioreator.

Observa-se ainda na Figura 4.27 (a), cultura utilizando glicose como fonte de carbono, que o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_{L,a}$) aumentou até a 14ª hora de cultivo (quando ocorreu a exaustão total em nitrogênio), momento no qual atingiu seu valor máximo (250 h^{-1}) acompanhando o comportamento dos valores de QO_2X para esta cultura. Logo após a limitação os valores de $k_{L,a}$ decrescem mantendo-se constante até o final do cultivo. Na análise da Figura 4.27 (b), cultura utilizando melação cítrica como fonte de carbono, observa-se um comportamento similar para os valores de $k_{L,a}$, sendo que os mesmos aumentam até o momento da limitação em nitrogênio (aproximadamente na 10ª hora de cultivo) atingindo neste ponto seu valor máximo (165 h^{-1}), apresentando uma redução em seus valores na fase de produção do copolímero. No entanto, observa-se que os valores de $k_{L,a}$ para esta cultura apresentam valores inferiores quando comparados à cultura em glicose.

Em termos de transferência de oxigênio, através de dados obtidos em estudos anteriores realizados para produção de PHAs por *C. necator* mostram valores de $k_{L,a}$ na faixa de 250 h^{-1} a 100 h^{-1} para a fase de crescimento, enquanto que valores da ordem de 100 h^{-1} a 70 h^{-1} seriam necessários para a fase de acúmulo do polímero. Obviamente que, o número de utilizações e a integridade da membrana irão influenciar na determinação do O_2 dissolvido e na necessidade de correção dos valores de $k_{L,a}$. Dessa forma, evidencia-se a necessidade do acompanhamento do estado da membrana do eletrodo, através da determinação da sua constante de atraso, a cada uso, para promover à correta estimação dos valores de $k_{L,a}$ e acompanhamento do comportamento do microrganismo durante a cultura.

4.3.6 Velocidade específica de consumo de O_2 para a manutenção celular e fator de correção de oxigênio em células

O microrganismo *C. necator* apresentou um consumo de oxigênio variável, em função do nível de atividade observado, para manutenção de suas atividades vitais, durante o cultivo em bioreator para produção do copolímero P(3HB-co-3HV). A Figura 4.28 apresenta os resultados dessa variável de consumo (Equação 3.18 – pág. 45) para dois cultivos, utilizando como fonte de carbono glicose (a) e melação (b) com o

objetivo de comparar o comportamento do microrganismo nestes diferentes substratos.

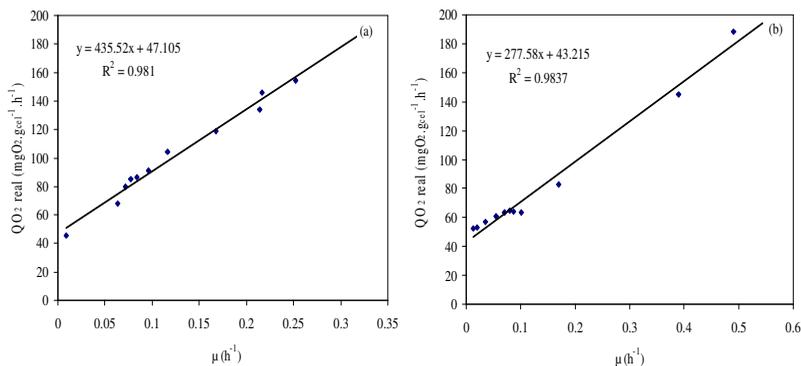


Figura 4. 28 - Relação entre a velocidade específica de respiração (QO_2 real) e a velocidade específica de crescimento das células (μ) para a produção de P(3HB-co-3HV) por *C. necator* a partir de glicose (a) e melação cítrico (b) como fonte de substrato

A partir do ajuste linear, aos dados experimentais apresentados na Figura 4.28, os valores de Y_{GO} e o m_o (Equação 3.18) foram de $2,30 \text{ g}_{\text{cél.}} \cdot (\text{gO}_2)^{-1}$ e $47,10 \text{ mgO}_2 \cdot (\text{g}_{\text{cél.}} \cdot \text{h})^{-1}$, para cultivo realizado em glicose, e de $3,60 \text{ g}_{\text{cél.}} \cdot (\text{gO}_2)^{-1}$ e $43,20 \text{ mgO}_2 \cdot (\text{g}_{\text{cél.}} \cdot \text{h})^{-1}$, quando o cultivo foi realizado com melação cítrico como fonte de carbono. Observa-se que o valor de Y_{GO} é ligeiramente superior para o cultivo realizado em melação cítrico, enquanto que o valor de m_o é ligeiramente inferior. Durante a fase de crescimento o oxigênio fornecido ao sistema é utilizado somente para o crescimento celular enquanto que na fase de produção o oxigênio é utilizado tanto para o crescimento celular quanto para a manutenção das células que estão produzindo o biopolímero. Estes resultados mostram que o valor de Y_{GO} apresentou valor ligeiramente superior para cultivo realizado em melação em virtude do maior acúmulo de biomassa e conteúdo polimérico quando comparado à cultura em glicose. Estes resultados podem ser verificados na Tabela 4.7, que apresenta um resumo geral dos dados de cultivo para ambas as culturas.

Tabela 4. 7 - Variáveis de cultivo avaliadas no momento da realização do ensaio para determinação de Y_{GO} e m_o para produção de P(3HB-co-3HV) por *Cupriavidus necator*

Cultura	Tempo (h)	Xt (g)	P(3HB-co-3HV) (g)	Y_{GO} $g_{cél.}(gO_2)^{-1}$	m_o $mgO_2.(g_{cél.}h^{-1})$
Glicose	24,89	91,68	52,12	2,30	47,10
Melaço cítrico	23,29	108,21	76,32	3,60	43,20

Os resultados encontrados para a análise de transferência de oxigênio durante o cultivo mostram a importância da determinação de parâmetros como k_{La} , QO_2 , Y_{GO} e m_o e, comprovam que os mesmos podem ser utilizados para acompanhar o comportamento do microrganismo durante cultivos para produção de P(3HB-co-3HV) por *C. necator*, através da estimativa indireta dos valores de concentração celular através dos dados de velocidade específica de respiração, como também pela possibilidade de identificação do início da fase de produção, aumentando assim a produtividade do polímero.

4.4 Modelagem Matemática

4.4.1 Modelagem do crescimento de *Cupriavidus necator* em meio sintético (glicose) e melaço cítrico para produção de P(3HB-co-3HV)

A modelagem matemática do crescimento microbiano foi realizada através da aplicação de modelos primários com o objetivo de se estimar os parâmetros de crescimento: velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$), tempo duração da fase lag (λ) e aumento logarítmico da população (A), necessários para o estudo da cinética de crescimento da bactéria sob diferentes condições. Os modelos de Barany e Roberts, de Gompertz Modificado e modelo Logístico foram aplicados e comparados quanto à capacidade em descreverem o crescimento de *Cupriavidus necator* nas diferentes fontes de carbono utilizadas, glicose e melaço cítrico, com ou sem alimentação em nitrogênio na fase de produção.

Dessa forma, o objetivo desta etapa foi avaliar o crescimento de

Cupriavidus necator nas diferentes fontes de carbono testadas, resíduo da indústria processadora de suco de laranja (melaço cítrico) e meio sintético (glicose), e escolher um modelo matemático primário que descreva bem o crescimento da bactéria nestes substratos. Serão apresentados apenas os resultados para os modelos aplicados nos cultivos que apresentaram as melhores respostas de produção em P(3HB-co-3HB). As curvas de crescimento de *C. necator* e o resultado da análise estatística para aplicação dos modelos primários aos demais cultivos estão apresentadas no Anexo I, Figuras A.9 à A.11 e na Tabela A.1, respectivamente.

4.4.1.1 Avaliação e Modelagem do crescimento de *Cupriavidus necator*

Os resultados das análises estatísticas realizadas para comparação dos modelos aplicados às curvas de crescimento de *Cupriavidus necator* estão apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Valores dos índices estatísticos para os modelos aplicados às curvas de crescimento de *C. necator* nas diferentes fontes de carbono

Índices	Modelos matemáticos					
	Glicose			Melaço cítrico		
	GM ^c	LO ^d	BR ^e	GM ^c	LO ^d	BR ^e
MSE ^a	0,0114	0,0272	0,0117	0,0113	0,1938	0,0123
Fator bias	0,9774	0,9609	0,9628	0,9791	0,9490	0,9768
F.exatidão	1,0724	1,1038	1,1022	1,0539	1,1005	1,0936
R ² ^b	0,9975	0,9934	0,9992	0,9958	0,9887	0,9956

^aMSE: erro médio quadrático; ^bR²: coeficiente de correlação; ^cGM: Gompertz Modificado;

^dLO: Logístico; ^eBR: Barany e Roberts

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 4.8, observa-se que os três modelos apresentaram um baixo valor de MSE. Entretanto, os modelos que obtiveram a melhor predição dos dados de crescimento de *Cupriavidus necator*, tanto para glicose como para melaço cítrico, foi o modelo de Gompertz Modificado (GM) e o modelo de Barany Roberts (BR), ambos apresentando valores muito próximos. Os coeficientes de correlação obtidos nos modelos de GM e

BR foram 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. O modelo Logístico, também apresentou bons coeficientes de correlação, tanto para análise em glicose como em melaço cítrico, mostrando dessa maneira que este modelo também apresenta um bom ajuste aos dados, sendo entretanto, ligeiramente inferior aos outros modelos testados.

O fator bias e de exatidão fornecem uma indicação objetiva do desempenho do modelo. Os valores do fator bias, para ambos os substratos testados, estiveram bem próximos de 1. No entanto, os valores obtidos foram inferiores a 1, indicando que o valor predito é menor que o observado. Os valores do fator de exatidão representam quanto os valores preditos diferem dos valores 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 todos os modelos, sendo que para os experimentos realizados em glicose, o modelo Logístico, apresentou o maior valor (1,1038), indicando que os valores preditos são em média 10% superior aos valores observados. Já para os cultivos em melaço cítrico, o modelo Logístico também apresentou o maior valor, quando comparado aos demais modelos (1,1005), indicando novamente uma diferença de aproximadamente 10% entre valores preditos e observados. Pode-se dizer que, para fontes de carbono testadas, pela proximidade dos valores obtidos para os diferentes índices calculados, que o modelo de Gompertz Modificado foi o que apresentou os melhores resultados para a predição do crescimento de *Cupriavidus necator*, e, por isso este modelo foi escolhido, embora não apresente muita diferença com os demais modelos, para o cálculo dos parâmetros de crescimento. A Figura 4.29 apresenta o ajuste do modelo de Gompertz Modificado aos dados experimentais do crescimento de *C. necator* cultivada em meio sintético e em melaço cítrico. A linha pontilhada, perpendicular ao eixo das abscissas, representa o momento da limitação em nitrogênio pelos cultivos. A partir deste ponto, a biomassa representa tanto o crescimento celular, quanto o acúmulo do polímero.

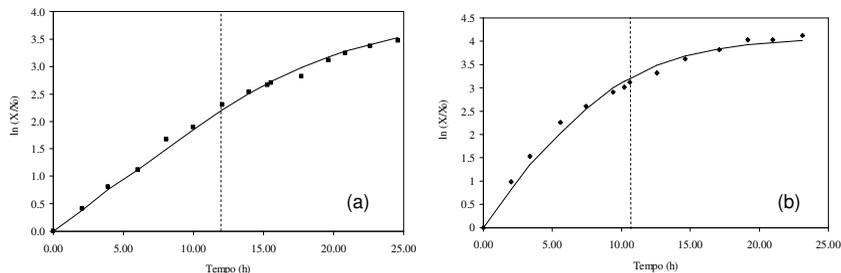


Figura 4. 29 - Curvas de crescimento de *C. necator* para produção de P(3HB-co-3V) expressa em $\ln(X/X_0)$ em função do tempo cultivadas em (a) Glicose e (b) Melaço cítrico. As linhas representam o Modelo de Gompertz Modificado ajustado aos dados experimentais, com auxílio do software Matlab 7.0.

A partir das curvas ajustadas na Figura 4.31 obtiveram-se os parâmetros $\mu_{\text{máx}}$, λ e A , e os seus valores para as diferentes fontes de carbono testadas estão apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4. 9 - Parâmetros de crescimento obtidos pelo modelo de GM para os cultivos realizados em diferentes fontes de carbono para a produção de P(3HB-co-3HV)

Parâmetro	Fonte de carbono	
	Glicose	Melaço cítrico
$\mu_{\text{máx}}^a$ (h^{-1})	0,184	0,308
λ^b (h)	0,000	0,000
A^c	3,972	4,104

^a $\mu_{\text{máx}}$: velocidade específica máxima de crescimento;

^b λ : duração da fase lag;

^c A : aumento logarítmico da população.

Os resultados apresentados na Figura 4.29 e na Tabela 4.9 mostram que a bactéria *Cupriavidus necator* possui capacidade de crescimento nas diferentes fontes de carbono testadas, apresentando comportamento similar. Para ambas as culturas, não foi identificada fase de adaptação da célula ao meio. Os valores de $\mu_{\text{máx}}$ para o cultivo em meio sintético está próximo ($0,184 \text{ h}^{-1}$) dos valores encontrados na literatura, onde a faixa de crescimento se encontra em torno de $0,22 \text{ h}^{-1}$ (KOYAMA e DOI, 1995). Porém, no cultivo em melaço cítrico, o valor da velocidade específica máxima de crescimento foi superior ($0,308 \text{ h}^{-1}$),

o que pode ter ocorrido em virtude do melão cítrico apresentar outras fontes de carbono, além da glicose, que podem ter sido utilizadas pelo microrganismo para promover crescimento celular.

Quando se compara o aumento logaritmo da população (A), observa-se que os valores foram praticamente os mesmos, apresentando valores de 3,972 e 4,101 para as culturas realizadas em glicose e melão cítrico, respectivamente. Com isso pode-se dizer que, o comportamento do crescimento observado em melão cítrico é bem próximo ao obtido em glicose, apresentando-se dessa forma como um substrato atraente para a produção de P(3HB-co-3HB), reduzindo desta maneira os custos de produção.

