

MÔNICA LADY FIORESE

**ESTRATÉGIAS DE CULTIVO E RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
DE POLI (3-HIDROXIBUTIRATO) PRODUZIDO POR *RALSTONIA*
*EUTROPHA***

FLORIANÓPOLIS – SC

2008

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

ESTRATÉGIAS DE CULTIVO E RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
DE POLI (3-HIDROXIBUTIRATO) PRODUZIDO POR *RALSTONIA*
EUTROPHA

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação
em Engenharia Química e Engenharia de
Alimentos da Universidade Federal de Santa
Catarina.

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

Co-orientador: Prof. Dr. Willibaldo Schmidell

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Maria Ascensão M. Reis

MÔNICA LADY FIORESE

Msc. Engenheira Alimentos

Florianópolis, 2008.

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis, SC - Brasil e no laboratório de Engenharia Bioquímica e Processos do Departamento de Química, CQFB/Requimte da Faculdade Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa – Portugal.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar registado o meu mais sincero agradecimento a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, nomeadamente:

À minha orientadora, que muito admiro, Doutora Gláucia M. F. de Aragão, por todo o seu infinito apoio, ensinamentos, otimismo e pela muita paciência que sempre teve.

Ao meu Co-Orientador Doutor Willibaldo Schmidell, muito obrigada pela partilha de conhecimentos essenciais na execução deste trabalho e por todo o apoio.

A Doutora Maria Ascensão M. Reis, por ter acreditado no meu trabalho e ter me acolido em Portugal em vossa Universidade, por ter disponibilizado todos os recursos necessários para a realização fundamental de parte deste estudo, obrigada também pelos ensinamentos repassados sem eles nunca teria conseguido chegar onde cheguei.

A Doutora Ana Maria Ramos, pela atenção, disposição e ajuda essencial para finalizar meus estudos, obrigada pelas explicações, pela força e pelos conhecimentos repassados.

À Jaciane Ienczak, Beatriz Intrelandi, Franciny Schmidt, Francieli Dalcanton pela amizade, apoio, ensinamentos, paciência e por estarem sempre presente quando precisei.

A minha grande amiga Beatriz Salomão, pela força, pelas intermináveis risadas, pelos momentos de descontração, pela ajuda incondicional, obrigada por você existir, sua alegria estimula-nos a continuar nosso caminho com fé e alegria.

A todos os que ainda estão ou que passaram pelo ENGEBIO. Obrigada por todo o apoio, amizade. Pelas muitas risadas!

A todo o pessoal do Laboratório de Bioquímica e Processos da Universidade Nova de Lisboa, pelo constante apoio, ajuda e amizade, Carla Portugal, obrigada pela televisão.

À Joana Pais e a Filomena Freitas que me apoiaram tanto nos momentos mais difíceis dando excelentes “dicas” sobre como deveria realizar meus experimentos, repassando seus conhecimentos e aprendizados, Joanita obrigada pelo carinho, pela atenção, pelo companherismo, por me acolher, sem você em Portugal minha vida não teria sido tão fácil como foi.

Aos meus amigos “pós-laboratório”, pela paciência interminável, pelo apoio constante, pelas longas conversas, pelos momentos de descontração pela amizade sincera.

À CAPES pela bolsa concedida para o estágio no exterior, e a empresa Citrosuco Paulista pela bolsa durante parte do meu doutorado.

À minha família e ao meu namorado Adriano, por todo o seu incessante apoio e paciência que sempre tiveram comigo, principalmente nos momentos mais difíceis, momentos de desespero, de ausência, de desanimo, vocês me fizeram não desistir, porque acreditaram na minha capacidade de vencer.

*De tudo ficam três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto, devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...*

Pedras no caminho? Guardo-as todas, um dia vou construir um castelo...

Porque tenho em mim todos os sonhos do mundo...

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

<u>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO</u>	<u>1</u>
<u>CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</u>	<u>5</u>
2.1 IMPACTOS AMBIENTAIS OCASIONADOS POR EMBALAGENS PLÁSTICAS.....	6
2.2 POLIHIDROXIALCANOATOS	11
2.2.1 DESCRIÇÃO DOS POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAS)	11
2.2.2 CARACTERÍSTICAS DOS PHAS	14
2.2.3 HISTÓRICO DOS PHAS.....	16
2.2.4 POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) P(3HB)	17
2.3 ORGANISMOS PRODUTORES DE PHAS.....	18
2.4 <i>RALSTONIA EUTROPHA</i> (ATUALMENTE <i>CUPRIAVIDUS NECATOR</i>)	20
2.5 METABOLISMO EM <i>RALSTONIA EUTROPHA</i> - SÍNTESE DO P(3HB).....	22
2.6 BIODEGRADAÇÃO	23
2.7 CUSTO COM FONTE DE CARBONO.....	26
2.8 CULTURAS EM ALTA DENSIDADE.....	27
2.9 UTILIZAÇÃO DA MODELAGEM MATEMÁTICA COMO FERRAMENTA NO ESTUDO DO CRESCIMENTO DE P(3HB).....	28
2.10 TÉCNICAS EMPREGADAS NA EXTRAÇÃO, RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE P(3HB).....	30
2.10.1 EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO.....	30
2.10.2 CARACTERIZAÇÃO DE P(3HB).....	36
2.11 APLICAÇÕES DOS PHAS	42
2.12 APLICAÇÕES ESPECÍFICAS DO P(3HB).....	44
<u>CAPÍTULO III- MATERIAL E MÉTODOS.....</u>	<u>47</u>
<u>3 - MATERIAL E MÉTODOS –UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA.....</u>	<u>48</u>
3.1 MICRORGANISMO.....	48
3.2 MEIOS DE CULTURA.....	48
3.3 CONDIÇÕES DE CULTURA.....	50
3.3.1 PRÉ-CULTURAS	50
3.3.2 CULTURA EM BIORREATOR.....	50
3.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	51

3.4.1	AMOSTRAGEM.....	51
3.4.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA.....	52
3.4.3	DOSAGEM DE AÇÚCARES	52
3.4.4	DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO	53
3.4.5	DOSAGEM DE PROTEÍNAS	54
3.4.6	DOSAGEM DE P(3HB)	55
3.4.7	MEDIDA DO OXIGÊNIO DISSOLVIDO NO MEIO	56
3.4.8	PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DO ELETRODO DE OXIGÊNIO	56
3.4.9	PROCEDIMENTO DE CALIBRAÇÃO DO ELETRODO DE OXIGÊNIO	56
3.5	RESPIROMETRIA.....	56
3.5.1	VELOCIDADE ESPECÍFICA DE RESPIRAÇÃO	57
3.5.2	TRANSFERÊNCIA E CONSUMO DE OXIGÊNIO DURANTE O CULTIVO: DETERMINAÇÃO DO K_{LA} E QO_2	57
3.6	TRATAMENTO DE DADOS.....	60
3.6.1	AJUSTE DOS DADOS EXPERIMENTAIS	60
3.6.2	ANÁLISE CINÉTICA	60
3.6.3	FATORES DE CONVERSÃO	61
3.6.4	PRODUTIVIDADE	63
3.7	MODELAGEM DO CRESCIMENTO MICROBIANO.....	65
3.7.1	MODELOS PRIMÁRIOS	65
3.7.2	MODELOS SECUNDÁRIOS – APLICADO AO MELHOR MODELO PRIMÁRIO, SELECIONADO SEGUNDO O ITEM 1.61	66
3.7.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	67
	<u>MATERIAL E MÉTODOS - UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA</u>	<u>68</u>
3.8	MICROORGANISMO.....	68
3.9	CONDIÇÕES DE CULTURA.....	69
3.10	AMOSTRAGEM	71
3.11	QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO	72
3.12	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO	72
3.13	DOSAGEM DE AÇÚCARES REDUTORES.....	73
3.14	QUANTIFICAÇÃO DO P(3HB) ACUMULADO INTRACELULAR	73
3.15	DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR MÉDIO (GPC).....	75
3.16	DETERMINAÇÃO DA CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (DSC).....	77
3.16.1	DESCRIÇÃO DO MÉTODO	77
3.16.2	DESCRIÇÃO DO APARELHO.....	77

3.16.3	DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS DE DSC.....	77
<u>CAPÍTULO IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>		79
4	<u>- MODELAGEM MATEMÁTICA.....</u>	80
4.1	MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE RALSTONIA EUTROPHA EM DIFERENTES TEMPERATURAS	81
4.2	UTILIZAÇÃO DOS MODELOS PRIMÁRIOS PARA DESCREVER O COMPORTAMENTO DE R. EUTROPHA NAS DIFERENTES TEMPERATURAS DE CULTIVO ANALISADAS.....	81
4.2.1	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
4.3	INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE OS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO: $\mu_{MÁX}$, Λ E A	85
4.3.1	UTILIZAÇÃO DOS MODELOS SECUNDÁRIOS PARA PREVER A INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE OS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE RALSTONIA EUTROPHA	85
4.3.2	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89
5	<u>- ANÁLISE DO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO P(3HB) POR RALSTONIA EUTROPHA A DIFERENTES TEMPERATURAS</u>	90
5.1	ANÁLISE DO CRESCIMENTO DE RALSTONIA EUTROPHA A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	90
5.1.1	CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
5.2	PRODUÇÃO DE P(3HB) EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE CULTIVO.....	98
5.3	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE P(3HB) EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	100
6	<u>- UTILIZAÇÃO DA ANÁLISE RESPIROMÉTRICA NO ACOMPANHAMENTO DE CULTURAS PARA A PRODUÇÃO DE P(3HB).</u>	104
6.1	DETERMINAÇÃO DO K_{LA} E QO_2 DURANTE O CULTIVO	104
6.2	ENSAIOS PRELIMINARES PARA A DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES PARA DETERMINAÇÃO DE QO_2	106
6.3	ESTUDO DE QO_2 COMO INDICATIVO DE LIMITAÇÃO NO MEIO A DIFERENTES TEMPERATURAS	109
<u>ESTÁGIO PDEE - PORTUGAL</u>		114
7	<u>- CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE P(3HB) POR RALSTONIA EUTROPHA EM ALTA DENSIDADE</u>	115

7.1 ANÁLISE DO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE RALSTONIA EUTROPHA EM ALTA DENSIDADE A TEMPERATURA DE 32,5°C	115
7.1.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS	123
<u>8 - EXTRAÇÃO, RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO</u>	<u>125</u>
8.1 DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO UTILIZADOS NO ESTUDO	126
8.1.1 MÉTODO PADRÃO UTILIZADO PARA EFEITOS COMPARATIVOS	127
8.2 TESTES PRELIMINARES	129
8.2.1 COMPARAÇÃO ENTRE OS TRÊS MÉTODOS NOVOS FRENTE AO MÉTODO PADRÃO	129
8.2.2 ANÁLISE DA MELHOR TEMPERATURA E TEMPO DE EXTRAÇÃO	131
8.2.3 EXTRAÇÃO COM DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS PARA A OBTENÇÃO DA BIOMASSA CELULAR AO FINAL DO CULTIVO	134
8.2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	137
<u>CAPÍTULO V - CONCLUSÃO</u>	<u>139</u>
<u>CONCLUSÕES</u>	<u>140</u>
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	<u>143</u>
<u>ANEXOS</u>	<u>162</u>
<u>ANEXO A</u>	<u>163</u>
<u>ANEXO B.....</u>	<u>166</u>

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 2.1 - Consumo de Embalagens por Tipo de Material</i>	8
<i>Figura 2.2 - Estrutura da celulose</i>	10
<i>Figura 2.3 – Estrutura química de ácidos algínicos: a) ácido manurônico, b) ácido gulurônico.</i>	10
<i>Figura 2.4 - Estrutura química dos PHAs: a) polihidroxitirato); b) polihidroxi valerato) e, c) polihidroxitirato-co-valerato.</i>	10
<i>Figura 2.5 - Estrutura química de: a) poli(ε-caprolactona) (PCL); b) poli(ácido láctico) (PLA); c) poli(ácido glicólico) (PGA) e, d) poli(ácido glicólico-lático) (PGLA).</i>	10
<i>Figura 2.6 - Estrutura Geral dos PHAs (GOMES, 2000)</i>	12
<i>Figura 2.7 - Formação de grânulo de P(3HB) intracelular na membrana lipídica adaptado de TIAN et al., 2005).</i>	14
<i>Figura 2.8 - Imagens microscópicas de elétron de transmissão (TEM) de R. eutropha na produção de P(3HB) a 2,5 h (A), 5 h (B), 9 h (C) e 24 h (D), mostrando o “desaparecimento” dos elementos de mediação escuro-manchados dando espaço aos grânulos intracelulares de P(3HB). O tamanho final após 24h é de 0,5 μm.</i>	20
<i>Figura 2.9 - Produtos do acetil-CoA em condições de crescimento balanceado e de excesso e escassez de carbono apresentado por SQUIO, (2003).</i>	21
<i>Figura 2.10 - Síntese de P(3HB) a partir de acetil-CoA em Rasltonia eutropha.</i>	22
<i>Figura 2.11 - Ciclo da biodegradação de um material de fonte renovável e biodegradável.</i>	24
<i>Figura 2.12 - Régua produzida a partir de P(3HB) em processo de biodegradação.</i>	25
<i>Figura 2.13 - Corpo de prova produzido com P(3HB) em decomposição em fossa séptica.</i>	25
<i>Figura 2.14 – Fórmula estrutural do ester ácido carbônico cíclico.</i>	34
<i>Figura 2.15 - Esquema representativo de uma curva de DSC (LUCAS, 2001).</i>	38
<i>Figura 2.16– Distribuição estatística da massa molar em um polímero (ROSEN, 1993).</i>	40
<i>Figura 2.17 - Representação gráfica do princípio de cromatografia por exclusão.</i>	41
<i>Figura 2.18 - Representação esquemática de um sistema de análise de GPC (LUCAS, 2001).</i>	42
<i>Figura 2.18 - Produtos feitos a base de PHAs da empresa Biopol.</i>	44
<i>Figura 2.19 - Plásticos confeccionados com P(3HB) a partir de cana-de açúcar.</i>	45
<i>Figura 3.1 - Biorreator Bioflo 110 utilizado nos experimentos.</i>	51
<i>Figura 3.2 - Ilustração para explicar o método dinâmico utilizado para determinar o K_{La} e a QO_2.</i>	59
<i>Figura 3.3 - Biostat B-plus, Sartorius, 2 litros.</i>	70
<i>Figura 3.4 - Biostat B-plus, Sartorius, 10 litros.</i>	71
<i>Figura 3.5 - Ilustração do equipamento utilizado para a determinação do Peso molecular</i>	76
<i>Figura 4.1 - Curva de crescimento microbiano com os parâmetros biológicos em função do tempo.</i>	81

<i>Figura 4.2 - Curvas de crescimento de R. eutropha em glicose expressa em LN (X/Xo) pelo tempo (h) nas temperaturas de 30°C, 32,5°C, 35°C, 37,5°C e 40°C. As linhas representam o modelo de Gompertz Modificado ajustado aos dados experimentais.</i>	<i>83</i>
<i>Figura 5.1 - Evoluções da Biomassa Total (XT); P(3HB); Biomassa Residual (Xr); Proteína e Consumo de Nitrogênio, expressos em g/L, em função do tempo na temperatura de 30°C. As linhas contínuas representam as curvas ajustadas pelo software Lissage.</i>	<i>93</i>
<i>Figura 5.2 - Evoluções da Biomassa Total (XT); P(3HB); Biomassa Residual (Xr); Consumo de Nitrogênio, expressos em g/L, em função do tempo na temperatura de 32,5°C. As linhas contínuas representam as curvas ajustadas pelo software Lissage.</i>	<i>93</i>
<i>Figura 5.3 - Evoluções da Biomassa Total (XT); P(3HB); Biomassa Residual (Xr); Proteína e Consumo de Nitrogênio, expressos em g/L, em função do tempo na temperatura de 35°C. As linhas contínuas representam as curvas ajustadas pelo software Lissage.</i>	<i>94</i>
<i>Figura 5.4 - Evoluções da Biomassa Total (XT); P(3HB); Biomassa Residual (XR); Proteína e Consumo de Nitrogênio expressos em g/L em função do tempo na temperatura de 37,5°C. As linhas representam as curvas ajustadas pelo software Lissage.</i>	<i>94</i>
<i>Figura 5.5 - Evoluções da Biomassa Total (XT); P(3HB); Biomassa Residual (Xr); Proteína e Consumo de Nitrogênio, expressos em g/L, em função do tempo na temperatura de 40°C. As linhas contínuas representam as curvas ajustadas pelo software Lissage.</i>	<i>95</i>
<i>Figura 5.6 - Evolução da concentração de P(3HB) (g/L) em função do tempo nas diferentes temperaturas de cultivo testadas.</i>	<i>98</i>
<i>Figura 5.7 - Evoluções da Biomassa Total (XT); P(3HB); Biomassa Residual (Xr) e Concentração de Nitrogênio expressos em g/L em função do tempo na temperatura de 30°C. As linhas contínuas representam as curvas ajustadas pelo software Lissage.</i>	<i>102</i>
<i>Figura 5.8 - Evoluções da Biomassa Total (XT); P(3HB); Biomassa Residual (Xr) e Concentração de Nitrogênio expressos em g/L em função do tempo na temperatura de 32,5°C. As linhas contínuas representam as curvas ajustadas pelo software Lissage.</i>	<i>102</i>
<i>Figura 5.9 - Evoluções da Biomassa Total (XT); P(3HB); Biomassa Residual (Xr) e Concentração de Nitrogênio expressos em g/L em função do tempo na temperatura de 37,5°C. As linhas contínuas representam as curvas ajustadas pelo software Lissage.</i>	<i>103</i>
<i>Figura 5.10 - Evoluções da Porcentagem de P(3HB) em função do tempo (h) para as diferentes temperaturas de cultivo 30°C, 32,5°C e 37,5°C.</i>	<i>103</i>
<i>Figura 6.1 - Variação da concentração de O₂ dissolvido durante a realização do método dinâmico.</i>	<i>105</i>
<i>Figura 6.2 - Acompanhamento do consumo de substrato (□), evolução da biomassa tota (XT) (▲) em (g/L), velocidade específica de crescimento (μ) (h⁻¹) (●), determinação de QO₂ (gO₂/gcel.h) (○) e porcentagem de oxigênio dissolvido (■) sob agitação de 600 rpm e 0,125 vvm em função do tempo de cultivo (h). A linha pontilhada indica o momento em que ocorre a limitação do substrato (---).</i>	<i>107</i>

Figura 6.3 - Acompanhamento do consumo de substrato (\square), evolução da biomassa tota (XT) (\blacktriangle) em (g/L), velocidade específica de crescimento (μ) (h^{-1}) (\bullet), determinação de QO_2 ($gO_2/gcel.h$) (\circ) e porcentagem de oxigênio dissolvido (\blacksquare) sob agitação de 900 rpm e 0,125 vvm em função do tempo de cultivo (h). A linha pontilhada indica o momento em que ocorre a limitação do substrato (---).	108
Figura 6.4 - Evolução do consumo de nitrogênio (g/L) (\square), produção de P(3HB) (\bullet), determinação de QO_2 ($gO_2/gcel.h$) (\blacksquare) e K_La (h^{-1}) (Δ) em função do tempo de cultivo a 30°C. A linha pontilhada indica o momento em que ocorre a exaustão em nitrogênio.....	110
Figura 6.5 - Evolução do consumo de nitrogênio (g/L) (\square), produção de P(3HB) (\bullet), determinação de QO_2 ($gO_2/gcel.h$) (\blacksquare) e K_La (h^{-1}) (Δ) em função do tempo de cultivo a 32,5°C. A linha pontilhada indica o momento em que ocorre a exaustão em nitrogênio.....	111
Figura 6.6 - Evolução do consumo de nitrogênio (g/L)(\square), produção de P(3HB)(\bullet), determinação de QO_2 ($gO_2/gcel.h$)(\blacksquare) e K_La (h^{-1}) (Δ) em função do tempo de cultivo a 35°C. A linha pontilhada indica o momento em que ocorre a exaustão em nitrogênio.....	111
Figura 7.1 - Evolução da Biomassa Total (XT) e Consumo do substrato e concentração de Nitrogênio expressos em g em função do tempo.	116
Figura 7.2 - Evoluções da Biomassa Total (XT); Biomassa Residual (XR); P(3HB); Consumo de substrato e concentração de Nitrogênio expressos em g em função do tempo.	119
Figura 7.3 - Evolução do crescimento celular medido por espectrofotometria e expresso em $LN(Absorbância/Absorbância\ inicial)$ em função do tempo.	122
Figura 7.4 - Evolução do pH em função do tempo.	123
Figura 8.1 – Fluxograma descritivo do processo de extração proposto por Dalcanton (2006).	128
Figura A.1 - Curva de calibração para a determinação da concentração de açúcares redutores pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS).	163
Figura A.2 - Curva de calibração de determinação da concentração de proteínas pelo método de biureto, utilizando-se albumina bovina como padrão.....	163
Figura A.3 - Curva típica padrão para a determinação da concentração de P(3HB).	164
Figura A.4 - Exemplo de um cromatograma de análise de P(3HB).	164
Figura A.5 - Curva Padrão para a determinação da concetração de nitrogénio (Universidade Nova de Lisboa).....	165
Figura A.6 - Curva padrão para a determinação da concentração de P(3HB) (Universidade Nova de Lisboa)	165
Figura B.1 - Filmes de P(3HB) extraídos 130°C/15min(a), 130°/30min (b) e 145°C/15min (c).....	166
Figura B.2 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 145°C/45min, método 3.	167
Figura B.3 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 130°C/30min, método 3.	168
Figura B.4 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 100°C/15min, método 3.	169
Figura B.5 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 100°C/45min, método 3.	170

<i>Figura B.6 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 130°C/15min, método 3. ...</i>	<i>171</i>
<i>Figura B.7 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído pelo método Padrão (solvente clorofórmio).</i>	<i>172</i>
<i>Figura B.8 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 145°C/30min, método 3. ...</i>	<i>173</i>
<i>Figura B.9 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 115°C/45 min, método 3. ...</i>	<i>174</i>
<i>Figura B.10 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 145°C/15 min, método 3. ...</i>	<i>175</i>
<i>Figura B.11 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 130°C/30min, método 2. ...</i>	<i>176</i>
<i>Figura B.12 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 130°C/30 min, método 1. ...</i>	<i>177</i>
<i>Figura B.13 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 130°C/30 min, com pré-tratamento pH.</i>	<i>178</i>
<i>Figura B.14 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 130°C/30 min, com pré-tratamento T.</i>	<i>179</i>
<i>Figura B.15 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 130°C/30 min, com pré-tratamento pH+T.</i>	<i>180</i>

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 2.2 - Comparação entre as propriedades físicas e térmicas dos vários PHAs e do polipropileno.....</i>	<i>15</i>
<i>Tabela 2.3 - Tempo de biodegradação de um filme de 1mm de P(3HB-co-3HV) em diferentes ambientes.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabela 2.4 - Efeito dos componentes de baixo ou alto peso molecular nas propriedades mecânicas de um material polimérico (LUCAS, 2001).....</i>	<i>42</i>
<i>Tabela 3.1 - Composição do Meio Mineral sem limitação em nutrientes.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabela 3.2 - Composição da solução concentrada de oligoelementos.</i>	<i>50</i>
<i>Tabela 3.3 - Procedimento de determinação de nitrogênio amoniacal.</i>	<i>54</i>
<i>Tabela 4.1 - Valores dos índices estatísticos para os modelos de Gompertz Modificado e Logístico, ajustados às curvas de crescimento de R. eutropha nas diferentes temperaturas de cultivo.....</i>	<i>81</i>
<i>Tabela 4.2 - Parâmetros obtidos pelo modelo de Gompertz Modificado para os cultivos em glicose/frutose.</i>	<i>84</i>
<i>Tabela 4.3 - Coeficiente de Correlação (R^2) obtidos pelos modelos: Raiz Quadrada, Equação de Arrhenius para os parâmetros de crescimento μ, λ, A obtidos pelo modelo GM.....</i>	<i>86</i>
<i>Tabela 5.1 - Tempo de duração da fase de crescimento sem limitação de Nitrogênio, fator de conversão de nitrogênio em biomassa residual, consumo de substrato, biomassa residual, biomassa total dos cultivos realizados a diferentes temperaturas.....</i>	<i>92</i>
<i>Tabela 5.2 - Fator de conversão, produtividade e porcentagem de P(3HB) ao longo da fase de produção de P(3HB).</i>	<i>99</i>
<i>Tabela 5.3 - Fator de conversão, produtividade e porcentagem de P(3HB) ao longo das fases de crescimento e produção de P(3HB).</i>	<i>101</i>
<i>Tabela 7.1 – Valores obtidos para fator de conversão de nitrogênio em biomassa residual, consumo de substrato, fator de conversão de substrato em biomassa residual, produtividade, biomassa residual, biomassa total, produção de P(3HB) e Conteúdo de P(3HB) obtidos durante a fase inicial (crescimento).....</i>	<i>117</i>
<i>Tabela 7.2 – Tempo de fase de produção de P(3HB), massa de polímero (P(3HB)), produtividade de P(3HB), conteúdo de P(3HB) em porcentagem e Biomassa total, obtidos durante a fase de limitação em fonte de Nitrogênio.</i>	<i>118</i>
<i>Tabela 8.1 - Comparação entre os 3 métodos de extração à temperatura de 130°C/30 min e a extração Padrão, valores expressos em % de recuperação, % pureza, peso molecular e polidispersividade, temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade χ_c (%).</i>	<i>129</i>

Tabela 8.2 - Comparação entre as diferentes temperatura e tempos de extração comparados a extração Padrão, valores expressos em % de recuperação, % pureza, peso molecular e polidispersividade, temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade χ_c (%)...... 132

Tabela 8.3 - Comparação entre os diferentes pré-tratamentos aplicados à massa celular antes da extração, temperatura e tempo de extração 130°C/30 min, valores expressos em % de recuperação, % pureza, peso molecular e polidispersividade, temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade χ_c (%)...... 135

NOMENCLATURA

A	Concentração celular máxima atingida
ABS	Absorbância
C	Concentração de oxigênio dissolvido lida pelo eletrodo (gO_2/L)
C _p	Sinal do eletrodo
C _s	Concentração de oxigênio dissolvido na saturação (g/L)
HÁ	Hidroxicanoatos
K _{La}	Coefficiente volumétrico de transferência de O_2 (h^{-1})
K _p	Constante de atraso do eletrodo (h^{-1})
MM	Meio Mineral
PVOH	Álcool polivinílico
P(3HB)	Poli(3-hidroxi butirato)
P(3HB-co-HV)	Poli(3-hidroxi butirato-co-3-valerato)
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PHA	Polihidroxicanoatos
PLA	Poli(ácido láctico)
PGA	Poli(ácido glicólico)
PGLA	Poli(ácido glicólico-ácido láctico)
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PHASCL	Polimeros de cadeia curta
PHAMCL	Polimeros de cadeia média
PP	Polipropileno
OS	Poliestireno
PVC	Poli(cloreto de vinila)
Pr _{P(3HB)}	Produtividade média de P(3HB) ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
Pr _{Xr}	Produtividade média de biomassa residual ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
Q _{O2}	Velocidade específica de respiração ($\text{gO}_2.\text{gcel}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
Q _{O2X}	Velocidade de consumo de oxigênio ($\text{gO}_2.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
X _r	Biomassa residual (g/L)
XT	Biomassa Total (g/L)
Y _{P(3HB)/S}	Fator de conversão de substrato em produto P(3HB) (g/g)
Y _{XT/S}	Fator de conversão de substrato em biomassa

	total (g/g)
$Y_{Xr/S}$	Fator de conversão de substrato em biomassa residual (g/g)
$Y_{Xr/N}$	Fator de conversão de nitrogênio em biomassa residual (g/g)
μ_{max}	Velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})
λ	Duração da fase lag (h)

RESUMO

Polihidroxialcanoatos (PHAs) são polímeros sintetizados por vários microrganismos e armazenados na forma de reserva de energia e carbono. Sua produção se dá sob condições desfavoráveis de crescimento, como limitação de nitrogênio ou fósforo, e na presença de excesso de fonte de carbono. Poli(3-hidroxiobutirato) (P(3HB)) é o polímero mais estudado dentre os PHAs, possuindo características próximas às encontradas no polipropileno. Os PHAs chamam atenção devido à sua biodegradabilidade e possibilidade de substituição dos plásticos petroquímicos. Embora os PHAs apresentem vantagens ambientais sobre os plásticos de origem petroquímica, a sua principal desvantagem é o alto custo de produção, principalmente relativo ao substrato, recuperação e extração do polímero. Neste trabalho teve-se por objetivo a melhoria das condições de cultivo para o crescimento e produção de P(3HB) por *R. eutropha* em diferentes temperaturas, seguido de um estudo de extração, caracterização e recuperação do polímero obtido. Os experimentos foram conduzidos em culturas em biorreator utilizando como microrganismo produtor a bactéria *Ralstonia eutropha* DSM 545. O processo foi dividido em duas fases sendo a primeira um crescimento balanceado e a segunda um crescimento desbalanceado com carência de nitrogênio para acúmulo intracelular do polímero. Primeiramente, a modelagem matemática do crescimento da bactéria foi utilizada para estimar os parâmetros: velocidade específica de crescimento (μ_{\max}), tempo da fase lag (λ) e aumento logarítmico da população (A), posteriormente definiu-se a melhor temperatura de cultivo para o crescimento e produção de P(3HB) por *Ralstonia eutropha*. Os modelos de Gompertz Modificado e o Logístico foram ajustados às curvas de crescimento. O modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais foi o Modelo de Gompertz Modificado. Não foi possível a obtenção de um modelo secundário que descrevesse a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento μ , λ e A , nas diferentes temperaturas de cultivo testadas. A temperatura que proporcionou as melhores condições de cultivo tanto para o crescimento quanto para a produção de P(3HB) foi a temperatura de 32,5°C, onde nesta condição obteve-se uma produção de P(3HB) de 70,3% em 26,5 horas de cultivo, com uma produtividade de 0,47 g.L⁻¹h⁻¹. O estudo da respirometria como alternativa para definição do estado fisiológico da célula e como ferramenta indicativa de limitações de nutrientes durante a produção de P(3HB) também foi realizado deste trabalho. Foi observado que, para concentrações de substrato inferiores a 12g/L, a cultura começa a sofrer uma desaceleração na sua velocidade específica de respiração (QO₂), tornando-se um fator limitante na produção de P(3HB). Foi possível visualizar também, através do acompanhamento da velocidade específica de respiração, o momento em que começa a ocorrer a limitação de nitrogênio e, conseqüentemente, o início da produção de P(3HB), isto é indicado através do início da sua desaceleração, o que passa a ser mais acentuado a partir do momento em que ocorre a exaustão do nitrogênio no meio. Como última parte deste estudo, foram realizados testes em diferentes condições de pré-tratamentos celular antes da extração, e testes durante a extração variando-se o tempo e a temperatura, utilizando como solvente o carbonato de propileno. Nesta etapa, observou-se que o melhor resultado foi obtido nas extrações realizadas com pré-tratamento de pH e temperatura de extração a 130°C/30 min onde obte-se um peso molecular de 1,3.10⁶g/mol, com uma recuperação e pureza de 96,3% e 94,6%. O conjunto de dados obtidos neste trabalho é bastante relevante para a melhoria do processo de produção de P(3HB).

Palavras-chave: Polihidroxialcanoatos, *Ralstonia eutropha*, biopolímeros, P(3HB), extração, recuperação.