4.4.1.2 Modelagem do crescimento de *Cupriavidus necator* cultivado em melão cítrico com manutenção do crescimento durante a fase de produção

Nesta etapa, foi estudado o crescimento de *Cupriavidus necator* utilizando melão cítrico como fonte de carbono e alimentação de nitrogênio durante a fase de produção do copolímero P(3HB-co-3HV), visando promover a manutenção de um crescimento residual limitado de $0,2 \text{ g}_{\text{Xr}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ nesta fase. Os resultados das análises estatísticas realizadas para comparação dos modelos primários aplicados às curvas de crescimento estão apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4. 10 - Valores dos índices matemáticos e estatísticos para os modelos aplicados às curvas de crescimento de *C. necator* nas diferentes fontes de carbono

Índices	Modelos matemáticos		
	Melão cítrico com alimentação de nitrogênio na fase de produção		
	GM ^c	LO ^d	BR ^e
MSE ^a	9,37E-08	0,0002	0,0003
Fator bias	0,9876	0,9588	0,9790
F.exatidão	1,1106	1,1419	1,1180
R ² ^b	0,9950	0,9891	0,9810

^aMSE: erro médio quadrático; ^bR²: coeficiente de correlação; ^cGM: Gompertz Modificado;

^dLO: Logístico; ^eBR: Barany e Roberts

Observando os valores obtidos de MSE na Tabela 4.10, nota-se que, para todos os modelos aplicados, estes valores foram baixos. O valor para o ajuste do modelo de Gompertz Modificado apresentou menor valor quando comparado aos ajustes encontrados para os outros modelos, apresentando, dessa forma, a melhor predição para os dados de crescimento de *Cupriavidus necator*. O coeficiente de correlação obtido para o ajuste do modelo de GM foi acima de 0,99, indicando que este modelo testado apresentou um bom ajuste aos dados experimentais. O modelo de Barany e Roberts e o modelo Logístico, também apresentaram bons coeficientes de correlação, acima de 0,98, mostrando dessa maneira que ambos os modelos também apresentam bem as curvas de crescimento, sendo, entretanto, ligeiramente inferiores ao modelo de GM.

Em geral, os valores do fator bias para todos os modelos testados foram semelhantes entre si e próximos a 1, sendo que as respostas para o modelo de GM apresentou ajuste ligeiramente melhor, quando comparado aos demais modelos, com valores em torno de 0,98. Os valores obtidos para o fator de exatidão também apresentam respostas semelhantes entre si para os três modelos testados e os valores encontrados foram superiores a 1. O modelo LO apresentou o maior valor (1,1419), indicando que os valores preditos são em média 14% superior aos valores observados. Já para os demais modelos testados, estes valores foram de 1,1106 para o modelo de GM, e, ligeiramente superior para o valor de BR com valor igual a 1,1180, indicando que os valores preditos são em média 11% superiores aos valores observados.

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 predição do crescimento de *Cupriavidus necator* em cultivo com melaço cítrico como fonte de substrato e alimentação de nitrogênio durante a fase de produção para formação do copolímero P(3HB-co-3HV).

A Figura 4.30 apresenta o ajuste do modelo de GM aos dados experimentais do crescimento de *Cupriavidus necator* cultivado em melaço cítrico com alimentação de nitrogênio na fase de produção, mantendo-se um crescimento residual na formação do copolímero P(3HB-co-3HV). A linha pontilhada, perpendicular ao eixo das abscissas representa o momento da limitação em nitrogênio e início da fase de produção com alimentação contínua de nitrogênio. A partir deste ponto, a biomassa total corresponde tanto ao crescimento celular quanto ao acúmulo de biomassa.

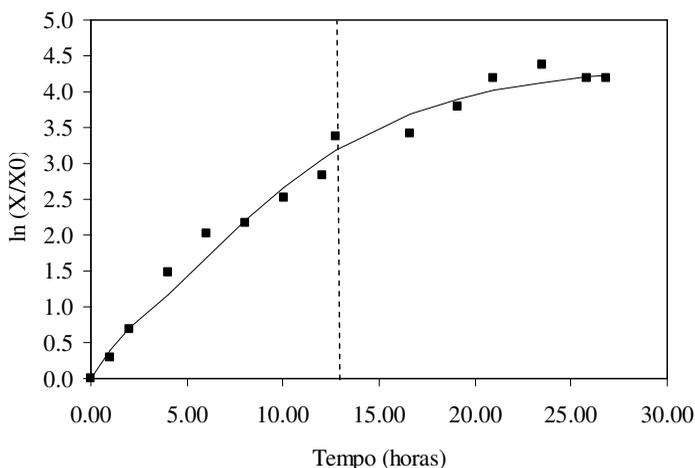


Figura 4. 30 - Curvas de crescimento de *C. necator* para produção de P(3HB-co-3V) expressa em $\ln(X/X_0)$ em função do tempo cultivada em melão cítrico com alimentação de nitrogênio na fase de produção. As linhas representam o Modelo de Gompertz Modificado ajustado aos dados experimentais, com auxílio do *software* Matlab 7.0.

A partir das curvas ajustadas na Figura 4.30 pelo modelo de Gompertz Modificado, obtiveram-se os parâmetros $\mu_{\text{máx}}$, λ e A. Os valores para estes diferentes parâmetros foram de $0,2564 \text{ h}^{-1}$ para a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e de 4,3260 para o aumento logarítmico da população (A), sendo que o cultivo não apresentou fase de adaptação ao meio.

Como a alimentação em nitrogênio se dá no início da fase de produção, os valores dos parâmetros de crescimento para este cultivo, são próximos aos apresentados nos cultivos em melão cítrico sem alimentação, apresentados na Tabela 4.8 (item 4.4.1.1).

Quando se compara as Figuras 4.29 (b) (em melão cítrico com carência) e 4.30 (em melão cítrico com alimentação de nitrogênio na fase de produção) observa-se que a bactéria apresenta o mesmo comportamento nos dois cultivos em relação ao crescimento. Quando se avalia o valor de λ , observa-se que a bactéria não apresentou fase de adaptação ao meio, iniciando crescimento exponencial logo no início do cultivo. Dessa forma, pode-se perceber que as velocidades específicas máximas de crescimento para este cultivo ($0,256 \text{ h}^{-1}$) estão dentro da

faixa normalmente encontrada (KOYAMA e DOI, 1995) e o μ_{\max} para o cultivo realizado apenas com melaço cítrico ($0,308 \text{ h}^{-1}$), com carência em nitrogênio, se apresenta ligeiramente superior quando comparado a este valor.

A duração de crescimento não limitado é praticamente a mesma para ambos os cultivos, sendo que obteve duração de 10,2 h, para cultivo em carência em nitrogênio e de 12,0 h, para o cultivo com alimentação de nitrogênio. Depois desse tempo, no cultivo realizado com carência de nitrogênio, a bactéria entra em fase estacionária e estabiliza seu crescimento até o final da cultura, apresentando um aumento logarítmico da população (A) em torno de 4,104. Já no cultivo com alimentação em nitrogênio, durante a fase de produção, a bactéria foi mantida sob um crescimento residual em torno de $0,2 \text{ g}_{\text{Xr}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, verificando-se dessa forma um aumento logarítmico da população (A) superior ao cultivo em carência e em torno de 4,326. Dessa maneira, demonstra-se que provavelmente o acúmulo de biomassa tenha sido maior, já que a limitação do crescimento ocorreu com praticamente a mesma concentração de biomassa (em torno de $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) e praticamente no mesmo momento.

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

Como mostrado no item anterior, o modelo de Gompertz Modificado foi o que apresentou os melhores ajustes para descrever os parâmetros de crescimento (μ_{\max} , λ e A) de *C. necator* em todas as condições de estudo testadas. Como a produção de P(3HB-co-3HV) está relacionada à limitação do crescimento e alimentação de ácido propiônico como precursor das unidades 3HV, utilizou-se as equações do modelo para a definição do momento da limitação do crescimento, a fim de definir o momento exato do início da fase de produção e, assim, evitar desperdícios do precursor e auxiliar numa maior produção do polímero pela célula. O modelo de Gompertz Modificado é um modelo sigmoidal, com um ponto de inflexão coincidente com o momento em que a velocidade é máxima.

Dalcanton (2006) propôs uma metodologia para se identificar o momento da limitação em nitrogênio no cultivo baseando-se no momento em que a velocidade específica de crescimento é máxima. Para se conhecer esse momento, se fez a 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 então o pulso da fonte de carbono e alimentação contínua do ácido propiônico para promover a produção do copolímero P(3HB-co-3HB). No caso do cultivo com alimentação de nitrogênio, a definição deste momento será importante para o início da alimentação deste nutriente durante a fase de produção.

A derivada da equação de Gompertz Modificado é representada pela Equação (4.5) (Dalcanton, 2006)

$$\frac{dy}{dt} = a(\exp(-\exp(b-ct)))(-\exp(b-ct))(-c) \quad (0.3)$$

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

Os dados para os parâmetros de crescimento de *Cupriavidus necator* (μ_{\max} ; λ e A) obtidos nos itens anteriores para os cultivos em glicose, melaço cítrico (item 4.4.1.1 – Tabela 4.9), e melaço cítrico com alimentação de nitrogênio na fase de produção (item 4.4.1.2), foram utilizados para o cálculo da velocidade específica de crescimento conforme descrito na Equação (4.5).

A Figura 4.31 apresenta o gráfico da derivada da equação de GM em função do tempo (Equação 4.5) e o consumo de nitrogênio ao longo da cultura, para os experimentos utilizando a glicose e o melaço cítrico como fonte de carbono, com ou sem alimentação de nitrogênio. Novamente serão apresentados neste item apenas os cálculos para os cultivos que apresentaram os melhores resultados em glicose e em melaço cítrico. Os resultados para os demais cultivos estão apresentados no Anexo I, Figura A.14.

A partir da Figura 4.31 é possível observar o momento em que derivada é máxima, que corresponde à velocidade específica máxima de crescimento em cada cultivo, ou seja, onde ocorre o pico na curva, e compará-lo ao momento em que ocorre o início da limitação em nitrogênio. Os dados obtidos para velocidade máxima específica e para o momento da limitação para cada cultivo expressos na Figura 4.31 estão apresentados na Tabela 4.11.

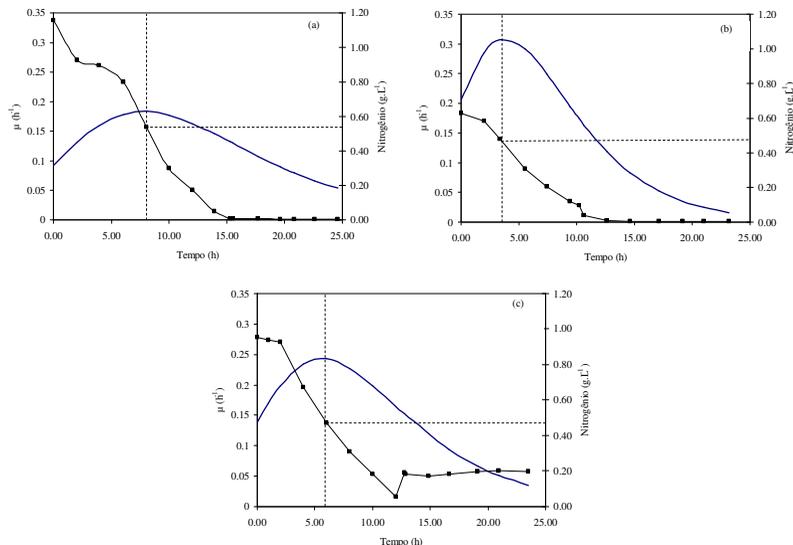


Figura 4. 31 - Evolução do μ pelo tempo (—) e consumo de nitrogênio pelo tempo (•) nos cultivos utilizando como fonte de carbono (a) glicose, (b) melação cítrico e (c) melação cítrico com alimentação de nitrogênio na fase de produção

Tabela 4. 11 - Tempo de cultivo no qual a velocidade específica de crescimento é máxima e onde ocorre a limitação de nitrogênio, nas culturas utilizando diferentes fontes de carbono como substrato. glicose e melação cítrico, para produção de P(3HB-co-3HV)

Culturas	Tempo (h) onde $\mu_{\text{máx}}$	Limitação de N (h)	Diferença de tempo onde $\mu_{\text{máx}}$ e limitação em N (h)
Glicose	8,00	12,0	4,0
Melação (carência nitrogênio)	4,00	10,2	6,2
Melação (alimentação nitrogênio)	6,00	12,0	6,0

Avaliando os dados da Tabela 4.11 é possível relacionar o momento em que a velocidade específica de crescimento é máxima e o

momento em que se inicia o processo de limitação em nitrogênio, e, conseqüentemente o início da fase de produção do copolímero. A partir do momento em que a bactéria atinge $\mu_{\text{máx}}$, a fase de produção do polímero inicia-se logo depois de aproximadamente 5,40 ($\pm 1,4$) horas. Estes resultados apresentam-se semelhantes aos resultados encontrados por Dalcanton (2006), que observou que a partir do $\mu_{\text{máx}}$, a fase de produção do polímero inicia-se após aproximadamente 5,04 ($\pm 0,27$) horas. Esse comportamento foi observado em ambos os cultivos apresentados na Figura 4.31, nos quais foram utilizadas diferentes fontes de substrato, com administração de ácido propiônico na fase de produção para induzir a formação do copolímero.

Com estes resultados, pode-se prever o momento da limitação de nitrogênio a partir do momento em que a velocidade específica de crescimento é máxima, auxiliando assim no momento exato para administrar a alimentação de carbono, para promover alto conteúdo de substrato para acúmulo do polímero, e, iniciar também a alimentação contínua de ácido propiônico como co-substrato para acúmulo do copolímero evitando dessa forma desperdícios em vista do seu alto custo e evitando que este co-substrato seja utilizado para o crescimento ao invés da produção de copolímero caso seja administrado antes do momento da limitação. Da mesma forma, no cultivo com manutenção residual de crescimento na fase de produção, pode-se determinar o momento exato da limitação e conseqüentemente submeter o cultivo à alimentação contínua de nitrogênio provendo desta forma maior acúmulo do copolímero.

4.5 Extração e Caracterização do P(3HB-co-3HV)

PHAs despertam grande atenção devido às suas características, muito próximas às de plásticos petroquímicos, além de sua completa biodegradabilidade. As propriedades físicas do homopolímero P(3HB) ($T_g = 4^\circ\text{C}$, $T_m = 177^\circ\text{C}$, e 60-80% de cristalinidade) assemelham-se às propriedades físicas do polipropileno (PP) ($T_g = -10^\circ\text{C}$, $T_m = 176^\circ\text{C}$, e 60% de cristalinidade). No entanto, sabe-se que o P(3HB) é um material rígido e quebradiço e isso tem, portanto, limitado suas aplicações. A incorporação das unidades 3HV na cadeia polimérica de copolímeros P(3HB-co-3HV) melhora as propriedades físicas e diminui a cristalinidade do copolímero, formando um plástico mais flexível e mais atrativo industrialmente (DOI, 1990).

Inúmeros estudos são realizados para caracterização destes polímeros. Em estudos realizados por Anderson e Madden (1998) perceberam-se diferenças no ponto de fusão do polímero de acordo com a fração molar de 3HV acumulada, sendo que este valor tende a diminuir com o aumento da incorporação das unidades 3HV.