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polymers synthesized by various microorganisms and stored as reserve of energy and carbon. Their production occurs under unbalanced growth conditions, such as limitation of nitrogen or phosphorus and excess of carbon source. Polyhydroxybutyrate (P(3HB)) is the most studied polymer among the PHAs since its physical properties are remarkably similar to those of polypropylene. The PHAs are important due to their biodegradability and also because the possibility to use them rather than petrochemical plastics. Although PHAs show ecological advantages over petrochemical plastics, their main disadvantage is the high cost of production, mainly due to the polymer substrate, recovery and extraction. In this work, the target was to improve the culture conditions for growth and production of P(3HB) by *Ralstonia eutropha* in different temperatures, following by the study of extraction, characterization and recovery of the polymeric obtained. The experiments were carried out in a bioreactor using *Ralstonia eutropha* DSM 545. The process was divided in two phases. The first phase was characterized by balanced growth conditions and the second one occurred under unbalanced growth conditions such as limitation of nitrogen in order to produce intracellular polymer accumulation. Firstly, the mathematical modeling of bacteria growth was used to estimate the following parameters: maximum specific growth rate (μ_{\max}), time of lag phase (λ) and logarithmic increase of population (A). After, the best cultivation temperature was defined in order to produce P(3HB) by *Ralstonia eutropha*. The growth models "Modified Gompertz" and "Logistic" was fit to the growth curves. The best model fitted to the experimental data was Modified Gompertz. It was not possible to find a secondary model able to describe the influence of temperature over growth parameters μ_{\max} , λ and A in the different cultivation temperatures tested. The best cultivation temperature for growth and for P(3HB) production was 32.5°C, in which 70.3% of P(3HB) was produced in 26.5 hours of cultivation, with productivity of 0.47 g.L⁻¹h⁻¹. The respirometry study, as a alternative for definition of the physiologic state of the cell and also as a toll which give indication of nutrients limitation during the P(3HB) production, was done in this work too. It was observed that when the concentration of substrate was under 12g/L, the culture start to suffer a slowdown of its specific respiration rate (QO_2), becoming itself a limiting factor of P(3HB) production. It was also possible to see, following the specific respiration rate, the exactly moment when begins the nitrogen limitation and, consequently, the P(3HB) production phase. This phase is indicated by the decrease of QO_2 value, followed by the acceleration of this diminution when the exhaustion of nitrogen occurs in the media. In the last step of this study, tests were made in different conditions of cellular pre-treatment before extraction and tests were made during the extraction under different time and temperature conditions, using propylene carbonate as a solvent. In this step, it was observed that the best results was found when the extractions were made with pre-treatment of pH and temperature of extraction at 130°C/30 min which was obtained molecular weight of 1.3 x 10⁶g/mol and recuperation and purity of the 96.3% and 94.6%, respectively. The set of the data obtained in this work is enough relevant to the improvement of the P (3HB) production process.

Keyword: Polyhydroxyalkanoates, *Ralstonia eutropha*, biopolymer, P(3HB), extraction, recovery.

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

O plástico convencional apresenta velocidades de degradação extremamente baixas fato que, pode ocasionar sérios problemas relativos à manutenção do equilíbrio ambiental. A grande quantidade de lixo plástico que se acumula dia após dia, bem como o esgotamento das fontes de combustíveis fósseis, levou a realizar estudos de gerenciamento e diminuição do volume de lixo sólido, buscando ainda a produção de materiais plásticos biodegradáveis, a partir de fontes renováveis de carbono. Portanto, estes novos materiais devem possuir as propriedades desejáveis dos plásticos convencionais, serem produzidos a partir de substratos renováveis e ainda serem completa e rapidamente biodegradados quando descartados no meio ambiente (PIEMOLINI, 2004).

Para contornar esse problema, estão sendo estudadas alternativas como a reciclagem de produtos constituídos de plásticos e a substituição por plásticos biodegradáveis, mais compatíveis com o pensamento de preservação ambiental (SOTERO, 2000). Os plásticos biodegradáveis, ou bioplásticos, são polímeros que se degradam completamente ao ataque microbiano em um curto espaço de tempo, sob condições apropriadas do meio ambiente, sua degradação é realizada principalmente pela atividade enzimática dos microrganismos num período entre doze a dezoito meses (LAFFERTY et al, 1988; BYROM, 1990; KRUPP & JEWELL, 1992). Dentre os biopolímeros em desenvolvimento estão os polihidroxialcanoatos (PHAs).

Os polihidroxialcanoatos são os únicos polímeros totalmente biodegradáveis, de origem microbiana. Eles são sintetizados por diversos microrganismos, como polímeros de reserva, possuindo, após extração, propriedades semelhantes aos plásticos de origem petroquímica, como o polipropileno. 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, ele se apresenta como um substituinte a altura dos plásticos petroquímicos (RODRIGUES, 2005).

Além da característica de minimização de despejos industriais, os PHAs são materiais por excelência biocompatíveis, uma vez que são produtos de metabólitos intermediários comuns a todos os eucariotos superiores, sendo que o poli(3-hidroxiбутирато) P(3HB) é inclusive detectado em quantidades apreciáveis no plasma humano (REUSCH et al., 1993). Conseqüentemente, implantes em tecidos como próteses, pinos, placas, fios de sutura, etc.

constituídos de PHAs, não provocam resposta imunológica como reações inflamatórias (BYROM, 1990).

Estes atributos fazem dos PHAs objeto de interesse das indústrias química e farmacêutica, para o desenvolvimento de produtos que vão desde hormônios até os mais variados produtos (BYROM, 1990; BRANDL et al., 1990; HRABAK, 1992; LEE, 1996).

Apesar desta grande possibilidade de aplicações, os plásticos biodegradáveis ainda têm participação mínima no mercado internacional, em virtude de seu alto custo em relação aos plásticos petroquímicos. Apesar de alguns PHAs serem sintetizados quimicamente, a alternativa de produção por via biotecnológica sem dúvida se impõe, graças a um menor custo de produção, em grande escala, tornando assim o processo mais interessante do ponto de vista econômico, principalmente em países com disponibilidade de matéria-prima para o processo fermentativo (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997).

Estratégias de produção de P(3HB) para elevar o conteúdo de biopolímero e diminuir o custo total dos bioplásticos são necessárias. A utilização de substratos de baixo custo pode representar 40% de economia no processo de produção de P(3HB) (KIM, 2000). O estudo da temperatura de cultivo de *Ralstonia eutropha* também é uma grandeza importante pois, se houver a possibilidade de operação a temperaturas mais altas que a utilizada (30⁰C) em níveis industriais, é interessante em virtude da economia em algumas etapas de troca de calor (DALCANTON, 2006).

Como o biopolímero é um produto intracelular, os métodos adotados para recuperação e purificação do P(3HB) contribuem significativamente para o desenvolvimento e economia global do processo (NONATO et al., 2001). A pesquisa por uma técnica de extração de P(3HB), de células de *Ralstonia eutropha*, que possa diminuir a quantidade de solventes utilizados, tornar o processo mais simples e menos poluente, tornam assim os custos de recuperação de P(3HB) os menores possíveis também se faz necessária (DALCANTON, 2006).

A relevância dessa pesquisa reside no fato de sua contribuição de melhoria na produção de P(3HB) possibilitando, no futuro, a substituição de embalagens de plásticos sintéticos por estes biopolímeros, estes últimos produzidos a partir de um recurso renovável e que pode ser produzido no Brasil, inclusive gerando empregos no campo. Desta forma, pode-se obter mais independência do mercado mundial de petróleo e dos preços oscilantes deste. Além disso, a biodegradabilidade do bioplástico vai contribuir, expressivamente, na redução do volume de resíduos sólidos que ficam acumulados durante muito tempo em aterros controlados ou não.

Este trabalho tem como objetivo a melhoria das condições de cultivo para o crescimento e produção de P(3HB) por *R. eutropha* em diferentes temperaturas, seguido de estudo de recuperação e caracterização do polímero produzido. O estudo da respirometria como alternativa para definição do estado fisiológico da célula durante a produção de P(3HB) é também objetivo deste trabalho.

Os principais objetivos deste trabalho foram:

- 1- Utilização de ferramentas estatísticas na previsão do crescimento de *Ralstonia eutropha*, visando obter a melhor condição de crescimento do microrganismo.
- 2- Estudo comparativo de diferentes temperaturas de cultivo para produção de P(3HB) visando melhorar a produtividade do biopolímero, utilizando como fonte de carbono glicose/frutose.
- 3- Utilização da respirometria no estudo do comportamento fisiológico da célula durante os cultivos.
- 4- Estudo de cultivos em alta densidade celular.
- 5- Estudo da extração e purificação do P(3HB) acumulado no interior das células.
- 6- Caracterização do polímero extraído.

Este trabalho está estruturado em diferentes capítulos. O capítulo II traz uma revisão bibliográfica sobre os diferentes assuntos abordados na pesquisa. No capítulo III estão apresentados os materiais e os métodos utilizados nesse estudo. Os resultados e discussão estão apresentados no Capítulo IV subdivididos em (parte 4, 5, 6, 7 e 8) no Capítulo V estão às conclusões e sugestões. Ao final, estão inclusos alguns anexos para complementação do trabalho e as referências bibliográficas.

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Impactos ambientais ocasionados por embalagens plásticas

Até pouco tempo atrás era importante descobrir materiais cada vez mais duráveis para utilização diária no mercado e dentre estes estavam os plásticos, com grande variedade de aplicações, devido à suas propriedades, versatilidade de uso e preço (FRANCHETTI et al, 2006). Um dos materiais mais importantes na sociedade atual é o polímero, que, sob diversas formas, tornou-se de uso indispensável para aplicação em bens duráveis e em embalagens (MARANGONI, 2000). Devido ao fato dos polímeros apresentarem grande dificuldade de degradação e terem um ciclo de utilização muito curto, tem aumentado a preocupação com a disposição final e reutilização dos mesmos. Como a maior parte do lixo é depositada em aterros sanitários, os polímeros derivados de petróleo representam um problema, pois devido à dificuldade de degradação, eles acabam comprometendo a circulação dos gases e líquidos, dificultando a degradação de outros materiais constituintes do lixo e deste modo retardando a estabilização das áreas dos aterros (NETTO, 2005).

Indústrias buscam ativamente maneiras de reduzir o uso desnecessário de plásticos como forma de complementar os programas de reciclagem ou de reutilização. Outras trabalham em novos materiais ou na modificação de materiais antigos para reduzir o impacto ambiental de plásticos (LUZIER, 1992).

Aproximadamente 140 milhões de toneladas de plásticos, derivados do petróleo, são produzidos anualmente em todo mundo (SHIMÃO, 2001). A produção nacional em 2002 foi de, aproximadamente, 3,98 milhões de toneladas, sendo que só o Brasil consumiu 45% deste total. Estes polímeros são extremamente estáveis e não entrarão de imediato no ciclo de degradação da biosfera e podem permanecer intactos por longo tempo (SAVENKOVA, 2000; SHIMÃO, 2001). Outro aspecto negativo destes polímeros é que eles formam uma camada impermeabilizante que dificulta a circulação de gases e líquidos nos lixões que agilizam a decomposição do lixo (KARNIOL, 2006).

No entanto, fica difícil de imaginar a vida moderna sem o uso de embalagens plásticas para alimentos. Elas são usadas em 80% dos alimentos pré-preparados e conservados em embalagens (CURTE, 2002). Por outro lado, são elas que sobram do consumo, após o uso do produto, sendo descartadas, gerando enormes quantidades de resíduos, ou seja, o lixo para o

meio ambiente. Hoje o plástico representa em torno de 15% a 20% da composição do lixo urbano. No Brasil, por ano, 1.8 milhão de toneladas de plástico são consumidas, das quais 350 mil toneladas são despejadas anualmente nos aterros sanitários que têm sua degradação difícil e lenta. No Brasil, em média, o equivalente a 200 mil toneladas por ano 15% do total de plástico consumido é reciclado. Do montante, 60 % provêm de resíduos industriais e 40% do lixo urbano, segundo estimativa da Associação Brasileira de Reciclagem de Materiais Plásticos em 2004 (<http://www.plastico.com.br/revista/pm374/reciclagem1.html>).

Em Florianópolis 14% do peso do lixo coletado pelo sistema convencional corresponde a plástico (<http://portal.an.com.br:8000/recycle/4rec.htm>). No Brasil, cada habitante descarta 25 quilos de plástico por ano, cinco vezes menos que os americanos, um dos maiores consumidores do mundo.

O crescimento populacional e econômico gera como conseqüências, a demanda por embalagens e o aumento do volume de lixo na maioria dos países, principalmente nos ocidentais.

Segundo dados estatísticos (SOTERO, 2000), só no Brasil, são despejados de 240 a 300 mil toneladas diárias de resíduos urbanos no meio ambiente, dos quais 100 mil toneladas são resíduos domésticos, conforme a estimativa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatístico (IBGE). Desses resíduos domésticos, 60 a 65% são restos alimentares e 25 a 30% são embalagens. Essa montanha de sacos, caixas, garrafas, latas, entre outros, colabora para a superlotação dos aterros e lixões, para a sujeira de ruas e rios. A Figura 1 mostra que a grande maioria das embalagens consumidas no Brasil é plástica.

A situação atual do resíduo sólido no Brasil é crítica, principalmente nos municípios do interior. De acordo com o censo do IBGE de 2000, 79 % da população de grandes metrópoles ou capitais do país tem o lixo coletado pela limpeza pública, o restante é queimado, sem controle, ou jogado a céu aberto. Do total de lixo coletado, 72 % é depositado em lixões, sem controle de poluição ou preocupação com a população vizinha. Deste total coletado, a compostagem de resíduos orgânicos é em torno de 3%. Isto significa dizer que apenas 28 % deste lixo recebe um tratamento adequado.

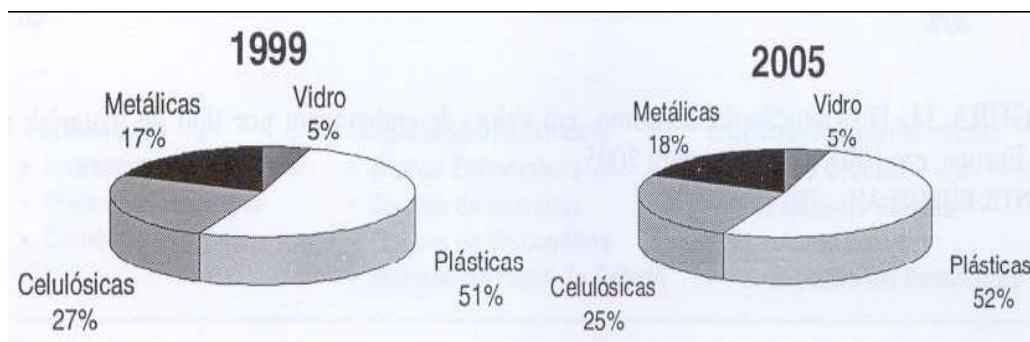


Figura 2.1 - Consumo de Embalagens por Tipo de Material

Fonte: BRASIL, 2000.

A substituição de materiais plásticos convencionais por biodegradáveis na fabricação de embalagens, passa a ser uma solução para se diminuir o grande volume de resíduos.

A produção de plásticos biodegradáveis (passíveis de rápida decomposição por microrganismos) é uma importante alternativa para redução dos danos ambientais causados por esses materiais, as outras formas são: a reciclagem, incineração, incorporação de aditivos a plásticos tradicionais e obtenção de termoplásticos que se degradam mais facilmente. Já foram desenvolvidos vários polímeros com propriedades similares às dos plásticos de origem petroquímica e mais suscetíveis de degradação biológica, como poli- ϵ -caprolactona (PCL), álcool polivinílico (PVOH), polilactato, poliglicolato e diversas misturas desses materiais com amido, além dos polihidroxicanoatos (PHAs) (SILVA, et al 2001).

Atualmente, o mundo produz 200 milhões de toneladas por ano de polipropileno. "O P(3HB) não é indicado para substituir todas as aplicações do polipropileno, mas alcançará nos próximos anos algo entre 1% a 2% deste mercado", afirma Jeffer, mestre em engenharia química pela Unicamp em 2001.

Os polímeros biodegradáveis podem ser classificados em duas categorias de acordo com a sua fonte de obtenção; ou seja, rotas sintéticas ou naturais, incluindo plantas e microrganismos (VERHOOGT, 1994). Biopolímeros são polímeros formados durante o ciclo de crescimento de organismos vivos são, então, denominados polímeros naturais. Sua síntese envolve, geralmente, reações catalisadas por enzimas e reações de crescimento de cadeia a partir de monômeros ativados, que são formados dentro das células por processos metabólicos complexos (FRANCHETTI, et al, 2006).

Os polímeros biodegradáveis ou polímeros naturais encontram-se divididos em 4 categorias:

a) Polissacarídeos: são formados basicamente por unidades de glicose, ligadas como anéis de grupos acetais (aldeído e álcool) e, portanto, com grande quantidade de grupos hidroxilas (alta hidrofiliçidade). Os principais polissacarídeos de interesse industrial são celulose, e amido, havendo uma atenção especial aos carboidratos mais complexos como quitosana, quitinas e xantanas (CHANDRA, et al 1998).

b) Ácidos algínicos: são formados de monômeros de ácido manurônico e gulurônico, são solúveis em água e tornam-se insolúveis na presença de cátions, como cálcio, berílio, alumínio e ferro, formando géis, que podem servir para liberação controlada de drogas em sistemas vivos, para encapsulamento de herbicidas, microrganismos e células.

c) Polipeptídeos naturais: gelatinas são polímeros biodegradáveis, consistindo de proteínas do tipo animal, com grande aplicação industrial, farmacêutica e biomédica, empregados como coberturas e microencapsulação de drogas e no preparo de hidrogéis (FRANCHETTI, et al, 2006).

d) Poliésteres bacterianos: são poliésteres naturais, produzidos por microorganismos selvagens ou bactérias geneticamente modificadas, como materiais de reserva intracelular, e têm sido alvo de muita atenção para aplicações comerciais, como polímeros biodegradáveis, vantajosamente produzidos por fontes renováveis. Os mais conhecidos são os polihidroxicanoatos, principalmente o poli(3-hidroxi butirato) (P(3HB)) e poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (P(3HB-co-3HV)). No Brasil e em toda a América Latina a empresa pioneira a produzir o P(3HB) e o P(3HB-co-3HV) é a Copersucar (Cooperativa dos Produtores de Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo).

Os polímeros biodegradáveis sintéticos são ésteres alifáticos biodegradáveis, por possuírem cadeias carbônicas hidrolizáveis. Se a biodegradação for por meio da ação de enzimas, a cadeia polimérica deve se ajustar aos sítios ativos das enzimas e isto é favorecido pela flexibilidade das cadeias poliméricas alifáticas, o que não ocorre com os poliésteres aromáticos. Esta classe de polímeros tem sido muito empregada em usos biomédicos, tais como cápsulas de liberação controlada de droga em organismos vivos, fixadores em cirurgias (suturas, clips, pinos para ossos) e para embalagens especiais. Os polímeros mais usados têm sido poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido glicólico-ácido láctico) (PGLA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (FRANCHETTI, et al, 2006; CHANDRA, et al 1998).

As Figuras 2.2 a 2.5 abaixo mostram exemplos de diferentes estruturas de polímeros biodegradáveis naturais e sintéticos.

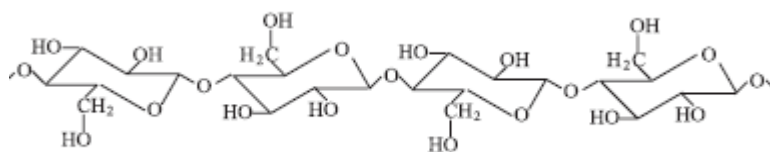


Figura 2.2 - Estrutura da celulose

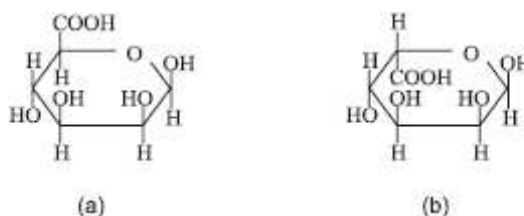


Figura 2.3 – Estrutura química de ácidos algínicos: a) ácido manurônico, b) ácido gulurônico.

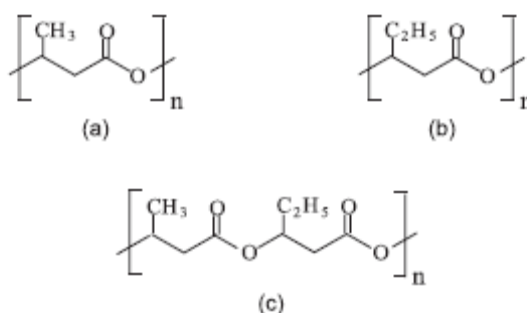
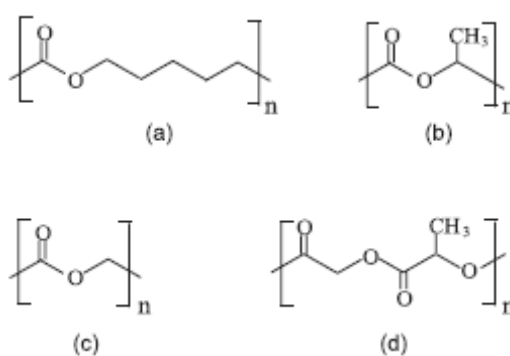
Figura 2.4 - Estrutura química dos PHAs: a) polihidroxibutirato); b) polihidroxivalerato) e, c) polihidroxibutirato-*co*-valerato.

Figura 2.5 - Estrutura química de: a) poli(ε-caprolactona) (PCL); b) poli(ácido láctico) (PLA); c) poli(ácido glicólico) (PGA) e, d) poli(ácido glicólico-lático) (PGLA).

Na Tabela 2.1 abaixo é possível visualizar o potencial de substituição dos polímeros sintéticos por polímeros biodegradáveis.

Tabela 2.1 - Potencial de substituição dos polímeros sintéticos por polímeros biodegradáveis (Crank et al. PRO-Bip, 2004).

Materiais	PVC	PE-HD	PE-LD	PP	PS	PMMA	PA	PET		PC
Polímeros de amido	-	+	+	+	+	-	-	-		-
PLA	-	+	-	+	+	-	+	+		-
PTT	-	-	-	+	-	-	++	++		+
PBT	-	-	-	++	-	-	+	++		+
PHB	-	+	-	++	+	-	-	-		-
PHB/HHx	+	++	++	++	+	-	-	+		-

++ substituição completa;

+ substituição parcial;

- não substituição.

PVC: cloreto de polivinila

PE-HD: polietileno de alta densidade

PE-LD: polietileno de baixa densidade

PBT: polibutileno tereftalato

PP: polipropileno

PS: poliestireno

PMMA: polimetil metacrilato

PA: poliamida

PET: polietileno tereftalato

PC: policarbonato

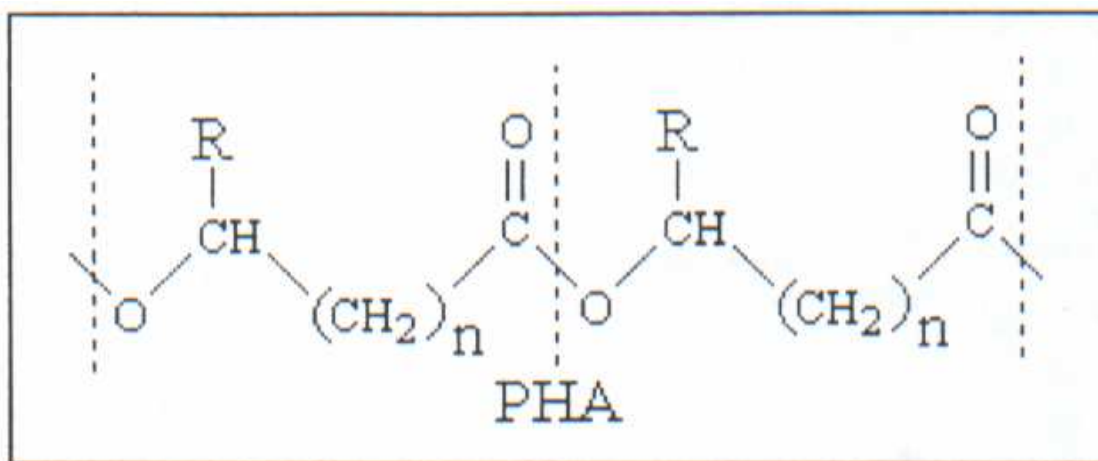
Fonte: Adaptado por Pradella, (2006), *Biopolímeros e Intermediários Químicos*. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos.

2.2 Polihidroxicanoatos

2.2.1 Descrição dos Polihidroxicanoatos (PHAs)

Os polihidroxicanoatos são sintetizados por um grande número de bactérias Gram negativas e Gram positivas pertencentes pelo menos a 75 gêneros diferentes. Alguns exemplos destas culturas usadas industrialmente para produzir PHAs incluem a *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* e diversas espécies de *Pseudomonas* (KIM et al., 1994).

Os PHAs são poliésteres biodegradáveis produzidos por diversas bactérias como material de reserva, na forma de grânulos intracelulares. É um material termoplástico que, em contraste com os polímeros sintéticos, tem a vantagem fundamental de ser renovável e não são derivados de petróleo (DUFRESNE et al., 2003). A estrutura geral dos PHAs é mostrada na Figura 2.6. A natureza do radical R determina a identidade da unidade monomérica e, junto com o valor de n (que pode variar de 600 a 35000), influem nas propriedades físicas do polímero. Desde que o primeiro P(3HB) foi descoberto, em 1926, já foram identificados cerca de 125 monômeros diferentes constituintes de PHAs produzidos por mais de 300 tipos de bactérias a partir de diferentes fontes de carbono (REHM & STEINBUCHER, 1999, LEE, 1996a; SUDESH et al., 2000, RODRIGUES, 2005).



R = hidrogênio Poli(3-hidroxipropionato)
R = metil Poli(3-hidroxibutirato)
R = etil Poli(3-hidroxivalerato)
R = propil Poli(3-hidroxihexanoato)
R = pentil Poli(3-hidroioctanoato)
R = nonil Poli(3-hidroiododecanoato)

Figura 2.6 - Estrutura Geral dos PHAs (GOMES, 2000) .

De acordo com o comprimento das cadeias carbônicas de suas unidades monoméricas, os PHAs foram classificados em dois grupos: PHAs constituídos por unidades de ácidos hidroxialcanóicos de cadeia curta (PHA_{SCL}), ou seja, aqueles que possuem cadeia carbônica constituída de 3 a 5 átomos de carbono, e os PHAs constituídos por unidades de cadeia média (PHA_{MCL}), apresentando de 6 a 14 átomos de carbono na cadeia e os de cadeia longa com mais de 15 átomos de carbono (PHA_{LCL}) (STEINBÜCHER et al., 1992; STEINBÜCHER e VALENTIN, 1995; JENDROSSEK et al., 1996).

Estes biopolímeros apresentam características muito interessantes como propriedades termoplásticas e físico-químicas muito similares aos vários plásticos de origem petroquímica, são completamente biodegradáveis e biocompatibilidade, produzidos a partir de matérias-primas renováveis, podendo ser reciclados e incinerados sem a geração de produtos tóxicos, o que os torna de grande aplicabilidade em relação aos plásticos petroquímicos e possíveis candidatos à sua substituição (BYROM, 1987; HÄNGGI, 1995; STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998).

Os PHAs podem ser produzidos por uma grande variedade de microrganismos procarióticos, sendo acumulados na forma de grânulos no citoplasma celular (Figura 2.7). Estas inclusões são geralmente esféricas, com diâmetros médios de 0,2-0,7 μm , e são circundados por uma membrana composta por cerca de 2% de proteínas e 0,5% de lipídios cuja espessura é de 2 nm (SUDESH et al., 2000), visíveis em microscópio óptico por contraste de fase, devido à sua alta refratividade (KIM e LENZ, 2001). Os grânulos são envoltos por uma camada fosfolipídica, por polimerases, despolimerases e proteínas citosólicas não específicas. A função da monocamada fosfolipídica ainda não está bem estabelecida, embora se suponha que ela seja necessária para evitar a transição do poliéster do estado amorfo para o estado mais estável - forma cristalina. Supõe-se ainda que ela aja como uma barreira protetora evitando danos celulares causados pela interação de PHAs com estruturas internas ou com proteínas citosólicas (LUENGO et al., 2003).

Estes biopolímeros são geralmente sintetizados como reserva de carbono e energia, quando o microrganismo detecta no meio alguma condição adversa ao seu crescimento. Estas condições podem estar associadas à limitação de nutrientes ou fatores de crescimento (como N, P, S, O₂, K e Mg), na presença de um excesso de fonte de carbono, ou a limitações físicas, como temperatura não ideal para crescimento.

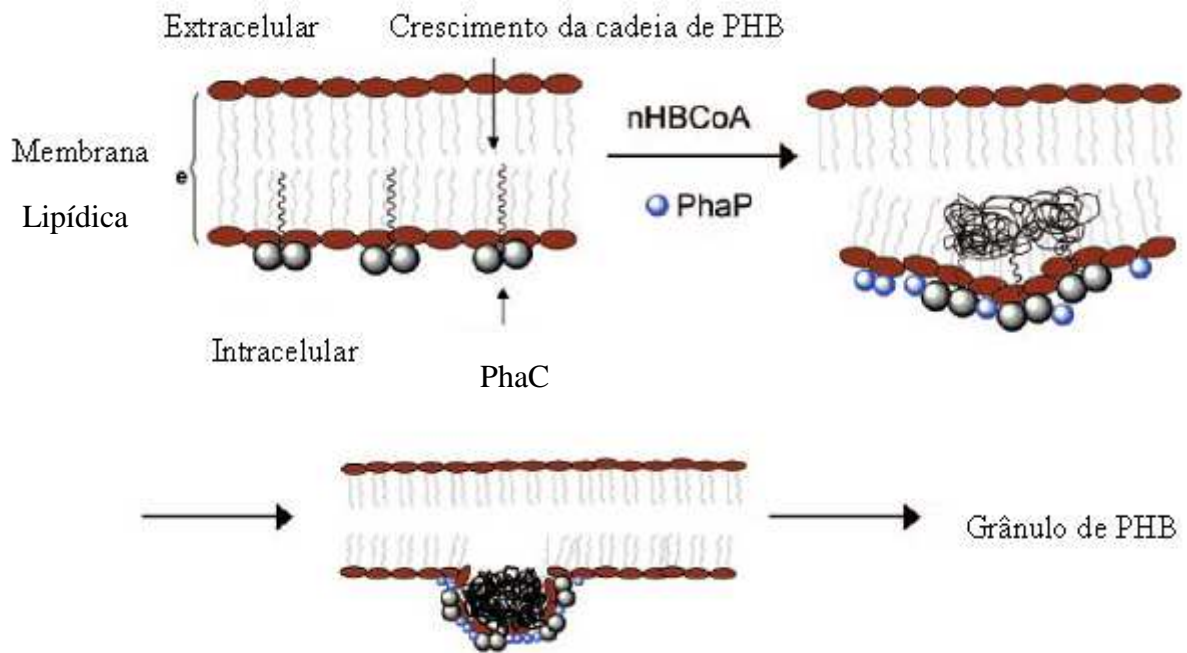


Figura 2.7 - Formação de grânulo de P(3HB) intracelular na membrana lipídica adaptado de TIAN et al., 2005).

O acúmulo de PHAs nas células, quando cultivadas sob condições controladas, é variável, podendo representar de 30 a 80% de sua massa seca. Porém, em condições otimizadas de cultivo, ou com uso de engenharia genética, pode-se atingir acúmulos acima de 90% da massa bacteriana (KIM et al., 1992; MADISON e HUISMAN, 1999).

2.2.2 Características dos PHAs

Os PHAs compartilham diferentes propriedades, de acordo com sua composição monomérica. Eles são substâncias lipofílicas, e dentro da célula encontram-se como inclusões insolúveis. São polímeros termoplásticos ou elastoméricos, exibindo um grau de polimerização de até 30.000, confirmado pelas altas massas molares. Com o aumento no comprimento da cadeia, ou aumento no número de comônômeros em um copolímero, sua elasticidade aumenta.

Duas características físicas são frequentemente apontadas nos trabalhos relacionados com a produção de PHAs: massa molecular e propriedades térmicas. A massa molecular e a distribuição de massas moleculares de um polímero constituem-se características importantes para a sua adequação comercial (SIM et al., 1997). No caso do P(3HB), polímeros com peso molecular inferior a 4×10^5 Da apresentam suas propriedades mecânicas deterioradas (TAIDI

et al., 1995). As propriedades térmicas de um polímero (T_m - Temperatura de fusão, T_g - temperatura de transição vítrea), além de propriedades como cristalinidade e tempo de cristalização, definem algumas propriedades mecânicas do material à temperatura ambiente, sendo também parâmetros úteis para o processamento térmico do material (GOMES, 2000).