Estão apresentados a seguir os resultados referentes à caracterização do polímero P(3HB-*co*-3HV) obtido, após processo de extração, produzido a partir das diferentes fontes de substrato administradas (glicose e melão cítrico). Nesta etapa, buscou-se realizar a caracterização dos mesmos e compará-los com os polímeros padrões produzidos industrialmente.

Os resultados de extração dos polímeros foram comparados pela porcentagem de recuperação, porcentagem de pureza e caracterização dos filmes obtidos. Após a obtenção dos filmes nos diferentes substratos estudados, foi possível determinar as porcentagens de pureza e conseqüentemente as porcentagens de recuperação dos filmes de P(3HB-*co*-3HV). A Tabela 4.12 apresenta uma comparação entre as porcentagens de pureza e recuperação dos filmes obtidos pelo método de extração descrito por Dalcanton (2006).

Tabela 4. 12 - Porcentagem de pureza e porcentagem de recuperação dos filmes obtidos

Amostra de polímero	% pureza	% recuperação	% HV
P(3HB- <i>co</i> -3HV) – Glicose	96	92	4,4
P(3HB- <i>co</i> -3HV) - Melão cítrico	94	89	3,7
P(3HB) Industrial	98	94	----

A partir da determinação da porcentagem de P(3HB-*co*-3HV) acumulado intracelularmente, analisado por análise cromatográfica, foi possível obter a porcentagem de pureza (Equação 3.19) dos filmes obtidos nos cultivos com diferentes fontes de substrato utilizadas. Como pode ser observado na Tabela 4.12, o filme obtido após a extração do padrão P(3HB) da PHB Industrial foi o que apresentou maior porcentagem de pureza (98%). Para o copolímero P(3HB-*co*-3HV) obtido a partir do cultivo em glicose (96%) e melão cítrico (94%) essa porcentagem foi aproximadamente a mesma. Sabendo-se a pureza dos filmes, é possível calcular a porcentagem de recuperação (Equação 3.20)

pela massa de filme obtida após a extração, onde novamente o polímero P(3HB) Industrial apresentou a maior recuperação, com 94% de polímero recuperado. Para os demais cultivos, a porcentagem de recuperação do copolímero foi de 92% para o cultivo em glicose e 89% para o cultivo em melaço cítrico. Analisando-se os filmes pelas porcentagens de pureza e recuperação, pode-se dizer que os copolímeros extraídos apresentaram bons resultados comparados ao padrão comercial extraído P(3HB) Industrial.

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 4.13 apresenta a porcentagem de perda de massa obtida para cada condição de filme testada, onde os dados obtidos foram comparados com os resultados de cromatografia gasosa.

Tabela 4. 13 - Porcentagens de perda de massa obtidas através da análise termogravimétrica (TGA) para os filmes de P(3HB-co-3HV) obtidos em cultivos realizados com diferentes substratos e para o filme de P(3HB) Industrial

Amostra de polímero	% de perda de massa
P(3HB-co-3HV) – Glicose	97,5
P(3HB-co-3HV) - Melaço cítrico	96,0
P(3HB) Industrial	98,2

A porcentagem de perda de massa apresentada na Tabela 4.13 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 4.12 mostram uma variação média de 2% das repostas obtidas pela análise de TGA, para os cultivos em glicose e melaço, sendo que para o P(3HB) a resposta foi idêntica, confirmando dessa maneira os resultados obtidos.

A presença de impurezas interfere em muitas propriedades finais dos produtos acabados, como nas temperaturas de fusão, de transição vítrea e cristalização do copolímero, gerando mudanças na coloração ou grau de transparência, odor e brilho do filme gerado (CAMARGO, 2003). Os filmes extraídos pelo método de extração sugerido por

Dalcanton (2006) apresentaram poucas impurezas, sugerindo ser um método eficiente, rápido e prático na obtenção de biofilmes em escala laboratorial.

Cabe ressaltar, entretanto, que este processo tornar-se-ia inviável para a implementação em escala industrial devido ao fato da toxicidade do solvente, pela elevada demanda de solvente requerida e pelo elevado custo deste método de extração. Mas este procedimento é fundamental para os estudos na etapa de laboratório. Para aplicação em escala industrial seria necessária a otimização do processo de extração através da utilização de solventes menos agressivos ou métodos de extração alternativos que reduzissem os custos de extração.

4.5.1 Caracterização dos filmes

A incorporação de unidades 3HV no homopolímero P(3HB) para produção de termopolímeros apresenta uma profunda influência nas propriedades térmicas dos mesmos. Para avaliar o efeito da incorporação das unidades 3HV, os filmes obtidos nos cultivos realizados com diferentes substratos e extraídos pelo método proposto por Dalcanton (2006) foram caracterizados por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e por análise termogravimétrica (TGA). As propriedades térmicas do filme do P(3HB) fornecido pela PHB Industrial e do copolímero padrão P(3HB-co-3HV) da SIGMA ALDRICH com 12 mol% de 3-hidroxivalerato foram determinadas e utilizadas para comparar as características dos copolímeros produzidos experimentalmente com as características dos polímeros industriais.

4.5.1.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As determinações realizadas pelo método de DSC foram: temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m), temperatura de transição vítrea (T_g) e porcentagem de cristalinidade (χ_c). Os resultados da análise térmica por DSC dos filmes obtidos nos diferentes substratos estudados e do filme P(3HB) Industrial encontram-se na Tabela 4.14. No Anexo III, Figuras A.1, A.2 e A.3 estão apresentadas as curvas geradas pela análise de DSC para as amostras dos filmes extraídos, juntamente com a amostra de P(3HB) Industrial.

Tabela 4. 14 - Propriedades térmicas obtidas pela análise de calorimetria DSC para os filmes de P(3HB-*co*-3HV) obtidos em cultivos realizados com diferentes substratos e para os filmes de P(3HB) Industrial e P(3HB-*co*-3HV) SIGMA ALDRICH

Amostra de polímero	T _m (°C) ¹	T _g (°C) ²	ΔH _m (J.g ⁻¹) ³	χ _c (%) ⁴	% HV
P(3HB- <i>co</i> -3HV) – Glicose	165,7	-3,83	70,94	50,0	4,4
P(3HB- <i>co</i> -3HV) – Melaço cítrico	167,3	3,62	79,97	56,3	3,7
P(3HB- <i>co</i> -3HV) Sigma Aldrich ^a	161,0	-1,37	59,41	41,8	12,0
P(3HB) Industrial	175,4	5,88	91,40	64,4	---

^aFonte: Marangoni (2000) ¹T_m – temperatura de fusão; ²T_g – temperatura de transição vítrea;

³ΔH_m – variação da entalpia de fusão; ⁴χ_c – porcentagem de cristalização

Observando-se a Tabela 4.14, percebe-se que os valores para temperatura de fusão (T_m) dos diferentes copolímeros P(3HB-*co*-3HV) analisados decrescem de 167,3°C (cultivo em melaço cítrico) para 161,0°C (copolímero industrial), conforme aumenta o conteúdo de 3HV no copolímero, mostrando que o copolímero obtido experimentalmente neste estudo tem características próximas ao copolímero industrial. Estes valores de T_m dos filmes obtidos experimentalmente apresentam também valores inferiores ao homopolímero P(3HB) Industrial (175,4°C), o que torna os copolímeros produzidos com características industriais atraentes em relação ao P(3HB).

Em estudos realizados por Anderson e Madden (1998) perceberam-se diferenças na T_m do copolímero de acordo com a fração molar das unidades de 3HV. Além disso, alimentações prolongadas de ácido propiônico como precursor para incorporação das unidades 3HV podem afetar a porcentagem de cristalização, aproximando-se do valor obtido ao homopolímero P(3HB).

Como os copolímeros produzidos experimentalmente apresentam 3,7 mol% de 3HV (cultivo melaço cítrico) e 4,4 mol% de 3HV (cultivo glicose) e o copolímero industrial possui 12 mol% de 3HV, estes resultados estão de acordo com Lee (1996a), onde se apresenta que a T_m diminui com o aumento da quantidade de 3HV incorporada ao copolímero. Em outros estudos realizados por Zhang e Wang (1994) foi observado que apenas 3 mol% de conteúdo de 3HV já se pode diminuir em até 13 a 14°C a T_m do copolímero em relação ao homopolímero, o que pode ser observado na comparação dos copolímeros produzidos ao

P(3HB) Industrial testado, apresentando uma redução de aproximadamente 9°C na T_m para ambos os cultivos. Os dados de T_m obtidos pela análise de DSC foram similares aos dados de T_m de copolímeros P(3HB-co-3HV) aleatórios produzidos por outros autores (BLUHM *et al.*, 1986; AKHTAR, 1988; SCANDOLA *et al.*, 1992; SAVENKOVA, 2000; MARANGONI, 2000; SQUIO, 2003; KEENAN, 2004). A mínima temperatura de fusão encontrada para o copolímero P(3HB-co-3HV) reportada na literatura foi de 75°C com aproximadamente 40 mol% de unidades 3HV (KUNIOKA *et al.*, 1989). O valor para a T_m encontrado para o P(3HB) Industrial (175,4°C) também está de acordo com a literatura que cita valores no intervalo de 174°C a 180°C (ANDERSON e DAWES, 1990; GOMEZ e BUENO NETO, 1997).

A T_m é uma característica muito importante desde que a temperatura na qual ocorra a degradação molecular do polímero não decresça na mesma extensão com a incorporação do conteúdo 3HV, caso contrário a diferença global entre a temperatura de início de degradação térmica (T_i) e a T_m do polímero se torna muito baixa, dificultando dessa forma a processabilidade dos filmes formados (SAVENKOVA, 2000). A T_m obtida para as amostras de P(3HB-co-3HV) produzidas experimentalmente a partir de *C. necator* apresenta valores favoráveis para perspectivas futuras de processamento destes polímeros.

As temperaturas de transição vítrea (T_g) encontradas para os diferentes filmes extraídos estão de acordo com os dados pesquisados na literatura, que se encontram entre -5°C a 5°C, decrescendo ligeiramente com a incorporação das unidades 3HV (ANDERSON e DAWES, 1990). Segundo Lucas *et al.* (2001), quanto mais baixa é a temperatura de transição vítrea, mais flexível é o polímero. A mudança na T_g para as amostras analisadas neste estudo apresentaram um perfil de declínio em seus valores quando comparados ao homopolímero P(3HB) Industrial.

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). Observando os valores para determinação do grau de cristalinidade, na Tabela 3, pode-se notar que o homopolímero P(3HB) Industrial apresentou porcentagem de cristalinidade de 64,4%, a qual foi superior aos filmes de copolímeros produzidos experimentalmente, sendo que o copolímero produzido em cultivo que utilizou glicose como substrato obteve porcentagem de cristalinidade de 50,0% e o copolímero produzido a partir de melão cítrico obteve 56,3%

contra 41,8% do copolímero industrial.

A variação da entalpia de fusão (ΔH_m) dos copolímeros testados (Glicose: 70,94 J.g⁻¹; Melaço cítrico: 79,97 J.g⁻¹ e Copolímero Industrial: 59,41 J.g⁻¹) foram relativamente mais baixos quando comparados ao homopolímero P(3HB) Industrial (91,40 J.g⁻¹). A redução na ΔH_m em certos termopolímeros é indicativa de uma ampla parte amorfa no polímero (MADDEN, 2000). Segundo Madden *et al.* (1998), os valores da variação de entalpia de fusão estão dentro da faixa de valores que indicam que estes polímeros possuem uma distribuição randômica das unidades de 3HV. O decréscimo na ΔH_m quando comparado o homopolímero ao copolímero, segundo a teoria de cristalização de Hoffman-Hoffman *et al.* (1976) e a presença de porcentagem de cristalinidade menor para o copolímero, em relação ao homopolímero, indicam que as unidades de 3HV possivelmente não estejam incluídas na fase cristalina (De Koning, 1995). De fato, a cristalinidade do polímero aumenta com o aumento da entalpia de fusão.

Os resultados deste estudo estão de acordo com os resultados encontrados na literatura. Khanna e Srivastava (2005a) sugerem que a diminuição nos níveis de cristalinidade é obtida através da incorporação de unidades de 3HV ao homopolímero 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%. Agus *et al.*, (2006), também sugere que a incorporação de unidades de 3HV diminui 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).

Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que as frações 3HV diminuem a cristalinidade, resultando assim em filmes mais flexíveis e com maior aplicabilidade quando comparado com o P(3HB). O filme obtido experimentalmente tanto com melaço cítrico quanto com glicose, apresentaram um grau de cristalinidade menor que o homopolímero, mostrando dessa forma, que os filmes de P(3HB-co-3HV) produzidos apresentam uma boa cristalinidade para aplicações industriais.

4.5.1.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise TGA permite a determinação da temperatura de início de degradação térmica (T_i), temperatura máxima de degradação (T_{pico}) e a porcentagem de perda de massa de cada filme de P(3HB-co-3HV)

extraído a partir das células de *C. necator* cultivadas em diferentes substratos e a partir das amostras comerciais de P(3HB) industrial e P(3HB-co-3HV) padrão da SIGMA ALDRICH avaliadas para base de comparação. Os dados para análise de TGA para o padrão P(3HB-co-3HV) da SIGMA ALDRICH utilizados neste estudo foram baseados em estudos realizados por Marangoni (2000). No Anexo III, Figuras A.4, A.5 e A.6 estão apresentadas as curvas termogravimétricas geradas pela análise de TGA das amostras dos filmes extraídos, juntamente com a amostra de P(3HB) industrial. A Tabela 4.15 apresenta os valores de T_i , T_{pico} e % de perda de massa, obtidas a partir da análise de TGA.

Tabela 4. 15 - Propriedades térmicas obtidas na análise de TGA para os filmes de P(3HB-co-3HV) obtidos em cultivos realizados com diferentes substratos e para os filmes de P(3HB) Industrial e P(3HB-co-3HV) SIGMA ALDRICH

Amostra de polímero	T_i (°C)	T_{pico} (°C)	% perda de massa
P(3HB-co-3HV) – Glicose	279,8	307,2	97,5
P(3HB-co-3HV) – Melaço cítrico	282,6	308,5	96,0
P(3HB-co-3HV) Sigma Aldrich ^a	276,8	308,2	99,1
P(3HB) Industrial	282,4	310,0	98,2

^aFonte: Marangoni (2000)

Observando-se a Tabela 4.15, nota-se que a T_i para as amostras de copolímeros e homopolímero avaliadas ocorreram na faixa de temperatura de 279,8°C a 282,6°C. Para todas as amostras de P(3HB-co-3HV) testadas pela análise de TGA, a T_i da cadeia polimérica ocorre a 114,1°C (glicose), 115,3°C (melaço) e 115,8°C (copolímero Sigma Aldrich) acima de suas respectivas T_m , comparado com a diferença de 107°C para o homopolímero.