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

Tabela 2.2 - Comparação entre as propriedades físicas e térmicas dos vários PHAs e do polipropileno.

Propriedades	P(3HB)	P(HB-HV)^b	PHO^c	Polipropileno
Ponto de fusão (°C)	175	145	61	176
Cristalinidade (%)	80	40	30	70
Tensão de cisalhamento (Mpa)	40	32	10	38
Resistência à Ruptura (%)	6	-	300	400

^(a) Dados adaptados de (Holmes, 1988; Gagnon, et al., 1992; King, 1982).

^(b) P(HB-HV) copolímero contendo 20 mol % C5 e 80 mol % C4 monômeros.

^(c) PHO copolímero contendo 4 mol % C10, 86 mol % C8 e 10 mol % C6 monômeros.

FONTE: POIRIER 1995.

Os PHAs mais comuns são polímeros semicristalinos. O grau de cristalinidade depende da composição do polímero: sendo 60-80% para o P(3HB) e decrescendo para 30-40% para o copolímero cujo conteúdo em unidades HV é de 30% (mol/mol) (SERAFIM et al., 2003). As propriedades mecânicas do P(3HB), incluindo Módulo de Young e tensão de cisalhamento, são similares às do polipropileno (PP). O P(3HB) possui resistência aos raios UV superior ao polipropileno e excelente impermeabilidade ao oxigênio (HOLMES, 1985).

Os polímeros PHA_{MSC} têm menor nível de cristalinidade e são mais elásticos, tendo aplicações potencialmente diferentes dos PHA_{SSC} (MADISON e HUISMAN, 1999).

Assim, PHAs poderão se constituir, no futuro, em polímeros feitos sob medida para diferentes aplicações. As propriedades de PHAs permitem a obtenção desde materiais rígidos, como o P(3HB), a materiais flexíveis, como PHA_{MCL}.

2.2.3 Histórico dos PHAs

- O relato da primeira observação de polihidroxicanoatos, foi no início do século XX (Meyer, 1903). Estes apareceram acumulados em bactérias *Azotobacter chroococcum*, na forma de inclusões lipídicas solúveis em clorofórmio (STAPP, 1924).
- Em 1923, o microbiologista Maurice Lemoigne fez a primeira determinação da composição de PHAs em *Bacillus megaterium* onde a degradação de um material desconhecido levava à excreção de ácido 3-hidroxi-butírico (LEMOIGNE, 1926).
- Em 1958, MACRE e WILKINSON, observaram que *Bacillus megaterium* estocava homopolímero quando a razão das fontes de glicose/nitrogênio no meio estava alta.
- 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 (HOLMES, 1985).
- Na seqüência desses estudos, que se intensificaram para o entendimento das funções do P(3HB) no metabolismo das células produtoras, foi publicada a primeira revisão científica sobre esse biopolímero, comparando a sua função à da gordura nos seres humanos (DAWES e SENIOR, 1973). Até aquele momento, P(3HB) era o único membro conhecido da família dos polihidroxicanoatos, cuja unidade monomérica hidroxicanoatos (HA) tinha sido identificada.
- Em 1974, foi publicada a identificação de outras unidades HA (Wallen e Rohwedder, 1974), dentre elas, a unidade 3HV (3-hidroxi-valerato). Cerca de uma década depois, outras 11 unidades monoméricas haviam sido identificadas (FINDLAY e WHITE, 1983).
- Em 1976, a empresa inglesa ICI-Imperial Chemical Industries iniciou estudos sobre a produção e desenvolvimento de aplicações para o P(3HB). Outra importante descoberta da ICI foi que com a incorporação de unidades 3 HV era possível

modular gradativamente as propriedades físicas e mecânicas do polímero produzido, permitindo, deste modo, ampliar o campo de aplicações possíveis. Iniciando assim a produção de PHAs, com a comercialização do homopolímero P(3HB), bem como copolímeros de poli(3-hidroxi butirato-*co*-3-hidroxi valerato) (P(3HB-*co*-3HV)) com o nome comercial de Biopol[®](BYROM, 1990).

- Em 1990, foi lançado na Alemanha, o primeiro produto obtido a partir de PHA, uma embalagem de “shampoo” de uma indústria de cosméticos (SUDESH et al., 2000).
- Em 1996, a empresa Monsanto adquiriu o processo de produção do BIOPOL.
- A Metabolix, Inc. em maio de 2001, comprou o processo de fabricação do BIOPOL da Monsanto, reiniciando sua produção (METABOLIX, 2001).
- A partir de 1991, começaram as pesquisas para produção de P(3HB) através de processos fermentativos no Brasil.
- Em 1992, a Cooperativa dos Produtores de cana de açúcar e Álcool do estado de São Paulo (Coopersucar), o Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) e o Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) estabeleceram um protocolo de cooperação técnica, com o propósito de desenvolver pesquisas para a produção de P(3HB).
- Em 1993, a Coopersucar construiu uma unidade piloto na Usina da Pedra, no município de Serrana (SP), para estudo e produção de P(3HB).
- Em 1997, a Coopersucar estabeleceu parceria com diversos processadores de plásticos e instituições, de pesquisa e desenvolvimento.
- Em 2000, teve início à produção de P(3HB) pela então indústria brasileira PHB Industrial SA.

2.2.4 Poli(3-hidroxi butirato) P(3HB)

O poli(3-hidroxi butirato) constituído por monômeros de 3-hidroxi butirato, é o PHA mais bem caracterizado e o acumulado com maior frequência por bactérias (MADIGAN et al., 2000). O P(3HB) é produzido através de culturas bacterianas, com predominância de

utilização da bactéria *Raltonia eutropha*. A biossíntese deste polímero permite um processo cíclico sustentável através de fontes renováveis. O P(3HB) e seus copolímeros são poliésteres biodegradáveis sendo totalmente degradado a CO₂ e água por uma enorme quantidade de fungos e bactérias.

A degradação de P(3HB) produz o ácido 3-hidroxi-butírico, que é constituinte normal do sangue humano. Estudos com este ácido, obtido da hidrólise do P(3HB), mostraram que o mesmo pode ser usado como um suprimento de carbono intravenoso ou oral, com vantagens sobre a glicose (ASRAR e HILL, 2000).

O P(3HB) é um termoplástico altamente cristalino, duro e quebradiço, lembrando o poliestireno (PS) ou o poli(cloreto de vinila) (PVC) não-plastificado. Suas propriedades físicas são freqüentemente comparadas às do polipropileno, por possuir ponto de fusão, grau de cristalinidade e temperatura de transição vítrea similares. Entretanto, a baixa processabilidade, o elevado grau de cristalinidade e fragilidade do P(3HB) limitam suas aplicações (ZHANG et al., 2000). A utilização do P(3HB) como um polímero de engenharia também é dificultada pelo fato de apresentar uma forte tendência ao envelhecimento, manifestado pelo aparecimento de trincas no interior de seus cristais, e possuir uma grande suscetibilidade à degradação térmica o que limita suas aplicações. http://www.ima.ufrj.br/linhaspes/recicl_pet_alex.htm.

Vários estudos importantes têm sido realizados na tentativa de reduzir a fragilidade desse material. Alguns desses estudos baseiam-se na obtenção de copolímeros com unidades de hidroxivalerato, que apresentam menor cristalinidade e melhores propriedades mecânicas que o P(3HB). Outros estudos baseiam-se na mistura física com diversos outros polímeros biodegradáveis e sintéticos. Como visto anteriormente o P(3HB) não é o único plástico biodegradável disponível no mercado. Hoje, existem quatro classes diferentes deles, nenhum, no entanto, tão bom no quesito biodegradabilidade quanto o P(3HB).

2.3 Organismos Produtores de PHAs

A seleção do microrganismo e do substrato tem grande influência nos custos de produção dos PHAs (ANDERSON & DAWES, 1990). Mesmo existindo mais de 300 microrganismos diferentes produtores de PHAs, apenas alguns podem ser utilizados para a produção em escala industrial. É necessário que as cepas produtoras tenham uma velocidade específica de crescimento e produção de PHA elevados e que possam utilizar substratos de

baixo custo, além de apresentarem uma porcentagem elevada de PHA em relação à massa total seca e um fator de conversão de substrato em PHA (RAMSAY,1994 a). Para que o processo seja economicamente viável é necessário que a cepa produtora seja capaz de acumular ao menos 60% de sua massa celular seca em polímero.

Este critério elimina da seleção todas as bactérias Gram-positivas e aquelas que não são capazes de acumular porcentagens elevadas de polímero (RAMSAY et al., 1990a).

Bactérias produtoras de PHAs possuem dois comportamentos distintos. O primeiro é em relação ao comprimento da cadeia carbônica do monômero inserido. Assim, *R. eutropha* e *Rhodococcus* sp. são capazes de inserir em seus polímeros monômeros de cadeia curta (3 a 5 e raramente 6 carbonos). Por outro lado, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas oleovorans* são capazes de inserir monômeros de cadeia média (6 a 12 carbonos). O outro comportamento diz respeito à capacidade ou não de sintetizar polímeros contendo monômeros diferentes de 3HB, sem a necessidade de serem supridas com um precursor. Deste modo, *Rhodococcus* sp. e *P. aeruginosa* são capazes de sintetizar monômeros diferentes de 3-HB e inserí-los em seus polímeros, a partir de substratos que não estão relacionados estruturalmente ao monômero inserido (GOMES, 1997).

As bactérias que apresentam as características mais favoráveis para uma produção em escala industrial são *Azotobacter vinelandii*, *Alcaligenes latus*, algumas espécies de metilotróficos e alguns microrganismos recombinantes como *R. eutropha* recombinante, *Escherichia coli* recombinante e *Klebsiella aerogenes* recombinante (LEE, 1996 b), essencialmente pela grande variedade de substratos que eles podem utilizar.

Recentemente, a bactéria Gram-negativa designada de *Burkholderia sacchari* sp. ou IPT 101 foi isolada do solo de plantação de cana de açúcar. IPT 101 é capaz de acumular até 68% da biomassa seca em poli(3-hidroxibutirato) utilizando como a fonte de carbono exclusivamente a sacarose e até 65±9 % de biomassa seca poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) utilizando como fonte de carbono glicose e ácido de propiônico como substrato de precursor (GOMEZ, et al., 1996, 1997, SILVA, et al., 2000).

YABUUCHI et al., em (1995), propôs, a partir da caracterização fenotípica, das análises de lipídeos e ácidos graxos e de análises filogenéticas, a mudança de *Alcaligenes eutrophus* para *Ralstonia eutropha*). Por possuir elevado rendimento e velocidade de produção este tem sido o microrganismo o mais utilizado na produção industrial de polímero (RAMSAY et al., 1990).

2.4 *Ralstonia eutropha* (atualmente *Cupriavidus necator*)

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

É uma bactéria gram-negativa, aeróbia, quimiolitotrófica facultativa, encontrada naturalmente no solo e na água. Essa espécie apresenta células na forma de bastonetes, com dimensões de 0,5 por 1,8 a 2,6 μm , é móvel e possui de 1 a 4 flagelos peritríquios. Na fase estacionária de crescimento, ou seja, no acúmulo de polímero, as células podem se tornar esféricas (BRAUNEGG et al., 1998). A Figura 2.8 mostra a evolução do crescimento e de acúmulo de polímero P(3HB) ao longo de 24h de cultivo.

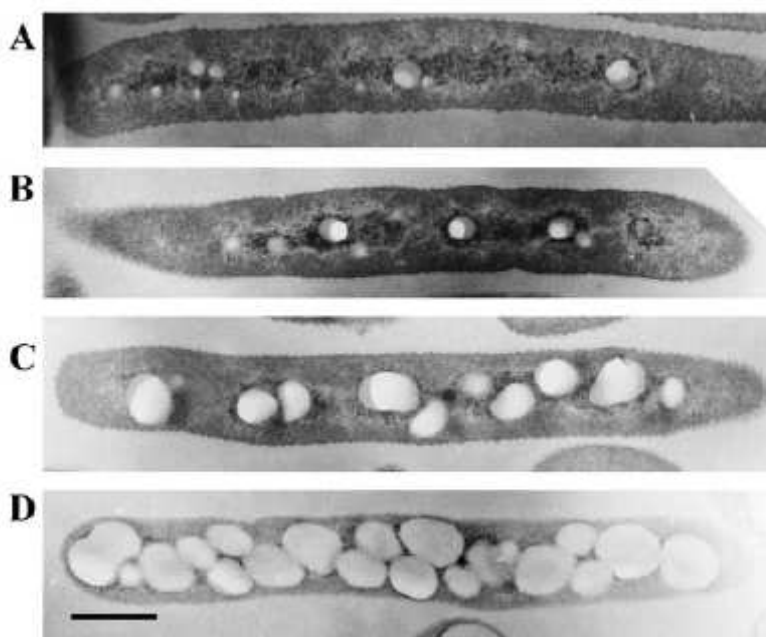


Figura 2.8 - Imagens microscópicas de elétron de transmissão (TEM) de *R. eutropha* na produção de P(3HB) a 2,5 h (A), 5 h (B), 9 h (C) e 24 h (D), mostrando o “desaparecimento” dos elementos de mediação escuro-manchados dando espaço aos grânulos intracelulares de P(3HB). O tamanho final após 24h é de 0,5 μm .

Fonte: TIAN, 2005.

A temperatura ótima de crescimento relatada na literatura é de 30°C podendo crescer autotroficamente em atmosfera de gases contendo H_2 , O_2 e CO_2 (TANAKA et al., 1994). Segundo REPASKE (1962), um pH ótimo para o crescimento e produção de P(3HB) é

aproximadamente 6,9, e em pH de 5,4 há inibição no crescimento.

O acúmulo de PHA, na forma de grânulos, em *Ralstonia eutropha*, geralmente ocorre quando existe excesso de fonte carbônica e limitação de algum nutriente essencial à sua multiplicação. Esta síntese ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, procura-se favorecer ao máximo o crescimento celular e assegurar, ao mesmo tempo, que a síntese do polímero seja a menor possível. Na segunda etapa, o processo é feito inversamente, interrompe-se o crescimento celular e estimula-se ao máximo o acúmulo do polímero no interior da célula (Figura 2.9) (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997). O biopolímero pode sofrer degradação intracelular que ocorre, via de regra, em condições de cultura opostas àquelas onde observa-se o seu acúmulo, ou seja, em situações onde haja pouca disponibilidade da fonte de carbono, e não haja limitação de outras necessidades nutricionais.

Este microrganismo tem também como característica importante, do ponto de vista biotecnológico, a produção de PHAs relacionada à fonte de carbono utilizada para seu crescimento. Isto porque a via de degradação dos carboidratos (via Entner-Doudoroff), mais frequentemente utilizados por *R. eutropha*, leva à formação de piruvato, o qual é oxidativamente descarboxilado a acetil coenzima A (acetil-CoA). Assim, o monômero predominante encontrado em *R. eutropha* é o poli-3-hidroxi-butirato (P(3HB)), uma vez que é sintetizado a partir de acetil-CoA (BRAUNEGG et al., 1998).