Quanto à T_{pico} , observa-se que os filmes de P(3HB-co-3HV) obtidos experimentalmente, as quais foram de 307,2°C para cultivo em glicose e 308,5°C para cultivo em melaço cítrico, apresentaram valores muito próximos ao obtido para o copolímero industrial P(3HB-co-3HV) da Sigma Aldrich (308,2°C), enquanto que o polímero P(3HB) Industrial apresentou valor de T_{pico} (310,0°C) ligeiramente superior.

O método de extração utilizado neste trabalho, baseado em Dalcanton (2006), 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. Os resultados encontrados por estes autores para T_i , quando o P(3HB) foi estudado isoladamente foi de 278°C com perda de massa total. Dalcanton (2006) encontrou valores de T_{pico} e T_i para o P(3HB) Industrial de 324°C e 306°C, respectivamente, com perda de massa de 98%. Marangoni (2000) caracterizou o copolímero P(3HB-co-3HV) produzido a partir de células de *C. necator*, com 11 mol% de unidades 3HV e o valor encontrado para T_{pico} e T_i foi de 313,12°C e de 291,40°C, respectivamente. Keenan *et al.* (2004) caracterizou amostras de P(3HB-co-3HV) produzidos por *Burkholderia cepacia* a partir de xilose e ácido levulínico, com frações de 3HV variando de 0 - 61 mol% 3HV encontrando T_i no intervalo de 273,4°C a 225,5°C, exibindo perfil semelhante ao perfil da T_m , ou seja, os valores de T_i reduziram conforme o aumento das frações 3HV. Estes mesmos autores encontraram que para todas as amostras de P(3HB-co-3HV) testadas por TGA, a T_i das cadeias poliméricas ocorreu no intervalo de 54°C a 100°C acima de suas respectivas T_m , apresentando diferença média de 92°C.

Os valores obtidos neste estudo apresentaram estabilidade térmica semelhante aos autores citados acima, com valores de T_i e T_{pico} muito próximos aos encontrados por Marangoni (2000) e Keenan *et al.* (2004). No entanto as amostras testadas neste estudo diferem das amostras testadas por Keenan *et al.* (2004) no que diz respeito à redução da T_i conforme aumento das frações 3HV, sendo que este comportamento não foi notavelmente observado nas amostras testadas. Isso pode ter ocorrido em virtude da baixa fração de unidades 3HV incorporadas nos filmes experimentais (3,7 mol% de unidades 3HV no cultivo em melão cítrico e 4,4 mol% de unidades 3HV no cultivo em glicose) quando comparadas ao P(3HB-co-3HV) da SIGMA ALDRICH (12 mol% de unidades 3HV), o qual apresentou uma redução ligeiramente superior quando comparada aos demais filmes testados.

A T_i mostra um perfil semelhante ao perfil da T_m em relação ao aumento das frações 3HV no copolímero, embora se apresentem menos previsíveis em maiores porcentagens de frações 3HV. No entanto a T_i do polímero não decresce com o mesmo padrão ou com a mesma extensão como sua correspondente T_m durante o aumento das incorporações 3HV nestes polímeros. Sobretudo, a relativa ampla faixa de diferença entre os valores de T_m e T_i na degradação molecular permite a aplicação de uma ampla variedade de procedimentos capazes de derreter os polímeros sem comprometer a sua massa molecular e as suas propriedades mecânicas e físicas, as quais são essenciais na

substituição aos plásticos não-degradáveis (KEENAN, 2004).

Os copolímeros produzidos experimentalmente apresentaram valores de T_i muito próximos também ao P(3HB) Industrial avaliado neste estudo, mas a diferença entre os valores de T_m e T_i para os copolímeros testados foi ligeiramente superior. É interessante ressaltar que a temperatura de decomposição é um fator muito atrativo comercialmente, uma vez que esta característica favorece a sua aplicação nos processos de transformação. Dessa forma é necessário que se estudem métodos mais eficientes para incorporação de unidades 3HV para que se obtenham maiores temperaturas de degradação, melhorando assim as características de processabilidade dos filmes formados.

CAPÍTULO V

5 CONCLUSÕES E SUGESTÃO

Este trabalho teve como objetivo geral: desenvolver estratégias de produção de P(3HB-*co*-3HV) por *C. necator* a partir de melaço cítrico, com aumento de valor agregado deste resíduo e, conseqüentemente, reduzir os custos de produção do polímero. Estudou-se a estimativa da biomassa presente no bioreator e o aumento da porcentagem de oxigênio dissolvido para determinação do momento da limitação da cultura, a estratégia de alimentação de em nitrogênio na fase de produção, afim de obter aumento da produtividade do polímero, a aplicação da transferência de oxigênio e da modelagem matemática para acompanhar o comportamento do microrganismo nas fases de crescimento e produção do copolímero P(3HB-*co*-3HV) e, por fim, realizou-se a caracterização dos polímeros obtidos nos diferentes substratos.

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- O rápido aumento da porcentagem de oxigênio dissolvido no meio no momento da limitação, que pode ser acompanhado pela estimativa da biomassa presente no cultivo, apresentou-se como bom método para indicar o início da fase de produção de P(3HB-*co*-3HV) e marcar o início da alimentação em ácido propiônico.
- Os experimentos realizados em glicose e melaço cítrico mostraram que *C. necator* é capaz de desenvolver-se e produzir o copolímero P(3HB-*co*-3HV) em melaço cítrico, apresentando comportamento muito similar ao encontrado em glicose, porém com velocidade específica de crescimento superior, na faixa 0,23 a 0,35 h⁻¹, comparado com 0,19 h⁻¹ em glicose.
- Alimentação em nitrogênio na fase de produção em cultura de *C. necator* melhorou a composição molar do copolímero P(3HB-*co*-3HV), porém não foi observado aumento na produtividade. A elevada razão de nitrogênio levou a um grande crescimento residual de biomassa e acúmulo de proteínas, desfavorecendo o acúmulo do polímero.
- O estudo da transferência de oxigênio permitiu concluir que para os valores de $k_L a$ obtidos durante a análise dos cultivos, os valores reais da concentração de oxigênio dissolvido podem ser obtidos diretamente das leituras utilizando sensor relativamente rápido ($k_p = 498 \text{ h}^{-1}$ no primeiro uso da membrana). Verificou-se que o tempo de

uso danifica a membrana e influencia na determinação deste parâmetro apresentando necessidade de correção ($k_p = 247 \text{ h}^{-1}$ no quarto uso da membrana).

- A determinação dos parâmetros de QO_2 , $k_L a$, m_o e Y_o permitiram acompanhar o crescimento do microrganismo, tanto em glicose quanto em melão cítrico, apresentando comportamento de consumo de oxigênio similar em ambas as culturas.
- O modelo de Gompertz Modificado foi o que apresentou os melhores ajustes para descrever os parâmetros de crescimento: velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), tempo de fase lag (λ) e aumento logarítmico da população (A) de *C. necator* 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 tanto em glicose como em melão cítrico. A partir do momento em que a bactéria atinge seu $\mu_{\text{máx}}$, a fase de produção se inicia após 5,4 ($\pm 1,4$) horas.
- As propriedades térmicas do copolímero P(3HB-co-3HV) produzido com melão cítrico apresentou características similares aos produzidos em glicose, e ambos apresentaram resultados próximos ao copolímero industrial, apresentando temperatura de fusão ligeiramente superior, uma vez que apresentaram menor porcentagem de acúmulo das unidades 3HV. Por outro lado, apresentaram características superiores quando comparados ao homopolímero industrial P(3HB), com menor temperatura de fusão e menor cristalinidade, apresentando características promissoras para produção industrial.

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

- Determinar a concentração de ácido propiônico durante a cultura para verificar o consumo deste co-substrato pelo microrganismo.
- Desenvolver novas estratégias de alimentação de nitrogênio para aumentar a produtividade e a composição molar do copolímero P(3HB-co-3V).
- Verificar a produção de monômeros 3HV utilizando diferentes estratégias de alimentação de propionato de potássio e/ou ácido propiônico, durante a fase de produção, com a finalidade de aumentar a porcentagem das unidades 3HV no copolímero.
- Testar a utilização e a influência de suplementação de óleos vegetais em cultivos utilizando melão cítrico para produção do copolímero, com a finalidade de obter maiores concentrações de biomassa e

consequentemente maior acúmulo de copolímero.

- Estudar a biodegradabilidade do copolímero produzido a partir do melão cítrico.

REFERÊNCIAS

- AIBA, S.; HUANG, S.Y. Oxygen permeability and diffusivity in polymer membranes in immersed liquids. *Chem. Eng. Sci.*, 24:1149-1159, 1969.
- 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.
- AKHTAR, S.; POUTON, C.W.; NOTARIANNI, L.J.; GOULD, P.L. The crystalline nature of polyhydroxybutyrate (PHB) and related copolymers. *J. Pharm Pharmacol.*, v.40, p. 118, 1988.
- AMPE, F. **Métabolism du benzoate chez *Alcaligenes eutrophus*: quels mécanismes physiologiques régulent la biodégradation des composés aromatiques?** . 1995. 237p. These (Doctorat spécialité: Microbiologie – Biotechnologie) – L L’institut National des Sciences appliquees de Toulouse, Toulouse.
- 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.
- ANDERSON, A.J.; MADDEN, L.A. Synthesis and Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) polymer mixtures produced in high density fed-batch cultures of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*). *Macromol.*, v. 31, p. 5660-5667, 1998.
- ANSEJO, J.A.; SCHMIDT, A.S.; ANDEERSON, 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.
- ARAGÃO, G. M. F. **Production de polyhydroxyalcanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l’optimisation de la mise en oeuvre des cultures.** 1996. 162p. These (Doctorat spécialité: Biologie et génétique Moléculaires et Cellulaires – Biotechnologie) – L’institut National des Sciences appliquees de

Toulouse, Toulouse.

ARAGÃO, G. M. F.; LINDLEY, N. D.; URIBELARREA, J. L.; PAREILLEUX, A. Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**, v. 18, p. 937-942, 1996.

ASRAR, J. & HILL, J. C. Biosynthetic processes for linear polymers, **Journal of Applied Polymer Science**, v. 83, p. 457-483, 2002.

BAPTIST, J. N. Process for preparing poly- β -hydroxybutyric acid. **US Patent Application** 30.366.959, 1962a.

BAPTIST, J. N. Process preparing poly- β -hydroxybutyric acid. **US Patent Application** 3.044.942, 1962 b.

BASTOS, V.D. Biopolímeros e Polímeros de Matérias-Primas Renováveis Alternativos aos Petroquímicos. **Revista do BNDES**, v.14, n. 28, p. 201-234, 2007.

BITAR, A. e UNDERHILL, S. Effect of ammonium supplementation on production of poly-b-hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in batch culture. **Biotechnology Letters**, v. 12, p. 563-568, 1990.

BLUHM, T.L.; HAMER, G.K.; MARCHESSAULT, R.H. Isodimorphism in bacterial poly(β -hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). **Macromoléculas**, v. 19, p. 2871-2876, 1986.

BOURQUE, D.; OUELLETE, B.; ANDRÉ, G.; GROLEAU, D. Production of poly-bhydroxybutirate from methanol: characterization of a new isolate of *Methylobacterium extorquens*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 37, p. 7-12, 1992.

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.

BRANDL, H., GROSS, R. A., LENZ, R. W., *et al.*, "Plastics from bacteria and for bacteria: poly(β -hydroxyalkanoates) as natural,

biocompatible, and biodegradable polyesters”, *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, v. 41, pp. 77-93, 1990.

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.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; RENNER, G.; ZEISER, A.; HAAGE, G.; LOIDL-LANTHALER, K. Kinetics as a tool for polyhydroxyalkanoate production optimization. *Can. J. Microbiol.*, v. 41, p. 239-248, 1995.

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.

BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *TIBTECH*, v. 5, p. 246-250, 1987.

BYROM, D. Industrial production of copolymers from *Alcaligenes eutrophus*. In: DAWES, E.A.(ed) *Novel biodegradable microbial Polymers*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 113-117, 1990.

BYROM, D. Production of poly- β -hydroxybutyrate: poly- β -hydroxybutyrate copolymers. *FEMS Microb. Reviews*, v. 103, p. 247-250, 1992.

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

CHANG, Y.K.; KIM, B.S.; LEE, S.C.; LEE, S.Y.; CHANG, M.N.; WOO, S.I. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnol. and Bioeng.*, v. 43, p. 892-898, 1994.

CHEMICAL MARKET REPORTER,

<<http://chemicalmarketreporter.com>>, acessado em 09/09/2008.

CHEN, G.Q.; KONIG, K.H.; LAFFERTY, R.M. Production of poly-D(-)-3-hydroxybutyrates and poly-D(-)-3-hydroxyvalerate by strains of *Alcaligenes latus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 60, p. 61-66, 1991.

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. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 51, p. 13-21, 1999a.

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, 1999b.

COSTA, CP; FERREIRA, MC. Preservação de microrganismos. *Rev. Bras. Microbiol.* v. 22, p.263-8, 1991.

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

DALCANTON, F. **Produção, extração e caracterização de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos.** 2006. 132 p. Dissertação (Mestrado em engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

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.

DAWES, E. A.; *et al.* A survey of the accumulation of novel polyhydroxyalkanoates by bacteria. *Biotechnology letters.*, v.11, p.471-476, 1989.

De KONING, G. J. M. Physical properties of bacterial poly((R)-3-

hydroxyalkanoates). *Canadian Journal of Microbiology*, v. 41, n. 13, p. 303-309, 1995.

De KONING, G. J. M.; WITHOLT, B. A process for the recovery of poly(3-hydroxyalkanoates) from pseudomonads. 1. Solubilization. *Bioprocess Eng.*, v.17, p. 7-13, 1997a.

De KONING, G. J. M.; KELLERHALS, M.; van MEURS, C.; WITHOLT, B. A process for the recovery of poly(3-hydroxyalkanoates) from pseudomonads. 2. Process development and economic evaluation. *Bioprocess Eng.*, v. 17, p. 15-21, 1997b.

De SMET, M.J.; EGGINK, G.; WITHOLT, B.; DAWES, E.A. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *Journal Bacteriology*, v. 56, p. 3354-3359, 1983.

DINIZ, S. C. ; TACIRO, M. K.; GOMEZ, J. G. C.; PRADELLA, J. G. C. High-cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* IPT-046 and Medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production from sugar cane carbohydrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, EUA, v. 119, p. 51-69, 2004.

DOI, Y., TAMAKI, A., KUNIOKA, M., SOGA, K. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 28, p. 330-334, 1988.

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.

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.

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.

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, 2001a.