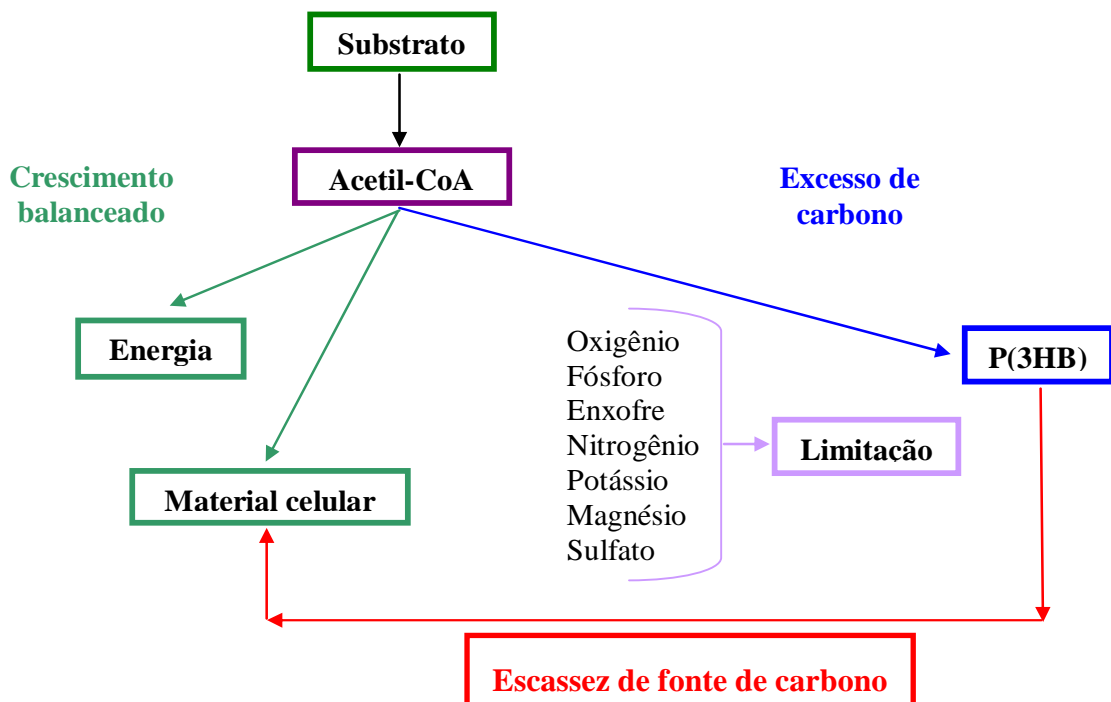


Figura 2.9 - Produtos do acetil-CoA em condições de crescimento balanceado e de excesso e escassez de carbono apresentado por SQUIO, (2003).

2.5 Metabolismo em *Ralstonia eutropha* - Síntese do P(3HB)

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

A enzima 3- β -cetotiolase condensa, reversivelmente, 2 moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA. O produto é então reduzido pela redutase NADPH-dependente a D(-)-3-hidroxybutiril-CoA, que se liga a uma cadeia em crescimento de P(3HB) pela PHA-sintase. A rota de produção e degradação de P(3HB) é intracelular por *R. eutropha* podendo ser melhor visualizada na Figura 2.10. (GOMES, 2000).

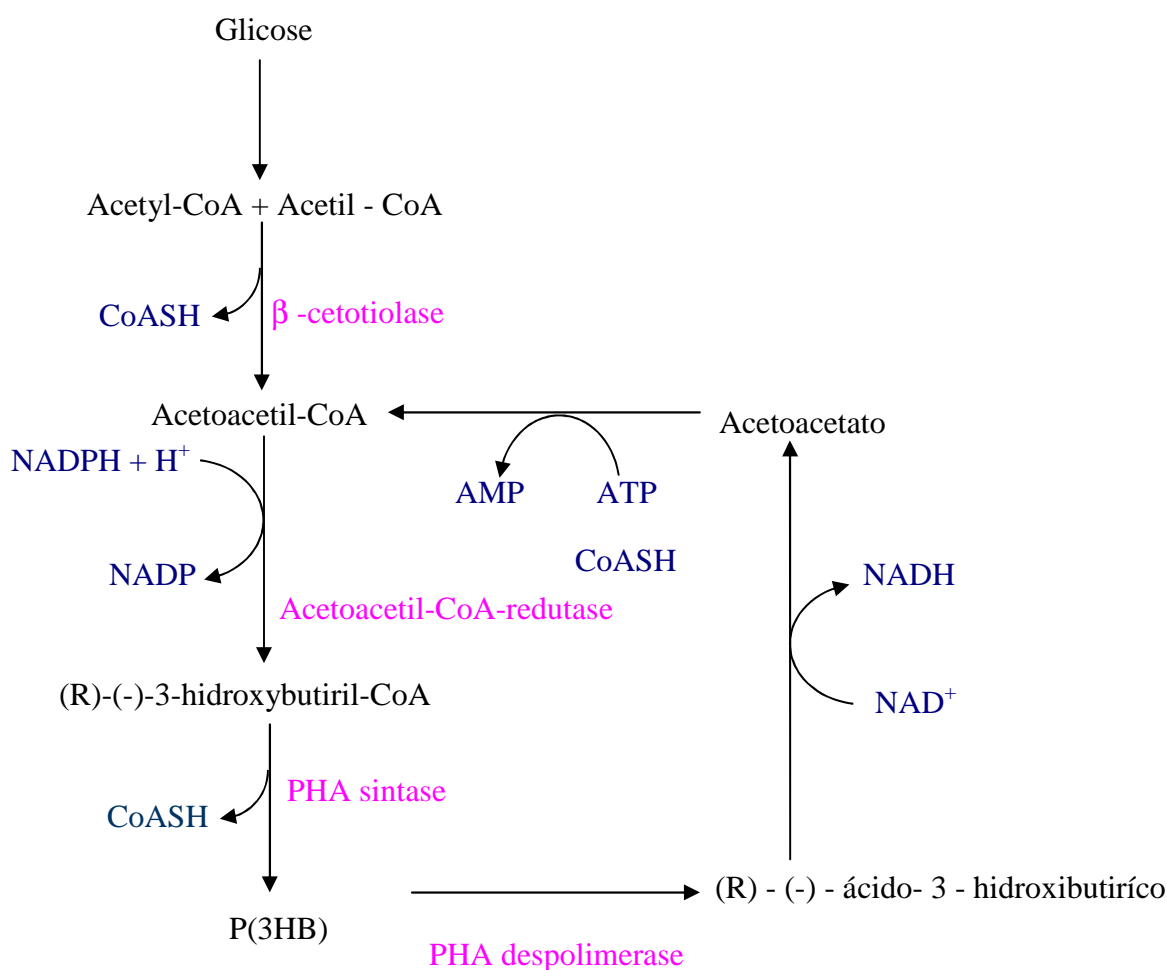


Figura 2.10 - Síntese de P(3HB) a partir de acetil-CoA em *Ralstonia eutropha*.

Fonte: Tecnologia e informação a serviço da sociedade . Plásticos Biodegradáveis. Disponível em:

http://www.cetesb.sp.gov.br/noticentro/2007/08/maria_filomena.pdf

2.6 Biodegradação

A biodegradação ou degradação biológica compreende as alterações de sistemas poliméricos pela ação de microrganismos, tais como fungos e bactérias (REICH e STIVA 1971). Uma das principais características que torna os PHAs atrativos comercialmente é sua biodegradabilidade em ambientes naturais, determinada pela atividade enzimática dos microrganismos presentes.

Os microrganismos, principais envolvidos neste processo, possuem enzimas extracelulares, como as depolimerases e hidrolases. Elas 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.

Os PHAs podem ser degradados tanto intracelularmente, por meio de depolimerases intracelulares, como extracelularmente. No entanto, a taxa de degradação intracelular de P(3HB) é cerca de 10 vezes menor do que sua taxa de síntese (SUDESH et al., 2000).

A velocidade de biodegradação dos PHAs é função de vários fatores, como população microbiana presente no ambiente, temperatura, umidade, pH, nutrientes presentes no meio, cristalinidade, aditivos e área superficial dos polímeros. Estes polímeros são sólidos insolúveis em água, enquanto as depolimerases são enzimas solúveis; por isso, a degradação acontece através de uma reação heterogênea em duas etapas. A primeira é a de adsorção da enzima na superfície do polímero; a segunda, a de hidrólise das cadeias poliméricas, pelo sítio ativo da enzima. A hidrólise sempre ocorre em uma superfície reacional, entre as enzimas adsorvidas e sítios de adsorção livres (KHANNA e SRIVASTAVA, 2004).

Os PHAs são degradados tanto em sistemas aeróbios quanto anaeróbios. A degradação ocorre mais rapidamente em despejos anaeróbicos e mais lentamente no mar. Durante o processo de degradação não ocorre a produção de intermediários tóxicos (LUZIER, 1992).

A Tabela 2.3 apresenta o tempo para biodegradação de um filme de 1 mm P(3HB-co-3HV) em diferentes ambientes.

Tabela 2.3 - Tempo de biodegradação de um filme de 1mm de P(3HB-co-3HV) em diferentes ambientes

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

FONTE: LUZIER, 1992.

A Figura 2.11 apresenta o biociclo de produção e degradação de PHAs. Onde, através da fotossíntese, as plantas fazem uso da luz solar e convertem o CO₂ e água para produzir carboidratos. Na forma de carboidratos simples estes são utilizados como matéria prima em um processo fermentativo com o microrganismo específico para a produção de PHAs. Depois de utilizados os PHAs podem ser depositados em ambientes microbianos ativos e a biodegradação do polímero fornecerá água e CO₂. Uma rota direta pela produção de plantas pode também ser obtida.

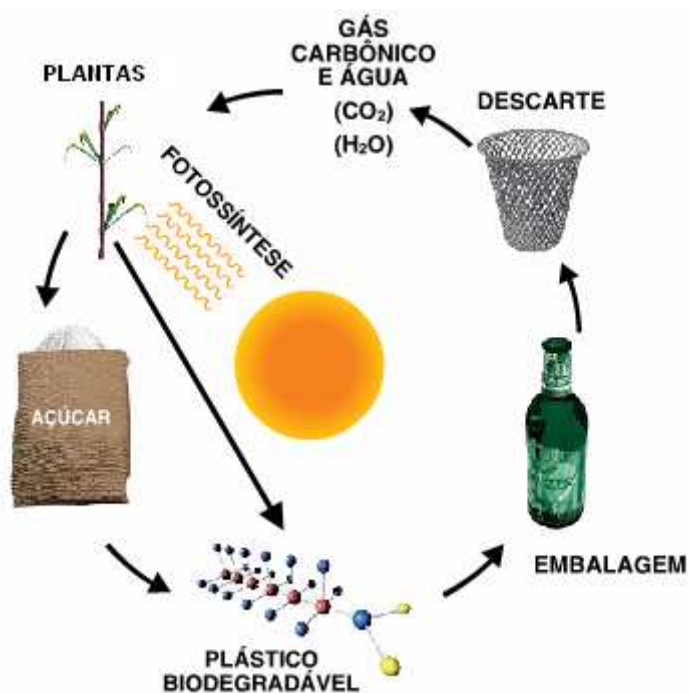


Figura 2.11 - Ciclo da biodegradação de um material de fonte renovável e biodegradável.
 Fonte: Apresentação Biocycle Ciclo da Vida - disponível em: <http://www.biocycle.com.br/site.htm>

Dessa forma, a biodegradabilidade é nada mais que um processo catabólico (BRAUNEGG et al., 1998).

A Figura 2.12 mostra garrafas de poli(3-hidroxi-bu-tirato) cujo nome comercial é Biopol, é termoplástico e compostável, produzido por bactérias alimentadas com açúcar de uva.



Figura 2.12 - Régua produzida a partir de P(3HB) em processo de biodegradação.

Fonte: Tecnologia e informação a serviço da sociedade . Plásticos Biodegradáveis. Disponível em:

http://www.cetesb.sp.gov.br/noticentro/2007/08/maria_filomena.pdf



Figura 2.13 - Corpo de prova produzido com P(3HB) em decomposição em fossa séptica.

Fonte: Tecnologia e informação a serviço da sociedade . Plásticos Biodegradáveis. Disponível em:

http://www.cetesb.sp.gov.br/noticentro/2007/08/maria_filomena.pdf

O preço e o desempenho de um determinado material são aspectos fundamentais para a sua utilização comercial. O desempenho corresponde às características apresentadas pelo material, que podem ou não representar vantagem para uma dada aplicação, quando comparadas aos outros materiais concorrentes.

Embora diversos fatores interfiram no preço final de um material ou produto final, de uma forma simplista pode-se afirmar que o preço de mercado corresponde a quanto se aceita pagar por um produto com um determinado desempenho. Os PHAs apresentam características de desempenho que os tornam materiais importantes para certas aplicações especializadas: biodegradabilidade e biocompatibilidade (GOMES, 2000).

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 mais do que cinco vezes mais caros que os polímeros petroquímicos, como polietileno e polipropileno, cujo preço, por quilo, varia entre US\$ 1,40 e US\$ 1,72 (CHEMICAL MARKET REPORTER, 2005). Um esforço tem sido feito, no sentido de reduzir o custo dos PHAs, através do isolamento de melhores cepas bacterianas e do desenvolvimento de processos de cultivo e recuperação mais eficientes (LEE et al., 1999). De fato, os custos no processo com a fonte de carbono e a recuperação do polímero são os dois maiores fatores responsáveis pelo elevado preço dos PHAs.

Vários autores têm considerado que reduções expressivas no custo de PHAs poderão ser obtidas com a produção de microrganismos recombinantes, substratos de menor valor agregado, métodos mais eficientes de extração e recuperação, podendo atingir valores que permitiram a competição direta com polímeros de origem petroquímica (CHOI e LEE, 1999; REDDY et al., 2003; SALEHIZADEH e LOOSDRECHT, 2004).

2.7 Custo com fonte de carbono

Do ponto de vista econômico, o custo com substrato contribui significativamente para o custo total do processo, podendo atingir até 40% do custo total (KIM, 2000). Para reduzir os custos com substrato, várias cepas recombinantes, capazes de utilizar fontes de carbono baratas, e o emprego de estratégias de cultivo eficientes vêm sendo utilizadas (LEE et al., 1999). Como fontes de nutrientes de baixo custo já utilizadas tem-se melaços de cana e beterraba, soro de leite, óleos vegetais, hidrolisados de amido e caseína (LIU et al., 1998),

xarope de tâmaras (OMAR et al., 2001), xilose (RAMSAY et al., 1995) e melão cítrico (FIORESE, 2004), entre vários outros.

2.8 Culturas em alta densidade

Culturas com alta densidade de células apresentam vantagens como alta concentração de produto, maior produtividade e redução dos custos de recuperação do polímero (Squio e Aragão 2004). A alta concentração celular é, muitas vezes, uma exigência, em diferentes processos biológicos, para justificar a sua viabilidade econômica.

A literatura tem apresentado diferentes estudos relacionados à alta densidade celular. Choi & Lee (1999) demonstraram em seus estudos que aproximadamente 40% do custo de produção de P(3HB) está relacionado ao custo da fonte de carbono utilizada, e o restante à otimização do processo. Para que haja viabilidade econômica na produção, existe a necessidade de se conseguir um processo que atinja alta densidade celular (acima de 80 g/L), com alto teor de biopolímero intracelular (acima de 60% da biomassa) e alta produtividade de polímero, acima de 1 g/Lh (LEE et al., 1997).

Choi et al. (1998) estudaram a produção de P(3HB) por *E. coli* recombinante XL1-Blue(pJC4) contendo genes de biossíntese de PHA de *A. latus*. A cultura foi realizada em batelada alimentada com glicose como fonte de carbono. Ao final, foram obtidos 194,1 g/L de concentração de biomassa, 141,6 g/L de P(3HB), correspondendo a 73% de polímero, com alta produtividade de 4,63 g/L h. Assim, os autores relataram que *E. coli* recombinante pode ser usada para produção de P(3HB), com alto nível de competitividade econômica.

Piccoli et al. (1994) propuseram um cultivo de *A. eutrophus* composto de duas etapas: a primeira, caracterizada por excesso da fonte de carbono (sacarose invertida) e outros nutrientes essenciais, através de bateladas sucessivas, resultando em um crescimento celular exponencial com velocidade específica máxima de crescimento de 0,32 h⁻¹, 25,8 g/L de biomassa, com baixo teor de polímero (6%) e produtividade em célula de 4,4 g/L h. Uma segunda etapa, consistia de uma batelada alimentada com vazão constante e limitação na fonte de carbono, procurando manter a produtividade máxima em células e oxigênio dissolvido acima de 15% da saturação. O resultado global levou à produção de 80,5 g/L de biomassa com 3,5% de polímero e produtividade em células de 3,1 g/L h.

Culturas de *A. eutrophus* NCIMB 11599 em fermentador de 60 L, regime de batelada alimentada com alta densidade de células, foram estudadas por Ryu et al. (1997). Eles utilizaram limitação em fosfato e controlaram a concentração de glicose, que ficou entre 0 – 20 g/L, pela concentração de oxigênio dissolvido. Investigaram também o efeito da concentração inicial de fosfato na produção do polímero. Em todos os casos, o teor final de P(3HB) obtido foi de 80% do peso seco celular. Entretanto, a cultura com maior concentração de fosfato inicial, 5,5 g/L, foi a que produziu maior concentração de biomassa e de P(3HB), resultando em 281 g/L de biomassa e 232 g/L de P(3HB) com produtividade de 3,14 g/L.h, em 75 h. Dessa forma, os autores mostraram que a quantidade de células e P(3HB) produzida pode ser maior com o aumento da concentração inicial de fosfato.

2.9 Utilização da Modelagem Matemática como ferramenta no estudo do crescimento de P(3HB)

A modelagem matemática do crescimento microbiano tem sido utilizada para estimar parâmetros (velocidade específica de crescimento e tempo de fase lag) necessários para o estudo do crescimento de microrganismos sob diferentes condições físicas e químicas, formular apropriados meios microbiológicos ou construir modelos preditivos para uso em microbiologia de alimentos (LÓPEZ et al., 2004).

Um modelo matemático é um conjunto de suposições, algumas das quais podem ser formuladas por equações que descrevem relações matemáticas entre as variáveis definidas. Estes modelos podem ser aplicados em vários níveis. Um modelo de nível primário é uma equação ou função que é usada para descrever a resposta microbiana contra o tempo com um conjunto característico de parâmetros (WHITING, 1995; MCMEEKIN e ROSS, 2002). A resposta microbiana geralmente é expressa em termos do número de microrganismos (concentração de unidades formadoras de colônia), massa celular seca (concentração de biomassa) ou densidade ótica como uma medida indireta (DALGAARD e KOUTSOUMANIS, 2001).

Segundo Baranyi e Roberts (1994), o objetivo dos modelos preditivos no processamento de alimentos é minimizar ou prevenir o crescimento microbiano e não otimizá-lo, como em bioprocessos. Geralmente, a informação das características do meio é menor e menos exata que num biorreator, e os modelos são matematicamente mais simples e com maior conteúdo empírico. Embora os autores considerem que estes modelos não apresentem aplicação prática para Engenharia Bioquímica, o conhecimento ou “previsão” do

crescimento microbiano pode ser fundamental para o estabelecimento de estratégias de cultura, em especial para a produção de PHAs, que ocorre durante a fase de crescimento limitado. Além disso, pesquisas vêm sendo realizadas com a utilização de modelos primários para a determinação de parâmetros cinéticos de culturas em batelada (TOBAJAS e GARCIA-CALVO, 2000; ERKMEN e ALBEN, 2002; WACHENHEIM et al., 2003).

O processo de modelagem depende de técnicas de regressão matemática, conseqüentemente, um critério padrão para a análise de regressão deve ser levado em consideração, incluindo distribuições normais e variâncias homogêneas. O procedimento para desenvolver um modelo deve incluir as seguintes considerações (WHITING, 1995):

- Exatidão do ajuste
- Habilidade de prever combinações de fatores não testados
- Incorporação de todos os fatores relevantes
- Possuir um número mínimo de parâmetros para facilitar o uso
- Especificação do termo de erro
- Os parâmetros devem conter significado biológico e valores realísticos
- Reparametrização se isso melhorar as propriedades estatísticas

Os modelos primários descrevem mudanças no número de microrganismos ou nas respostas microbianas (duração da fase lag, velocidade específica máxima de crescimento e aumento logarítmico da população) com o tempo, num ambiente específico. Uma equação ou função matemática descreve a mudança da resposta com o tempo, fornecendo um grupo característico de valores dos parâmetros.

Exemplos de modelos primários são: o modelo de primeira ordem de Monod (LABUZA & FU, 1993), o modelo logístico, o modelo de Schunute (ZWIETERING et al., 1990), o modelo de Boltzman (ERKMEN & ALBEN, 2002), o modelo de inativação térmica de primeira ordem (WHITING, 1995) e os modelos de Baranyi e Roberts de Gompertz, que são os mais utilizados (BUCHANAN et al., 1997).

Os modelos secundários indicam como os parâmetros dos modelos primários mudam com fatores ambientais como temperatura, pH e atividade de água, entre outros (WHITING, 1995). Muitos modelos secundários têm sido propostos na literatura, como os modelos polinomiais ou metodologia de superfície de resposta, Weibull, Linear, equação de Arrhenius, modelo da raiz quadrada ou de Ratkowsky entre outros (SCHAFFNER & LABUZA, 1997; WHITING, 1995; McMEEKIN & ROSS, 2002; DAVEY & DAUGHTRY, 1995).

Muitos pesquisadores estudaram, através de modelos computacionais baseados em transferência de calor e estimativas de crescimento microbiano, o efeito da temperatura na estabilidade microbiana (GIANNUZZI et al., 1998). O modelo da raiz quadrada, proposto por RATKOWSKY et al. (1983), pode ser citado como exemplo de um modelo que descreve a influência da temperatura na velocidade de crescimento específico. Em 1991, Zwietering et al., modificaram o modelo estendido de Ratkowsky para descrever o efeito da temperatura na fase lag. O efeito de flutuações da temperatura na fase lag e na velocidade específica de crescimento, em meio líquido, também foi estudado por Li & Torres (1993).

2.10 Técnicas empregadas na Extração, Recuperação e Caracterização de P(3HB)

2.10.1 Extração e recuperação

Estima-se que o impacto do custo de recuperação de PHAs no custo total do processo de produção possa equivaler a até 50% do valor do produto, dependendo de variáveis como o processo de separação empregado e o teor de PHA acumulado na biomassa (SILVA et al., 2007, LEE et al., 1988).

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

Após o cultivo, as células contendo PHAs são separadas por processos convencionais como centrifugação, filtração ou floculação-centrifugação. Em seguida, as células precisam ser rompidas para a recuperação do polímero.

Há vários métodos desenvolvidos para a recuperação desses biopolímeros, a maior parte aplicados à produção de PHAs por *R. eutropha*. A maioria dos processos utiliza solventes orgânicos como clorofórmio, clorometanos e dicloroetano (KESSLER et al., 2001). Pela alta viscosidade de soluções contendo PHA, são necessários grandes quantidades de solvente 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 (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 álcoois, também podem ser usados. Eles rompem o material celular não polimérico, deixando os grânulos de PHAs 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 *debris* (resíduos celulares) e concentrada. O polímero é precipitado com gotejamento em metanol ou etanol, deixando lipídios de baixo massa molecular em solução (BRAUNEGG et al., 1998).

A empresa Zeneca Bioproducts desenvolveu um processo de recuperação envolvendo digestão enzimática, para a produção industrial de P(3HB) e P(3HB-co-3HV (HOLMES e LIM, 1990). Nesse processo, primeiramente as células sofrem um tratamento térmico que provoca a lise das células e desnaturação de ácidos nucleicos que poderiam interferir nos passos subsequentes. Na sequência, são tratadas com uma mistura de várias enzimas hidrolíticas como lisoenzimas, fosfolipases, lecitinases, proteinases entre outras. A maior parte do material celular é hidrolisado por essas enzimas, enquanto o polímero permanece intacto. Após lavagem e floculação, o polímero é recuperado como 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 esse processo (CHOI e LEE, 1999a).

Outro processo que envolve a quebra de material celular não polimérico utiliza soluções alcalinas de hipoclorito de sódio. Os grânulos insolúveis de PHAs são separados da fase aquosa por centrifugação. Esse tipo de extração pode causar danos aos grânulos. Estes danos podem ser diminuídos com o controle das condições de separação, como pH, temperatura e duração do processo. O pré-tratamento das células com surfactantes ajuda a melhorar as características do polímero extraído. 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 (HANH et al., 1994).

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

A PHB Industrial, produtora do P(3HB) no Brasil, desenvolveu um processo de extração, onde são utilizados como solventes álcoois superiores ou seus estéres, preferencialmente como agentes solubilizantes, porém não exclusivamente, o álcool isoamilico, acetato de amilase e o óleo fúsel (subproduto da fermentação do etanol, que contém uma composição variável de álcool isoamilico e álcool n-pentílico).

Segundo a Patente PI 93022312, estes compostos apresentam um ponto de ebulição adequado ao processamento à pressão atmosférica por terem ponto de ebulição abaixo da temperatura de degradação do material polimérico, além disso são imiscíveis, ou parcialmente miscíveis em água, adaptando-se assim perfeitamente à extração do polímero a partir de células úmidas, eliminando o custo com processos de retirada de água (liofilização ou secagem) para posterior extração.

O processo consiste em: o material celular concentrado, previamente seco ou não, é submetido a uma extração com álcoois superiores ou seus esteres, a uma temperatura entre 40°C e o ponto de ebulição do solvente utilizado (no caso de células secas) e ou no ponto de ebulição da mistura formada pelo solvente e a água proveniente do concentrado celular até o ponto de ebulição do solvente (no caso de células úmidas), em seguida o resíduo celular é separado por métodos convencionais (centrifugação, filtração ou flotação) obtendo-se uma torta de material não P(3HB) e uma solução contendo o polímero.

Esta solução contendo o P(3HB) passa por uma etapa de cristalização que se caracteriza pela insolubilização do polímero no solvente sem a presença de um agente insolubilizante. A cristalização pode ocorrer por concentração da solução ou por evaporação. Em ambos os casos, o polímero se solidifica, podendo assim ser recuperado por separação mecânica convencional. A solução separada pode ser reciclada e devolvida à etapa de extração. Em um dos exemplos expostos na Patente, foi obtido a partir de 10g de célula úmida com conteúdo de P(3HB) variando de 50-80% , 4 g do polímero após extração com álcool isoamilico durante 5 horas

A MONSANTO COMPANY desenvolveu um processo de extração de P(3HB) (Patente EP 0145233), que descreve várias possibilidades para proceder a digestão de uma suspensão aquosa de células contendo P(3HB), usando enzimas e ou agentes surfactantes para solubilizar o material celular não polimérico. A suspensão é aquecida previamente, ou durante a digestão, a cerca de 80°C para desnaturar os ácidos nucleicos. Esta patente coloca como possíveis restrições a grande quantidade de solvente utilizado no processo e os elevados custos de recuperação. Entretanto, a patente menciona que a etapa de extração por solvente não é eliminada, pois o produto direto da digestão tem sua utilização limitada. Além disso, as enzimas proteolíticas, embora sejam adicionadas em quantidades mínimas (1% da massa seca de células), têm um custo elevado e não são recuperadas.

Outros métodos envolvem o uso de hipoclorito de sódio para a digestão do material celular não-PHA. Entretanto, durante esta digestão há grande degradação de P(3HB), podendo resultar em 50% de redução do peso molecular. Porém, o uso de hipoclorito de sódio, juntamente com surfactante reduz significativamente esta degradação. Normalmente, obtém-se um polímero com pureza maior que 95% a partir deste processo (LEE, 1996a).

Choi e Lee (1999a) 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.

Até o momento atual, os métodos de produção e recuperação de P(3HB) conhecidos, têm-se mostrado não econômicos, por utilizarem quantidades extremamente grandes de solvente durante o processo de extração e precipitação do P(3HB), o que torna esses processos complexos e caros demais, em adição a isto, os solventes só podem ser reciclados por métodos conhecidos e caros, os métodos de regeneração muitas vezes são ineficientes quando o solvente possui baixo ponto de ebulição, ou são miscíveis em água ou formam misturas azotrópicas tendo que ser separados por destilação ou outros mecanismos complexos (LAFFERTY e HEINZLE, 1979).

Em muitos processos, a massa celular que contém o polímero acaba tendo que sofrer um processo de secagem ou liofilização para, somente depois, ser extraída, o que encare-se o processo. Além disso, até o momento, a maioria dos solventes utilizados para precipitar o P(3HB) são prejudiciais à saúde e o uso deles envolve um risco de explosão alto.

Considerando os problemas apresentados acima, o processo da Patente US 4140741 foi desenvolvido. A Patente US 4140741 descreve o processo que utiliza estéres ácidos carbônicos cíclicos (Figura 2.14) como solvente para extração, em particular o carbonato de propileno e carbonato de etileno.

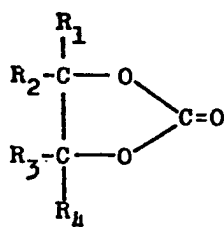


Figura 2.14 – Fórmula estrutural do ester ácido carbônico cíclico.

Fonte: Patente US 4140741, 1979.

Onde R₁, R₂, R₃ e R₄ podem ser iguais ou diferentes, podendo ser um hidrogênio ou um radical alcáli com 1 a 6 átomos de carbono, formando soluções racêmicas ou ópticas ativas com o polihidroxibutirato, de preferência incorporando calor (120-150°C) ao carbonato de etileno ou carbonato de propileno para a extração de P(3HB) de células úmidas ou secas.

Estes solventes têm a vantagem de extraírem P(3HB) através da precipitação, com bom rendimento após o resfriamento. Em adição, os solventes podem ser recirculados podendo ser novamente utilizado nesse passo. Estéres ácidos carbônicos cíclicos também podem ser utilizados como solventes no processamento de P(3HB) com células úmidas, apresentando resultados satisfatórios.

A extração de P(3HB) da massa fermentada depende não somente do solvente, mas também das condições empregadas, podendo levar a um alto grau de despolimerização (degradação) que pode produzir reações indesejáveis durante a extração, alterando o peso molecular de P(3HB). A extração com carbonato de etileno apresenta resultados com maior grau de despolimerização que as extrações com carbonato de propileno.

O processo geral proposto pela Patente **US 4140741 é descrito abaixo.**

A massa celular é separada do caldo nutritivo (meio de cultivo) por decantação, filtração ou centrifugação, sendo, posteriormente, suspensa em ester ácido carbônico cíclico, por exemplo, carbonato de etileno ou carbonato de propileno. A suspensão é aquecida com agitação constante. Esta agitação pode influenciar na velocidade de extração e também no peso molecular do P(3HB) extraído, diminuindo o tempo de extração e adquirindo cadeias mais uniformes outras dependes nessa extração são a temperatura e do tempo de aquecimento da solução que também podem influenciar nas características do polímero extraído e no custo final do processo de extração.

A massa celular extraída deve ser separada a quente por decantação, filtração ou centrifugação. O P(3HB) puro é precipitado mediante resfriamento ou com a adição de água. O solvente utilizado pode ser reciclado e utilizado repetidas vezes em futuras extrações.

O trabalho mais recente em relação à recuperação de P(3HB) por *R. eutropha* foi desenvolvido por Kapritchoff et al., (2005) que testaram diferentes enzimas para a recuperação e purificação do biopolímero. Após o cultivo as células foram tratadas a 85°C por 15 min para desnaturar o material genético e proteínas, e para desestabilizar a membrana externa, depois deste tratamento as células foram centrifugadas por 20 minutos, liofilizadas e mantida a 4°C, contendo 75% de P(3HB). As enzimas testadas foram: chymotripsina bovina; tripsina bovina; bromelina; papaína; lisozima, celulase, pancreatina bovina. O melhor resultado obtido foi utilizando pancreatina a 50°C e pH de 9,0, com obtenção de 90% de P(3HB) puro.

2.10.2 Caracterização de P(3HB)

2.10.2.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é a técnica na qual se mede a diferença de energia fornecida à amostra e a um material de referência, termicamente inerte na faixa de temperatura considerada no equipamento, ou o fluxo de calor entre amostra e referência de modo a se manter as substâncias em condições isotérmicas, uma em relação à outra, enquanto ambas são submetidas a uma variação controlada de temperatura (LUCAS, 2001).

Na análise DSC de fluxo de calor, a propriedade física medida é a temperatura. As cápsulas contendo amostra e referência são posicionadas em um disco de constantan que permite a transferência de calor entre as duas substâncias, de modo que ambas se mantenham sempre em condições isotérmicas uma em relação a outra, independentemente da programação de temperatura a que estão sendo submetidas. Assim, quando a amostra sofre uma transição endotérmica, ocorre transferência de calor da referência para a amostra; quando o evento é exotérmico, o sentido do fluxo de calor é da amostra para a referência. Conforme o calor é transferido através do disco, o fluxo de calor diferencial entre amostras e referência é monitorado por meio da área do suporte de cada uma das plataformas (amostra e referência) que corresponde à junção do termopar com o disco. Os termopares são conectados em série e medem o fluxo de calor diferencial usando o equivalente térmico da lei de Ohm mostrado na Equação abaixo (Eq. 9.1):

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{\Delta T}{R_D} \text{ (Eq 9.1)}$$

onde:

dQ é o fluxo de calor

dt é o intervalo de tempo considerado

ΔT é a diferença de temperatura entre a referência e amostra

R_D é a resistência térmica do disco (constantan, por exemplo).