DU, C.G.; CHEN, J.; YU, J.; SHIYI, S. Feedind strategy of propionic adic for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Rastonia eutropha*. *Biochemical Engineering Journal*. v. 8, p. 103-110, 2001b.

ERKMEN, O. Predictive modeling 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 Engeneering*, 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.** 1997. 101p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

FIGLIANO, L. M. **Avaliação do crescimento de *Ralstonia eutropha* em resíduo da indústria de alimentos para a produção de polihidroxibutirato.** 2004.125p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FULLER, C.R.; DENNIS, D. *Pseudomonas oleovorans* as a source of Poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Applied an Environmental Microbiology*, v. 54, p. 1977-1982, 1988.

GALEGO, N., ROZSA, C., SANCHEZ, R., FUNG, J., VÁSQUEZ, A., TOMÁS, J.S. Characterization and application of poly(β -hydroxyalknoates) 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.; RODRIGUES, M. F. A.; ALLI, R. C. P.; TORRES, B. B.; BUENO NETTO, C. L.; OLIVEIRA, M. S.; SILVA, L. F. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Applied Microbiol. and Biotechnol.*, v. 45, p. 785-791, 1996.

GOMEZ, J.G.C. e BUENO NETTO, C.L. Produção de poliésteres bacterianos. In: LIMA, U.D.A. *Biotecnologia Industrial*. v. 3. São Paulo: Editora Edgar Blucher, p. 219-248, 2001.

GOMES, J. G. C. **Produção por *Pseudomonas* SP de Polihidroxicanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos**. 2000. 155p. Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

GRODZINSKI, J. J. Biomedical application of functional polymers. *Reactive & Functional Polymers*, v. 39, p. 99-138, 1999.

GROTHER, E. MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. Fermentation optimization for the production of poly(b-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 25, p. 132-141, 1999.

HAHN, S. K., CHANG, Y. K., KIM, B. S., *et al.*, Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, p. 256-261, 1994.

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.

HOFFMAN, J.D.; DAVIS, G.T.; LAURITZEN, J.I.; HANNAY, N.B. Treatise on solid state chemistry. *Plenum Press*, New York, 1976.

HOLDING, A.J.; SHEWAN, J.M. Genera of uncertain affiliation. In: *Bergey's Manual of systematic bacteriology, 18th ed. (Kriek et Holt eds.)* vol.1, p. 273-275. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1974.

HOLMES, P. A., WRIGHT, L. F., ALDERSON, B., *et al.* A process for the extraction of poly-3-hydroxybutyric acid from microbial cells, *European Patent*, nº 15.123, 1980.

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

HOLMES, P. A., LIM, G. B. Separation process, *U. S. Patent*, nº 4.910.145, 1990.

HOWELLS, E. R. Opportunities in biotechnology for the chemical industry. *Chemical Industry*, v. 8, p. 08-511, 1982.

HUIJBERTS, G. N. M.; EGGINK, G.; WAARD, P.; HUISMAN, G. W.; WITHOLT, B. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. *Applied Environ. Microbiol.*, v. 58, p. 536-544, 1992.

HUMPHREY, A.E.; TAGUCHI, H. Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. *J. Ferm. Technol.*, 44:881-889, 1966.

IENCZAK, J.L. **Valorização do resíduo da indústria processadora de suco de laranja com a produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator***. 2006. 104 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS – IPT. **Produção de plásticos biodegradáveis a partir de cana-de-açúcar por via biotecnológica**. Relatório No 31478/93, volume II. 103p., 1993.

JENDROSSEK, D.; SCHIRMER, A.; SCHLEGEL, H. G. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Appl. Microbiol.*

Biotechnol., v. 46, p. 451-463, 1996.

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. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates, *Process Biochemistry*, v. 40, p. 607-619, 2004.

KEENAN, T.M.; STUART, W.T.; STIPANOVIC, A.J.; NAKAS, J.P. Production and Characterization of poly- β -hydroxyalkanoate copolymers from *Burkholderia cepacia* utilizing xylose and levulinic acid. *Biotechnol. Prog.*, v. 20, p. 1697-1704, 2004.

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.

KIM, B. S., LEE, S. Y., CHANG, H. N. Production of poly-betahydroxybutyrate by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnology Letters*, v. 14, p. 811-816, 1992a.

KIM, J.H.; KIM, B.G.; CHOI, C.Y. Effect of propionic acid on poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric) acid production by *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnology Letters*, v. 14, p. 903-906, 1992b.

KIM, B.S.; LEE, S.Y.; CHANG, H.N.; CHANG, Y.K.; WOO, S.I. Production of poly-(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 43, p. 892-898, 1994a.

KIM, B.S.; LEE, S.C.; LEE, S.Y.; CHANG, H.N.; CHANG, Y.K.; WOO, S.I.; Production of PHB-HV by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate control using on-line glucose analyzer. *Enz. Microbiol. Technol.*, v. 16, p. 556-561, 1994b.

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

- KIM, Y. B., LENZ, R. W., "Polyesters from microorganisms". In: **Biopolyesters**, v. 71, **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, Springer-Verlag, p. 51-79, 2001.
- KIM, S.W.; KIM, P.; LEE, H.S.; KIM, J.H. High production of poly- β -hydroxybutyrate under potassium limitation. **Biotechnology Letters**, v. 18, p. 25-30, 1996.
- KING, P.P. Biotechnology. An industrial view. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**, v. 32, p. 2-8, 1982.
- KOYAMA, N.; DOI, Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from various carbon sources by batch-fed cultures of *Alcaligenes eutrophus*. **J Environ Polym Degrad.**, v. 3, p. 235-240, 1993.
- KOYAMA, N.; DOI, Y. Continuous production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 281-284, 1995.
- KUNIOKA, M.; TAMAKI, A.; DOI, Y. Crystalline and thermal properties of bacterial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxyvalerate). **Macromolecules**, v. 22, p. 694-697, 1989.
- LEE, S. Y.; LEE, K. M.; CHANG, H. N.; STEINBÜCHEL, A. Comparison of recombinant *Escherichia coli* strains for synthesis and accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) and morphological changes. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 44, p. 1337-1347, 1994.
- LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Production of poly(hydroxyalkanoic acid). **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 52, p. 27-85, 1995.
- 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.; Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 62, p. 546-553, 1999.
- LEE, W. H.; LOO, C. Y.; NOMURA, C.T.; SUDESH, K. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6844-51, 2008.
- LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de Polímeros**. Editora: e-papers, Rio de Janeiro, 2001.
- LUZIER, W.D. Materials derived from biomass / biodegradable materials. In: **Industry Ecology**, at the National Academy of Sciences, 1991, Washington, DC, v. 89, p. 839-842, 1991.
- MACRAE, R. M., WILKINSON, J. F., “The influence of cultural conditions on poly- β -hydroxybutyrate synthesis in *Bacillus megaterium*”, **Proceedings of the Royal Physiology Society of Edinburgh**, v. 27, p. 73-78, 1958.
- MADDEN, L.A.; ANDERSON, A.J.; ASRAR, J. Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Polymer Mixtures Produced in High-Density Fed-Batch Cultures of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*). **Macromolecules**, v. 31, n. 17, p. 5660-5667, 1998.
- MADDEN, L.A.; ANDERSON, A.J.; ASRAR, J.; BERGER, P.; GARRETT, P. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxyvalerate) synthesized by *Ralstonia eutropha* in fed-batch cultures. **Polymer**, v. 41, p. 3499-3505, 2000.
- 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, A., de ARAGÃO, G.M.F. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. **Process. Biochem.** v. 38, p. 137–141, 2002.

McKELLAR, R.C; LU, X. **Modeling Microbial Responses in Food**. Ed. CRC Press, 343p., 2004.

MEGAERT, J.; WEBB, A.; ANDERSON, C.; WOUTERS, A.; SWINGS, J. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poli(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 3233-3238, 1993.

METABOLIX, I. Apresenta informações sobre a companhia, seus produtos e pesquisas. Disponível em: <<http://www.metabolix.com>>, acessado em 11/10/08. MILLER, G. L. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MORI, H.; YAMANE, T.; KOBAYASHI, T.; SHIMIZU, S. Comparison of cell productivities among fed-batch, repeated fed-batch and continuous culture at high cell concentration. **Journal Ferment. Technol.**, v. 61, p. 391-401, 1983.

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.

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.

OLIVEIRA, R.P. **Produção de Poli-3-hidroxibutirato (P(3HB)) por *Ralstonia eutropha* em substrato de baixo custo: estudo de diferentes estratégias de limitação de crescimento**. Florianópolis, 1999. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina.

OSTLE, G. A., HOLT, G. J. Nile Blue A as a fluorescent stain for poly-

- β -hydroxybutyrate, *Applied Environmental Microbiology*, v. 44, p. 238-241, 1982.
- PAGE, W.J.; CORNISH, H.A. Growth of *Acetobacter vinelandii* UWC in fish peptone medium and simplified extraction of poly- β -hydroxybutyrate. *Applied Environmental Microbiology*, v. 59, p. 4236-4244, 1993.
- PAGE, W.; KNOSP, O. Hyperproduction of poly- β -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55, n. 6, p. 1334-1339, 1989.
- PIRT, S.J. *Microbe and cell cultivation*. Londres. Willian Clowes & Sons, 217 p.,1975.
- PLASTIVIDA, 1995, <<http://www.plastivida.org.br>>, acessado em 15/12/08
- POIRIER, Y.; DENNIS, D. E.; KLOMPARENS, K.; SOMEVILLE, C. Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. *Science*, v. 256, p. 520-523, 1992.
- POIRIER, Y., NAWRATH, CHRISTIANE, SOMERVILLE, CHRIS. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastic and elastomers, in bacteria and plants. *Bio/Technology*, v. 13, p. 142-150, 1995.
- PREUSTING, H.; KINGMA, J.; WITHOLT, B. Physiology and polyester formation of *Pseudomonas oleovorans* in continuous two-liquid-phase cultures. *Enzyme Microbiol. Technol.*, v. 14, p. 770-780, 1991
- RAMSAY, B.A.; LOMALIZA,K.; CHAVARIE,C.; DUBÉ,B.; RAMSAY, J.A. Production of poly(β -hydroxybutyric-*co*- β -hydroxyvaleric) acids. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, n. 7, p. 2093-2098, 1990.
- RAMSAY, B. A.; SARACOVAN, I.; RAMSAY, J. A.; MARCHESSAULT, R. H. Continuous production of long-side-chain poly-3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas oleovorans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 58(2), p. 744-746, 1991.

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

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

REPASKE, R.; REPASKE, A.C. Quantitative requirements for exponential growth of *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 32, n. 4, p. 585-591, 1976.

REPASKE, R.; MAYER, R. Dense autotrophic cultures of *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 32, n. 4, p. 592-597, 1976.

RHEE, Y.H.; JANG, J.H.; ROGERS, P.L. Production of copolymer consisting by 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by fed-batch culture of *Alcaligenes sp.* *Biotechnology Letters*, v. 15, p. 377-382, 1993.

RIIS, V., MAI, W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. *Journal of Chromatography*, v. 445, p. 285-289, 1988.

RITCHIE, G.A.F.; SENIOR, P.J.; DAWES, E.A. The purification and characterization of acetoacetyl-coenzyme A reductase from *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. Journal*, v. 121, p. 309-316, 1971.

RODRIGUES, M. F. A.; VICENTE, E. J. STEINBÜCHEL, A. Studies on polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation in a PHA synthase I-negative mutant of *Burkholderia cepacia* generated by homogenotization. *FEMS Microbiology Letters*, v. 193, p. 179-185, 2000.

ROELS, J.A. Energetics and kinetics in biotechnology. *Elsevier Science Publishers*. 1983.

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.

RYU, H.W.; HAHN, S.K.; CHANG, Y.K.; CHANG, H.N. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 55, p. 28-32, 1997.

SAITO, T.; NAKAMURA, S.; HIRAMITSU, M.; DOI, Y. Microbial synthesis and properties of poli-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate. *Polym. Int.*, v. 39, p. 169-174, 1996.

SANTOS, Y.S. Pesquisa é insumo da indústria. **Notícia FIESP/CIESP**, 01/4/2002. Disponível em: <<http://www.ipt.br/imprensa/midia/?ID=260>>, acessado em 05/12/2009.

SARTORI, D. M. **Obtenção de um mutante de *Alcaligenes eutrophus* melhorado geneticamente para a produção do co-polímero polihidroxibutirato-polihidroxivalerato (PHB-PHV)**. 1998. 78p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SAVENKOVA, L.; GERBERGA, I.; BIBERS, I.; KALMIN, 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.

SCHLEGEL, H.G.; GOTTSCHALK, G.; VON BARTHA, R. Formation and utilization of poly- β -hydroxybutyric acid by *Knallgas bacteria* (*Hydrogenomonas*). *Nature*, v. 191, p. 463-465, 1961.

SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em bioreatores. In: *Biotecnologia Industrial Vol II: Engenharia Bioquímica*. (Schmidell W., Lima U.A., Aquirone E., Borzani W., eds.), São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., p. 277-331, 2001.

SCANDOLA, M.; CECCORULLI, G.; PIZZOLI, M.; GAZZANO, M. Study of the crystal phase and crystallization rate of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxyvalerate). *Macromolecules*, v. 25, 1405-1410, 1992.

SCHLEGEL, H.G.; VOLLBRECHT, D. Formation of the dehydrogenases for lactate, ethanol and butanediol in the strictly aerobic bacterium *Alcaligenes eutrophus*. *Journal Gen. Microbiology*, v. 117, p. 475-481, 1980.

SCHUBERT, A.; STEINBÜCHEL, A. Molecular analysis of the *Alcaligenes eutrophus* poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic operon: Identification of the N terminus of poly(3-hydroxybutyrate) synthase and identification of the promoter. *Journal of Bacteriology*, v. 173, p. 168-175, 1991.

SENIOR, P.J; DAWES, E.A. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. Journal.*, v. 125, p. 55-66, 1971.

SENIOR, P.J; DAWES, E.A. The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azobacter Beijerinckii*. *Biochem. Journal.*, v. 134, p. 225-238, 1973.

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.

SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C.; ROCHA, R.C.S.; TACIRO, M.K.; PRADELLA, J.G.C. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. *Química Nova.* v. 30, n. 7, p. 1732-1743, 2007.

SIM, S. J.; SNELL, K. D.; HOGAN, S. A.; STUBBE, J.; RHA, C.; SINSKEY, A. J. PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo. *Nature Biotechnology*, v. 15, p. 63-67, 1997. 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-hidroxiobutirato-co-3-hidroxi valerato) por *Ralstonia eutropha*.** Florianópolis, 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade

Federal de Santa Catarina.

STEINBÜCHEL, A.; polyhydroxybutyrate acid. In: BYROM, D. ***Biomaterials: Novel Materials from Biological Source***. V. New York. Stockton, p. 132-213, 1991a.

STEINBÜCHEL, A., SCHLEGEL, H.G. Physiology and molecular genetics of poly(β -hydroxyalkanoic acids) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. ***Molec. Microbiol.***, v.5, p. 535-542, 1991b.

STEINBÜCHEL, A.; PIEPER, U. Production of a copolyesters of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon source by a mutant of *A. eutrophus*. ***Applied Microbiology Biotechnology***, v. 37, p. 1-6, 1992.

STEINBÜCHEL, A., VALENTIN, H., Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids, ***FEMS Microbiology Letters***, v. 128, p. 219-228, 1995.

STEINBÜCHEL, A. "P(3HB) and other polyhydroxyalkanoic acids". In: ***Products of primary metabolism***, v. 6, ***Biotechnology***, VCH, p. 403-464, 1996.

STEINBÜCHEL, A., FÜCHTENBUSCH, B. Bacterial and other biological systems for polyester production, ***Trends in Biotechnology***, v. 16, pp. 419-427, 1998.

STEINBÜCHEL, A. Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. ***Macromol. Biosci.***, v. 1, p. 1-24.

STICKLAND, L. H. The determination of small quantities of bacteria by means of the Biuret reaction. ***J. Gen. Microbiol.***, v. 5, p. 689-703, 1951.

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

SURIYAMONGKOL, P. *et al.*, "Biotechnological approaches for the

production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants — A review”, *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 148-175, 2007.

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.

SUZUKI, T.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Kinetics and effects of nitrogen source feeding on production of poly- β -hydroxybutyric acid by fed-batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 23, p. 322-329, 1986a.

SUZUKI, T.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Mass production of poly- β -hydroxybutyric acid by fed-batch culture with controlled carbon/nitrogen feeding. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 24, p. 370-374, 1986b.

TAVARES, V. B., SIVIERI, KÁTIA, CERON, CARLOS ROBERTO et al. Utilization of residual liquid orange from juice processing as cultivation medium of *Penicillium citrinum*: biological depuration of the residue and enzyme production. *Química Nova*. 21 n^o6 (ISSN 0100-4042): 722-725, 1998.

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.

TORRES, B.B.; MARZZOCO, A. Bioquímica Básica, Ed. Guanabara, 1990.

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*, v. 60, n. 13, p. 2367-2375, 1996.

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.

VIVEIROS, M. Bagaço vira plástico biodegradável. **Folha de São Paulo** 11/6/03. Caderno Ambiente. p. A15

VOLOVA, T. G. **Polyhydroxyalkanoates – Plastic Material of the 21st Century: Production, Properties and Application**, 1. ed. New York: Nova Publishers, 2004, 282 p.

YAMANE, T. Yield of poly-(D)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 41, p. 165-170, 1993.

YAMANE, T.; FUKUNAGE, M.; LEE, Y.W. Increased PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB producer. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, p. 197-202, 1996.

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

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. Fermet. and Bioeng.** v. 83, p. 492-495, 1997.

ZHANG, H.; BIAS, V.O.; GONYER, K.; DENNIS, D. Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strain. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 1198-1205, 1994.

WALLEN, L.L; ROHWEDDER, W.K., Poly- β -hydroxyalkanoate from activated sludge, **Environmental Science & technology**, v. 8, p. 576-579, 1974.

WANG, F.; LEE, S. Y. Poly(3-hydroxybutyrate) production with high polymer content by fedbatch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63(9), p. 3703-3706, 1997.

WEINER, R. M. Biopolymer from marine prokaryotes. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 390-394, 1997.

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

ANEXOS

Anexo A**Tabela A. 1** - Caracterização do melão cítrico utilizado como substrato para os cultivos

Composto	Quantidade
Brix Corr., g/100g	22,67
Acidez (pH 8,2), g/100g	0,20
Ratio	113,35
Análises com brix corrigido para 11.2° Brix	
Sólidos solúveis totais, g/L	117,1
Glicose, g/L	29,9
Frutose, g/L	21,0
Sacarose, g/L	22,5
Açúcares totais, g/L	73,4
Extrato livre red., g/L	43,7
Glicose/Frutose=Ratio	1,42
óleo, %v/v	0,0099
Polpa, %	14,6
pH	5,39
Ácido cítrico, g/L	0,0
ácido isocítrico, mg/L	0
ácido málico, g/L	0,0
Formol , 100 mL	23,8
Prolina, mg/L	1844
Cinzas, g/L	7,5
Potássio, mg/L	2030
Sódio, mg/L	47,2
Fosfato, mg/L	484
Ferro, mg/L	6,9
Cálcio, mg/L	760
Hesperidina, mg/L	5216
Pectina solu. Em água, mg/L	374
Pectina oxal. sol., mg/L	709
Pectina alcal. sol., mg/L	64
Pectina total, mg/L	1147

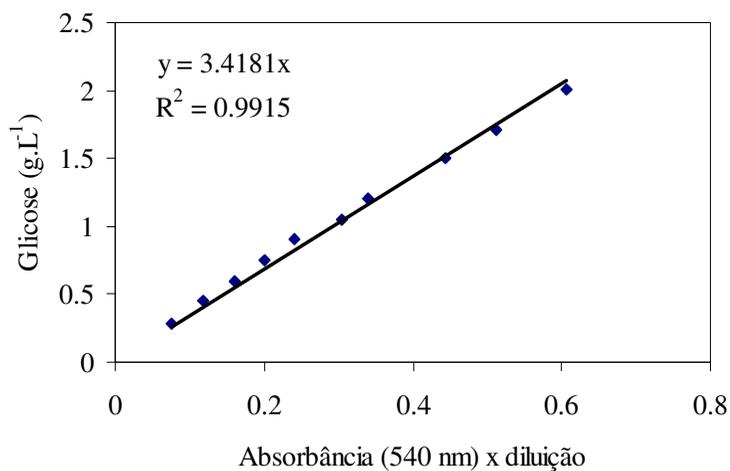


Figura A. 1 - Curva de calibração para determinação da concentração de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS)

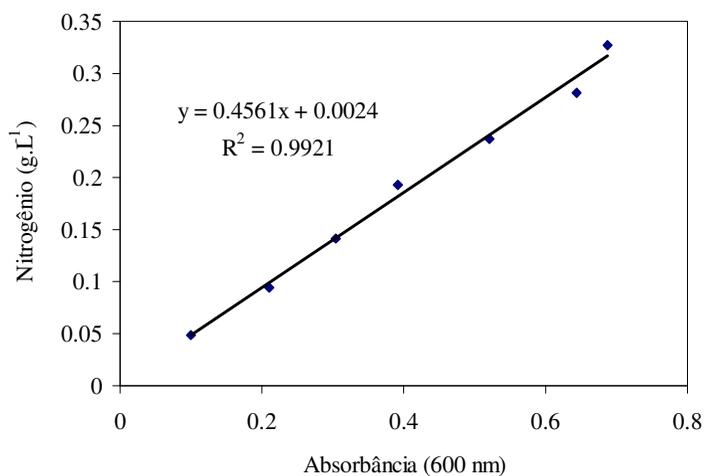


Figura A. 2 - Curva padrão para determinação da concentração de nitrogênio por kit enzimático-colorimétrico

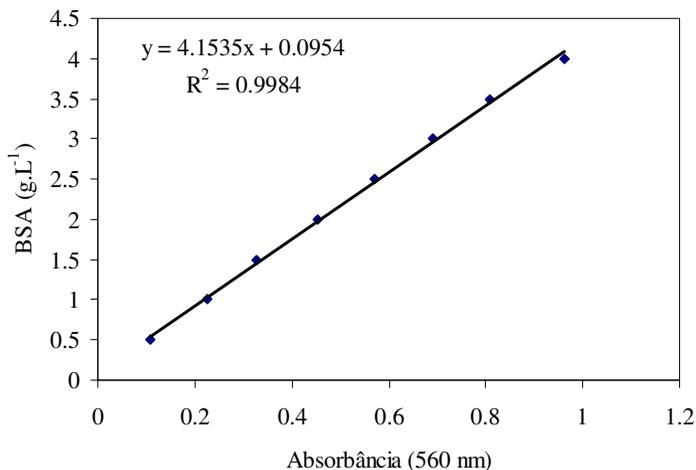


Figura A. 3 - Curva padrão para determinação da concentração de proteínas pelo método de Biureto

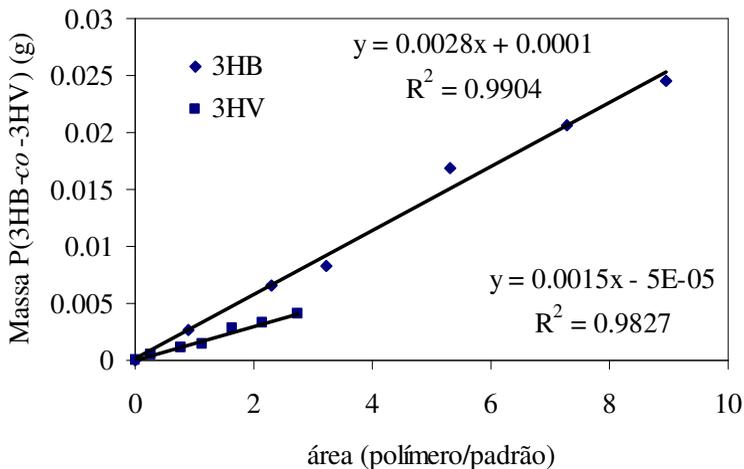


Figura A. 4 - Curva padrão para a determinação da concentração de P(3HB-co-3HV)

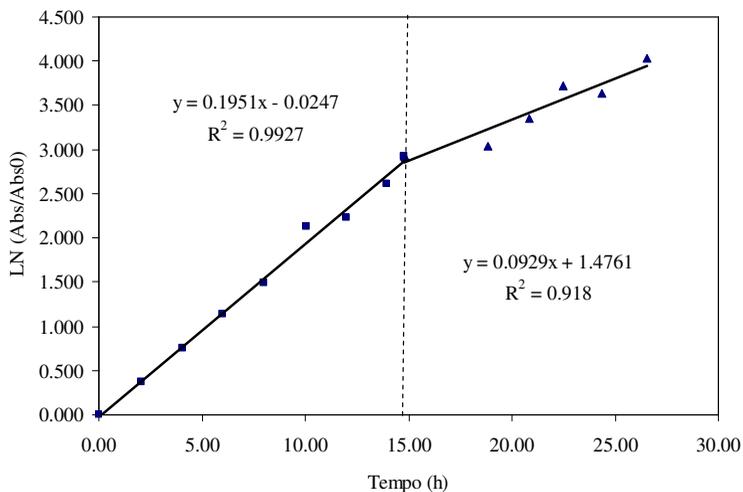


Figura A. 5 - Acompanhamento do crescimento de *C. necator* durante o cultivo em meio sintético (cultura B) para produção de P(3HB-co-3HV). A linha pontilhada indica o final da fase de crescimento e início da fase de produção

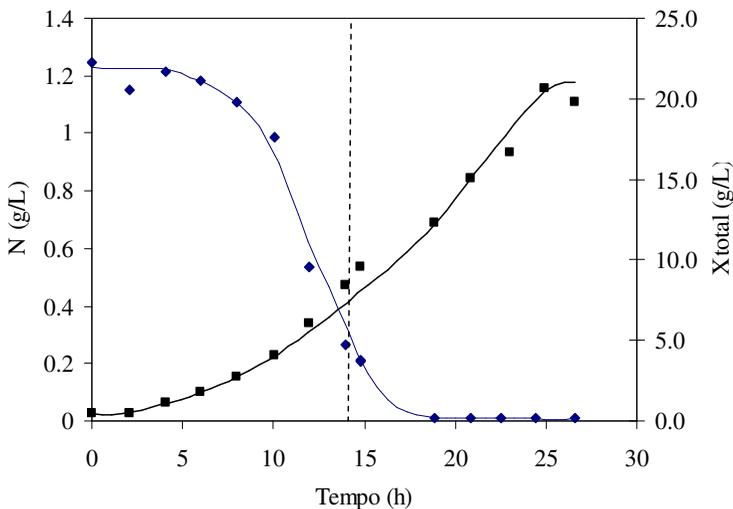


Figura A. 6 - Evolução da biomassa total e da concentração de nitrogênio em função do tempo para a cultura conduzida em meio sintético (glicose – cultura B) para produção do copolímero P(3HB-co-3HV)

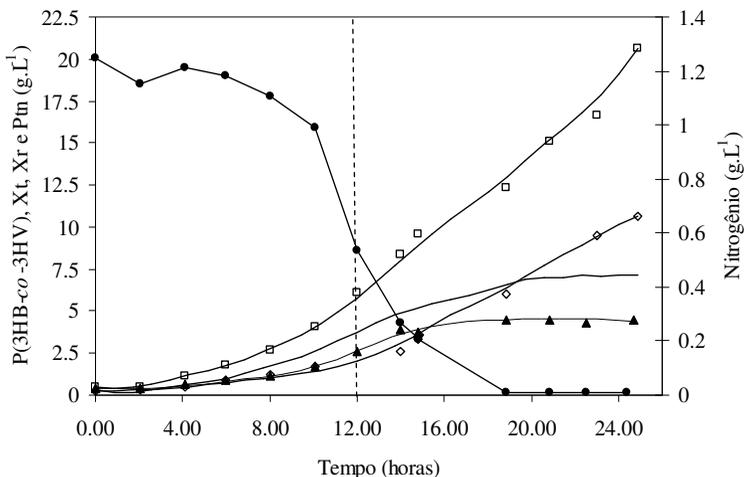


Figura A. 7 - Evolução das concentrações de biomassa total (X_{total} ; \square) e residual (X_r ; $\square\square$), proteína (P_{tn} ; \blacktriangle), nitrogênio (\bullet) e produção do copolímero ($P(3HB-co-3HV)$; \diamond) para o cultivo realizado em glicose (cultura B). Os pontos representam os dados experimentais e as linhas o ajuste pelo *software Lissage*.

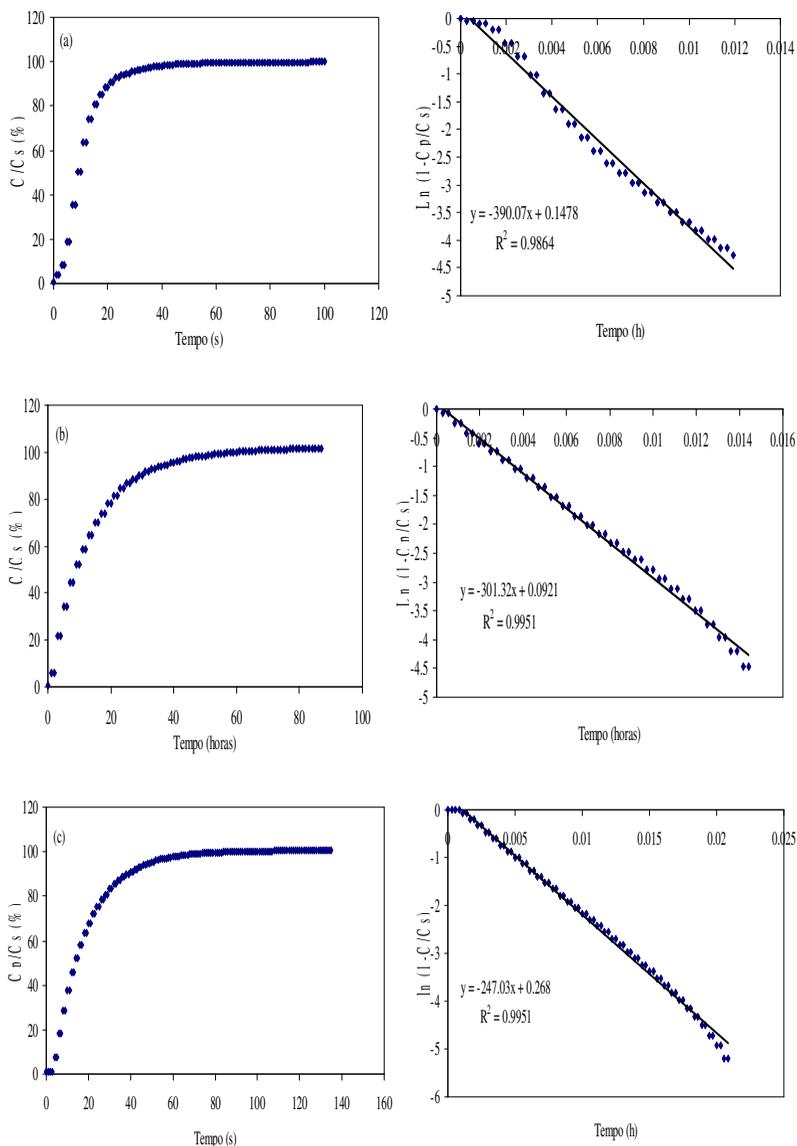


Figura A. 8 - Teste degrau, para resposta do eletrodo em função do tempo e determinação do tempo de resposta para: 2^o uso (a), 3^o uso (b) e 4^o uso da membrana (c)

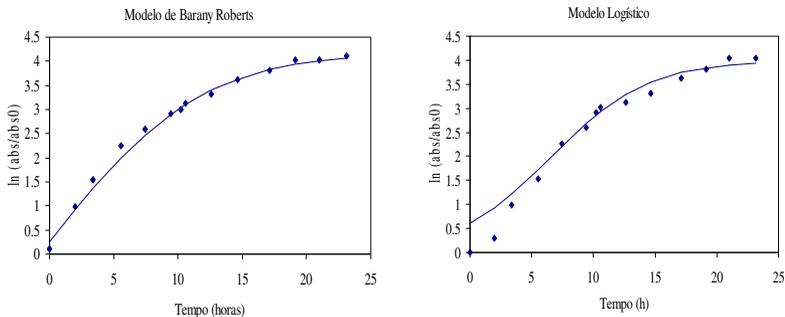


Figura A. 9 - Aplicação dos modelos primários às curvas do cultivo de *C. necator* utilizando melão cítrico como fonte de carbono com carência em nitrogênio na fase de produção

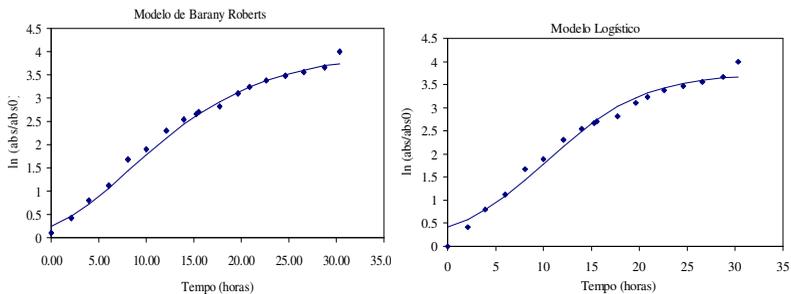


Figura A. 10 - Aplicação dos modelos primários às curvas do cultivo de *Cupriavidus necator* utilizando glicose como fonte de carbono na produção do copolímero P(3HB-co-3HV)

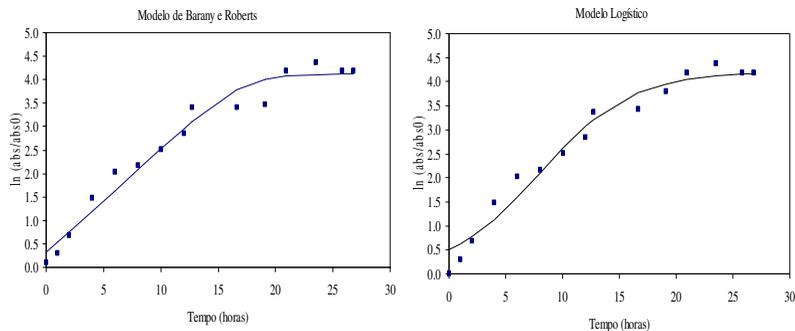


Figura A. 11 - Aplicação dos modelos primários às curvas do cultivo de *C. necator* utilizando melação cítrica como fonte de carbono com alimentação em nitrogênio na fase de produção

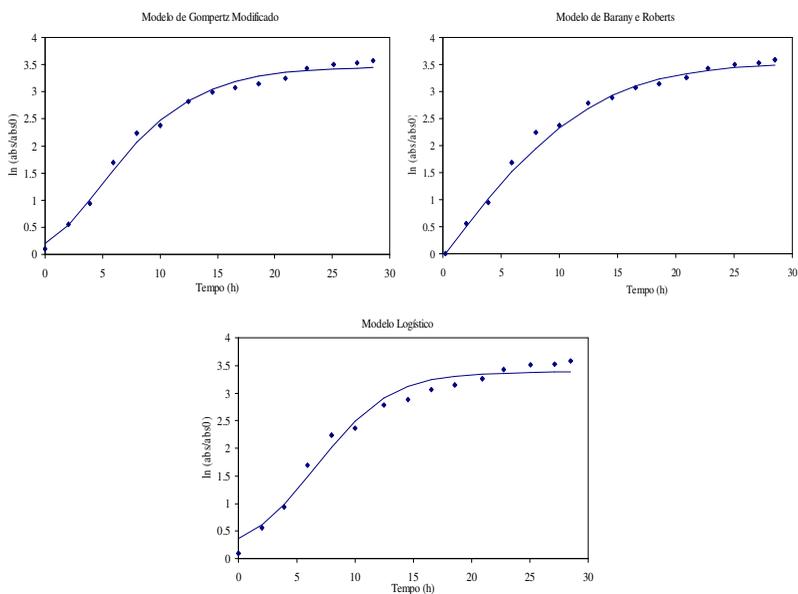


Figura A. 12 - Aplicação dos modelos primários às curvas do cultivo de *C. necator* utilizando melação cítrica pasteurizada como fonte de carbono na produção do copolímero

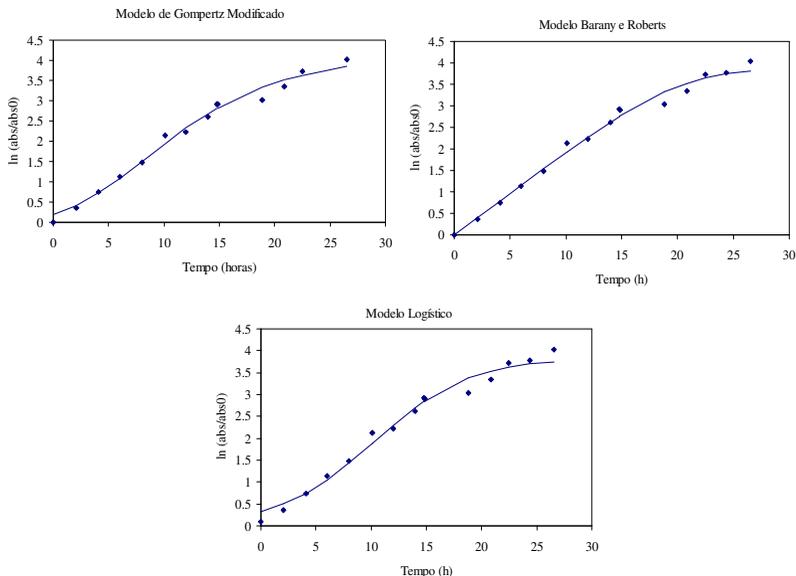


Figura A. 13 - Aplicação dos modelos primários às curvas do cultivo de *Cupriavidus necator* utilizando glicose (cultura B) como fonte de carbono para a produção do copolímero

Tabela A. 2 - Valores dos índices estatísticos para os modelos de Gompertz, Gompertz Modificado, Logístico e Barany Roberts para os cultivos realizados em melão cítrico pasteurizado e glicose (cultura B) na produção de P(3HB-co-3HV) por *Cupriavidus necator*

Índices	Modelos matemáticos					
	Glicose			Melão cítrico		
	GM ^c	LO ^d	BR ^e	GM ^c	LO ^d	BR ^e
MSE ^a	0,0158	0,0276	0,0179	0,0004	0,0004	0,0010
Fator bias	0,9550	0,9145	0,9939	0,9538	0,9567	0,9152
F.exatidão	1,0953	1,1544	1,0562	1,0906	1,0872	1,1521
R ² ^b	0,9957	0,9873	0,9954	0,9968	0,9976	0,9859

^aMSE: erro médio quadrático; ^bR²: coeficiente de correlação; ^cGP: Gompertz; ^dGM: Gompertz Modificado; ^eLO: Logístico; ^fBR: Barany e Roberts

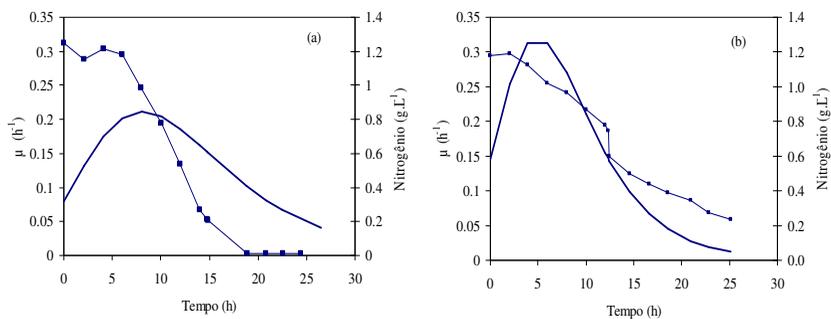


Figura A. 14 - Acompanhamento do μ em função do tempo (—) e consumo de nitrogênio em função do tempo (■) nos cultivos utilizando como fonte de carbono: glicose (cultura B) (a) e melação cítrica pasteurizada (b) na produção do copolímero P(3HB-*co*-3HV)

Anexo B

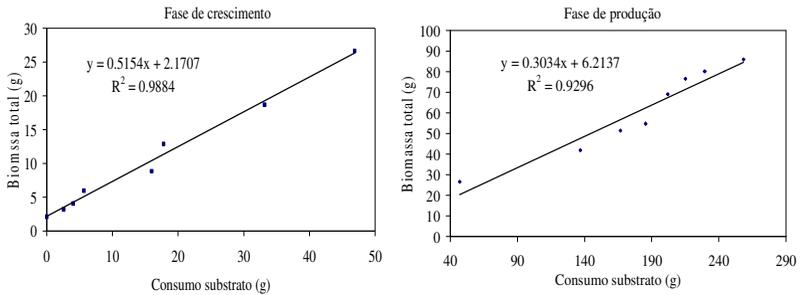


Figura B. 1 - Curvas que representam os fatores de conversão de substrato em biomassa para cultura A realizada com glicose para produção

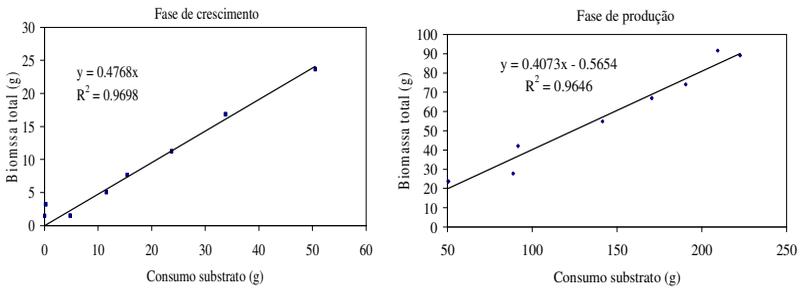


Figura B. 2 - Curvas que representam os fatores de conversão de substrato em biomassa para cultura B realizada com glicose para produção de P(3HB-co-3HV)

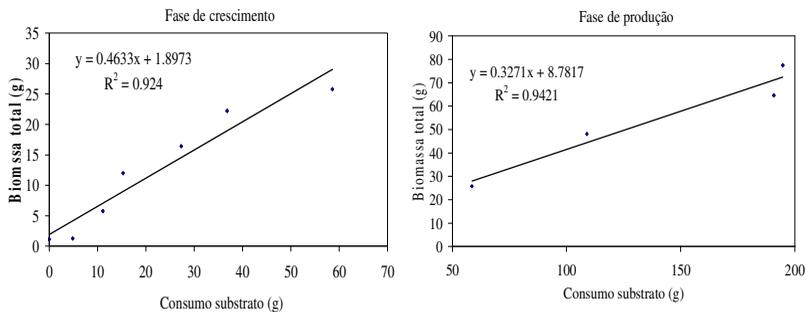


Figura B. 3 - Curvas que representam os fatores de conversão de substrato em biomassa para cultura realizada com melão com carência de nitrogênio na fase de produção

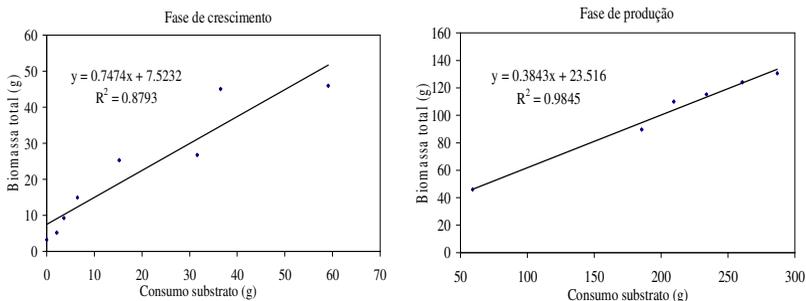


Figura B. 4 - Curvas que representam os fatores de conversão de substrato em biomassa para cultura realizada com melão com alimentação de nitrogênio na fase de produção

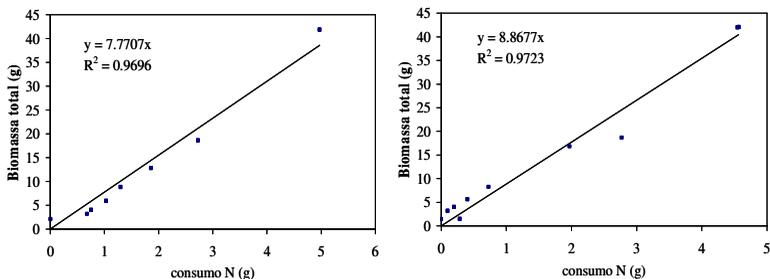


Figura B. 5 - Fator de conversão de nitrogênio em biomassa total para cultura A (a) e cultura B (b) realizada com glicose para produção

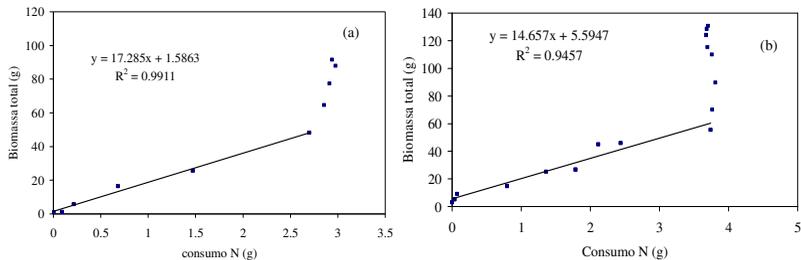


Figura B. 6 - Curvas que representam os fatores de conversão de nitrogênio em biomassa para cultura realizada com melação com carência de nitrogênio na fase de produção

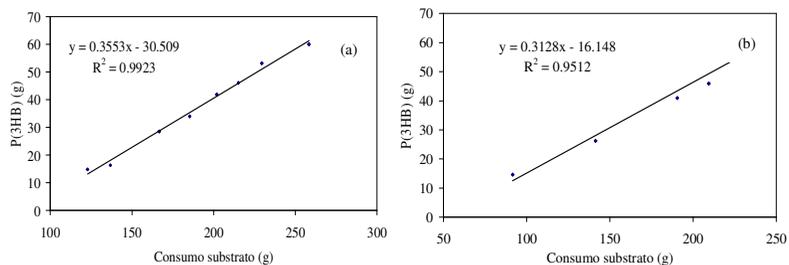


Figura B. 7 - Fator de conversão de substrato em P(3HB) para cultura A (a) e cultura B (b) realizada com glicose para produção

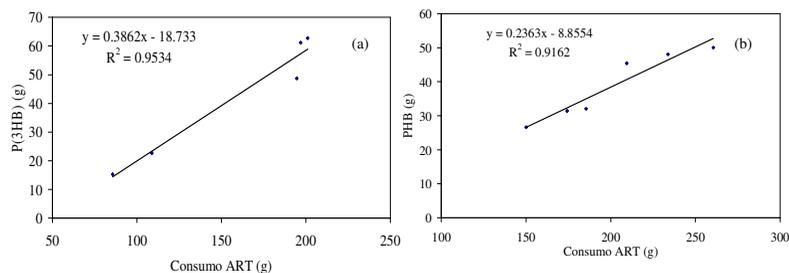


Figura B. 8 - Curvas que representam os fatores de conversão de substrato em P(3HB) para cultura realizada com melação com carência (a) e alimentação de nitrogênio (b) durante a fase de produção

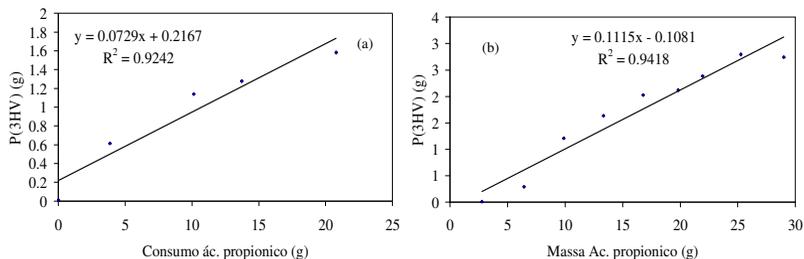


Figura B. 9 - Curvas que representam os fatores de conversão de ácido propiônico em P(3HV) para cultura A (a) e cultura B (b) realizadas em glicose na fase de produção

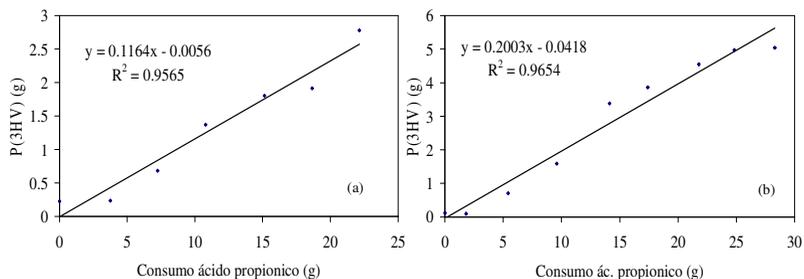


Figura B. 10 - Curvas que representam os fatores de conversão de ácido propiônico em P(3HV) para cultura realizada com melão com carência (a) e alimentação de nitrogênio (b) durante a fase de produção

Anexo C

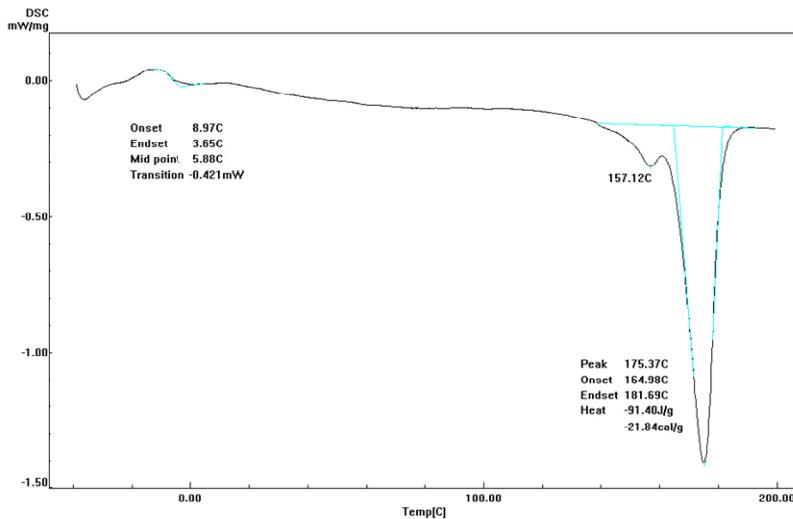


Figura C. 1 - Curva obtida pela análise de DSC para a amostra padrão P(3HB) Industrial

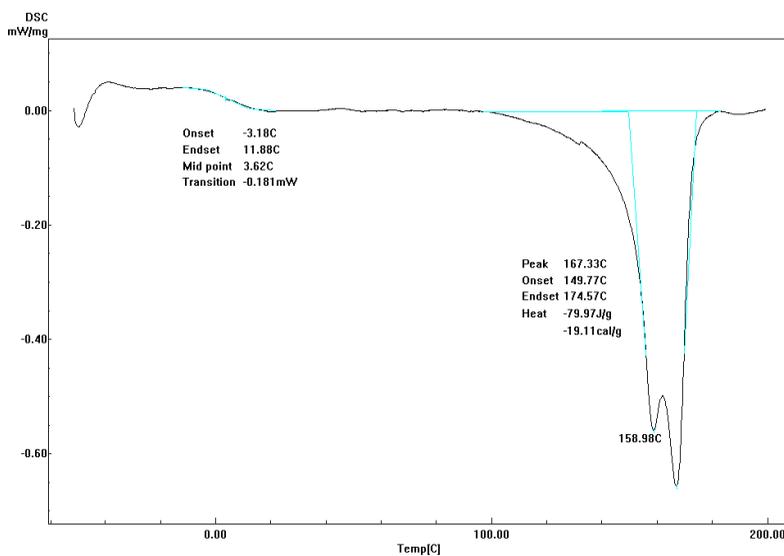


Figura C. 2 - Curva obtida pela análise de DSC para o filme de P(3HB-co-3HV) produzido a partir de melação cítrica com fonte de substrato

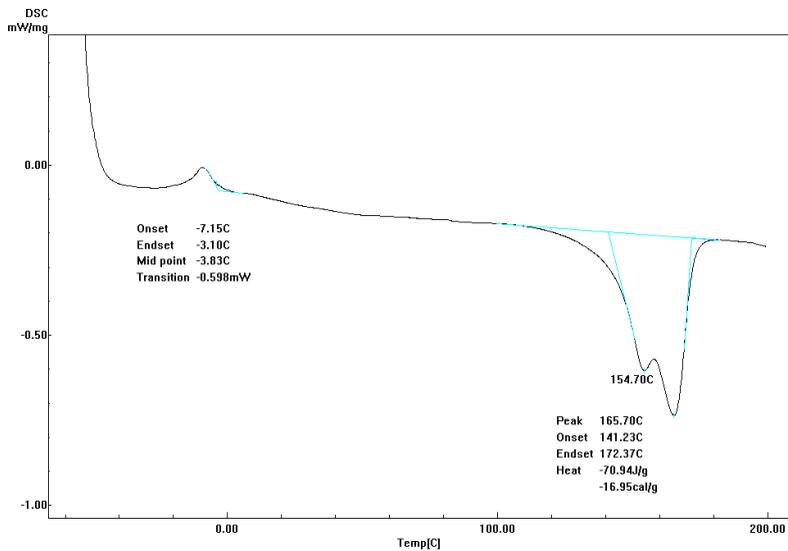


Figura C. 3 - Curva obtida pela análise de DSC para o filme de P(3HB-co-3HV) produzido a partir de glicose com fonte de substrato

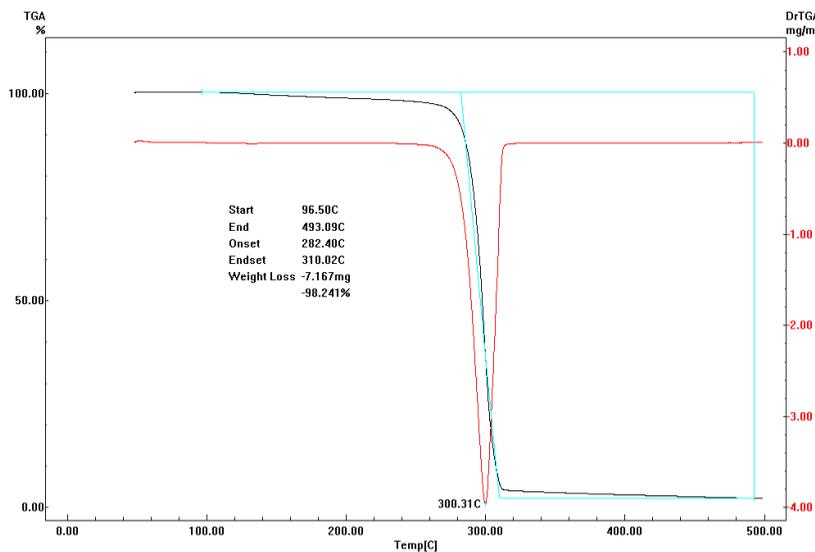


Figura C. 4 - Curva obtida para análise de TGA para a amostra padrão P(3HB) Industrial

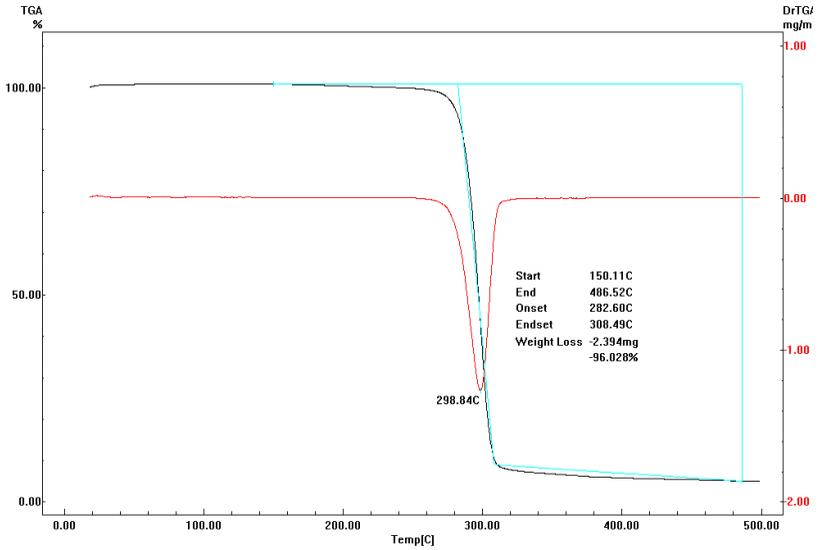


Figura C. 5 - Curva obtida para análise de TGA para o filme de P(3HB-co-3HV) produzido a partir de melão como fonte de substrato

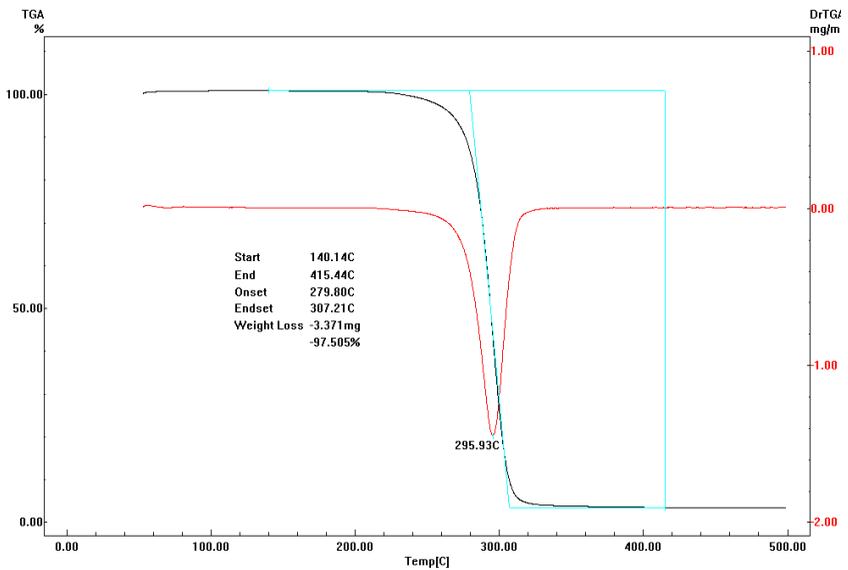


Figura C. 6 - Curva obtida para análise de TGA para o filme de P(3HB-co-3HV) produzido a partir de glicose como fonte de substrato