Alterações de temperatura da amostras ocorrem devido às variações de entalpia endotérmicas ou exotérmicas decorrentes de transições físicas ou de reações químicas. As variações de entalpia são chamadas transições de primeira ordem, como fusão, cristalização, vaporização, solidificação, adsorção. A transição térmica dita de segunda ordem, conhecida como transição vítrea (T_g) são acompanhadas de variação da capacidade calorífica da amostra, juntamente com variações dimensionais e viscoelásticas, mas não apresentam variações de entalpia. Assim sendo, estas transições não geram picos nas curvas de DSC, manifestando-se na forma de uma alteração na linha de base (LUCAS, 2001).

Em amostras de polímeros, a técnica DSC pode ser empregada na medição de temperaturas de transição vítrea, fusão e cristalização; na determinação da cristalinidade, da presença de moléculas de água ligadas, da influência de aditivos sobre as propriedades dos materiais resultantes, na medição de calor específico, no estudo de reações de polimerização e de cura e, ainda, na avaliação da degradação térmica e oxidativa (LUCAS, 2001).

A Figura 2.15 mostra a representação de uma curva de DSC. A orientação dos picos depende da convenção empregada. Normalmente, o DSC de compensação de potência aplica a convenção termodinâmica, segundo a qual os eventos endotérmicos apresentam ΔH positivo, e os exotérmicos, ΔH negativo. Já a maioria dos equipamentos de DSC de fluxo de calor são programados para representar picos endotérmicos no sentido negativo do fluxo de calor (para baixo), e picos exotérmicos no sentido positivo do fluxo de calor (para cima). Assim, para se evitar confusões de interpretação, aconselha-se representar sempre nas curvas o sentido considerado, por meio de uma seta acompanhada dos termos exo ou endo.

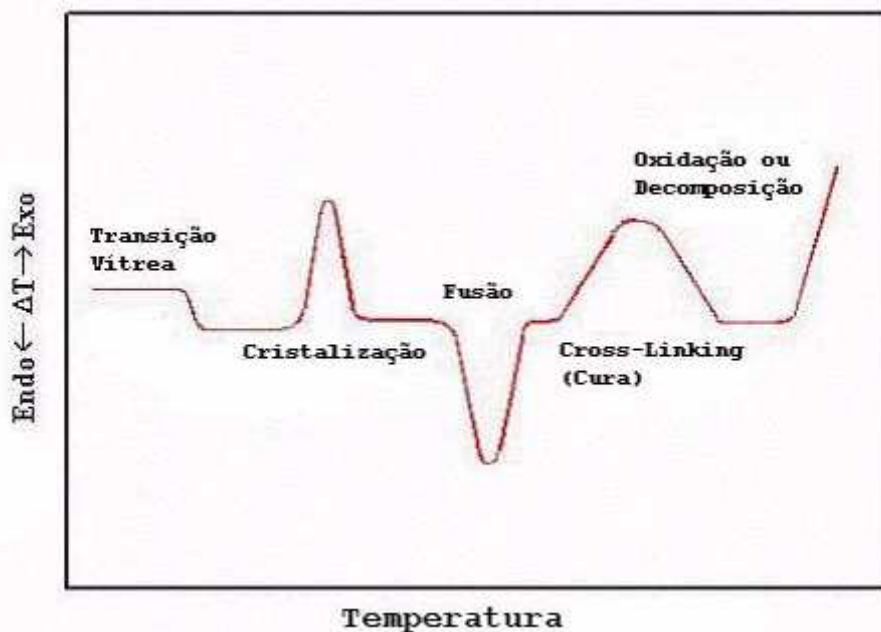


Figura 2.15 - Esquema representativo de uma curva de DSC (LUCAS, 2001).

Uma das características do polímero que modifica 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, apresentando temperatura de transição vítrea (T_g), na qual se inicia o movimento de segmentos da cadeia polimérica. Esta transição não representa 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, 2001).

Devido à distribuição de tamanho das regiões cristalinas, a fusão de um polímero semicristalino ocorre sempre em uma faixa de temperatura e não em um ponto propriamente dito. Os cristais menores fundem primeiro. A temperatura na qual desaparece totalmente a cristalinidade (fusão do último cristal) é tida como ponto de fusão do polímero e corresponde, aproximadamente, ao máximo do pico de fusão na curva de DSC (MOTHÉ et al., 2002). O acompanhamento do processo de fusão permite estudar uma série de fenômenos relacionados à estrutura e às propriedades dos polímeros, tais como: temperatura de fusão, calor de fusão, grau de cristalinidade, identificação de misturas, presença de ramificações, copolimerização, entre outras.

O calor de fusão é a quantidade de energia necessária para transformar um polímero de um estado cristalino ou semicristalino em um estado amorfo completamente desordenado. Estas transformações são características de transições termodinâmicas de primeira ordem. Nas curvas DSC, o calor de fusão pode ser determinado pela área contida sob o pico endotérmico que representa a fusão, relacionando-a com a massa de amostra utilizada.

2.10.2.2 Massa molar dos polímeros

Polímeros são macromoléculas formadas por unidades repetidas, os meros, que são gerados a partir de moléculas simples, os chamados monômeros, em processo conhecido como polimerização. Cadeias são consideradas poliméricas quando a massa molar é superior a 10.000 g/mol (CANEVAROLO, 2003)

Os processos de polimerização são divididos em: polimerização por adição, condensação e abertura de anel. Por se tratar de um polímero natural a síntese do P(3HB) ocorre a partir de processos biológicos como já visto anteriormente no item Biossíntese de P(3HB).

Durante a polimerização dá-se o crescimento independente de cada cadeia polimérica. Isto produz cadeias poliméricas com comprimentos diferentes variando em torno de uma média. Tal fenômeno gera a distribuição da massa molar (DMM) de um polímero (OLIVEIRA, 2004).

A massa molar numérica média (M_n) é definida como sendo a massa molar de todas as cadeias, dividido pelo número total de cadeias formadas, isto é, uma média numérica. Esta massa molar leva em conta mais fortemente o número de cadeias (CALLISTER, 2002).

A massa molar ponderal média (M_w) é definida como sendo a massa molar das cadeias poliméricas pertencentes a cada fração. De outra forma, pode-se dizer que a massa molar de cada fração contribui de maneira ponderada para o cálculo da média total.

Como a massa molar de um polímero é uma variável contínua, sua distribuição de massa molar (DMM) também será constituída por um conjunto de momentos, sendo M_n , o primeiro momento e M_w o segundo momento (ROSEN, 1993). A DMM é mostrada na Figura 2.16.

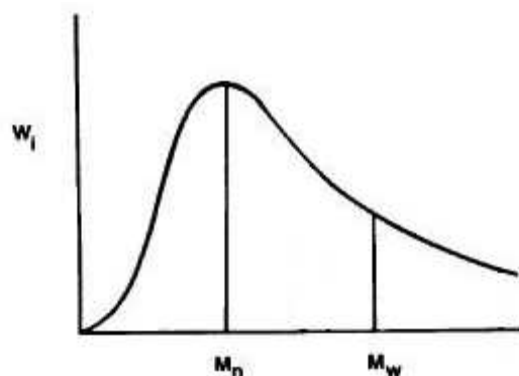


Figura 2.16– Distribuição estatística da massa molar em um polímero (ROSEN , 1993).

A massa molar de polímeros define uma série de propriedades e características deste tipo de material, incluindo a temperatura de transição vítrea. Além disso, polímeros com massa molar mais baixa, por possuir maior mobilidade, cristalizam-se a temperaturas mais baixas do que aqueles dotados de maiores massas molares. Polímeros com baixa massa molar ainda são mais fáceis de serem dissolvidos e, quando em solução, alteram em menor grau a viscosidade dessas. Por fim, polímeros com maiores massas molares apresentam módulo de elasticidade usualmente com valores superiores aos de correspondentes amostras com mais baixas massas molares.

2.10.2.3 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A cromatografia de permeação em gel (GPC), também conhecida como cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) é um dos métodos mais populares de separação e análise de materiais poliméricos. Este método promove uma seletiva e dinâmica distribuição das moléculas do soluto entre duas fases líquidas separadas, dependentes de uma estrutura estacionária contendo poros de tamanho controlado. Entre outros usos, quando aplicada a uma série homóloga de polímeros, como por exemplo proteínas, tendo densidade e formas semelhantes, podem fornecer um método rápido e útil de determinar a massa molar e a forma destas macromoléculas. Esse tipo de cromatografia é também conhecida com os nomes de filtração em gel, permeação em gel, ou cromatografia em peneira molecular de difusão restrita (CANEVAROLO, 2003).

A propriedade que distingue a cromatografia por exclusão, de outros tipos de cromatografia é que o recheio ou gel é constituído de macromoléculas que têm ligações cruzadas, com afinidade pelos solventes, mas que neles são insolúveis. As partículas estacionárias compõem um gel, não carregado, inchado com o mesmo líquido que carrega as substâncias a serem separadas (COLLINS, 1990),

O espaço entre as partículas é ocupado pelo líquido que flui pelo material levando, ou não, as substâncias a serem separadas. O caráter da fase estacionária controla o movimento das substâncias, variando suas velocidades e assim promovendo a separação (MANO, 1985).

A separação das cadeias ocorre quando a solução é bombeada através de uma coluna recheada com gel poroso. É através da escolha desta porosidade que cadeias menores serão excluídas, retidas por esses poros, e as cadeias maiores serão eluídas primeiro, permitindo uma separação contínua das cadeias do polímero com diferentes massas molares. Essa técnica fornece informações sobre as massas molares: numérica, ponderal, e viscosimétrica, além de informar sobre a distribuição de massa molar e o índice de polidispersividade do material (CANEVAROLO, 2003). Este fato pode ser melhor visualizado na ilustração representativa apresentada na Figura 2.17.

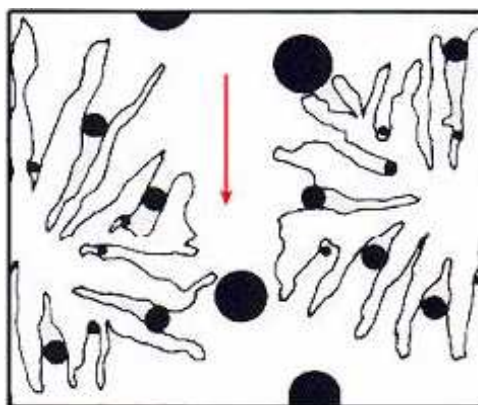


Figura 2.17 - Representação gráfica do princípio de cromatografia por exclusão.

Fonte: (CANEVAROLO, 2003).

Na técnica de exclusão por tamanho, a separação ocorre exclusivamente por tamanho molecular. O recheio das colunas é constituído de partículas contendo poros de diversos tamanhos (LUCAS, 2001). Um esquema representativo do equipamento de cromatografia de exclusão de tamanho é mostrado na Figura 2.18.

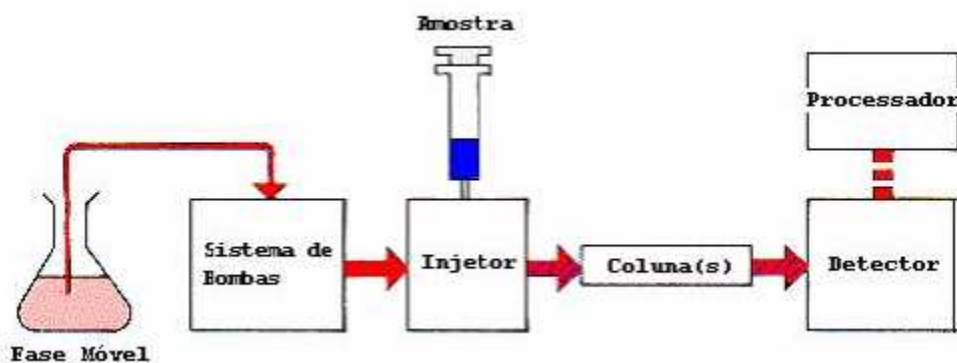


Figura 2.18 - Representação esquemática de um sistema de análise de GPC (LUCAS, 2001).

A cromatografia de exclusão por tamanho encontra vasta aplicação na caracterização de materiais poliméricos tanto do ponto de vista científico como tecnológico. Além da determinação dos pesos moleculares numérico e ponderal médios, esta análise fornece informações sobre a distribuição do peso molecular. Este parâmetro influencia diretamente as propriedades mecânicas do material como descreve a Tabela 2.4

Tabela 2.4 - Efeito dos componentes de baixo ou alto peso molecular nas propriedades mecânicas de um material polimérico (LUCAS, 2001)

Propriedade do polímero	Efeito do componente	
	Baixo PM	Alto PM
Resistência mecânica	Decresce	Aumenta
Viscosidade	Decresce	Aumenta
Tempo de processamento	Menor	Maior
Resistência química	Decresce	Aumenta

Uma maneira de se conhecer quão larga ou estreita é a curva de distribuição de massas molares é através do chamado índice de polidispersividade, definido pela relação M_w/M_n . Este índice é sempre maior ou igual a um, quanto mais variados forem os tamanhos das moléculas, maior será a polidispersão. Polímeros lineares como é o caso do P(3HB) geralmente apresentam uma polidispersão estreita, e se tiver em torno de dois é chamado de distribuição “mais provável” (CANEVAROLO, 2003).

2.11 Aplicações dos PHAs

Os PHAs podem ser utilizados numa larga escala de aplicações, industriais e em produtos de consumo. Atualmente, apesar dos preços do mercado internacional de petróleo

estarem mais estáveis e economicamente acessíveis, outras necessidades surgiram em nossa sociedade, e a característica de biodegradabilidade dos PHAs começou a despertar maior interesse. Uma vez que os plásticos derivados de petróleo são degradados muito lentamente no meio ambiente, substitutos alternativos passaram a ser uma necessidade atual (GOMES, 1993).

Em 1990, foi lançado o primeiro produto comercial a partir de PHAs (P(3HB-co-3HV)) foi uma garrafa biodegradável de xampu, de uma empresa alemã de cosméticos, lançado em 1990 (PREUSTING, 1992 citado por GOMEZ, 2000). Desde então, diversas aplicações em pequena escala têm sido desenvolvidas para P(3HB) ou (P(3HB)0-co-3HV)). Os PHAs são considerados de grande interesse industrial, como plásticos biodegradáveis e/ou biocompatíveis, para diversas áreas de aplicação (LEE, 1996a).

Abaixo, são listadas diversas aplicações para os PHAs em diferentes segmentos.

- Aplicações industriais: transportadores biodegradáveis, para liberação controlada de fertilizantes, fungicidas, herbicidas e inseticidas; redes de pesca; embalagens para alimentos, frascos, filmes, recipientes, garrafas e sacolas; emulsificantes; borrachas biodegradáveis; itens de higiene descartáveis, como fraldas e barbeadores; matéria prima para a produção de tintas e adesivos.

- Aplicações médicas: curativos, grampos, pinos cirúrgicos, seringas, suturas e *swabs*; enxertos de vasos sanguíneos e materiais osteosintéticos, como placas ósseas; transportadores biodegradáveis, para liberação controlada de drogas e medicamentos. Adicionalmente ao seu potencial como material plástico, PHAs representam também uma fonte útil de compostos quirais, que podem servir como precursores para a síntese química de substâncias opticamente ativas (BRANDL, 1990; STEINBÜCHEL, 1996; van der WALLE et al., 2001).

A Figura 2.18 apresenta alguns produtos feitos a base de PHAs comercializados pela empresa Biopol.



Figura 2.18 - Produtos feitos a base de PHAs da empresa Biopol.

2.12 Aplicações específicas do P(3HB)

Injecom, empresa de São Paulo que produz objetos de plástico injetado, lançou em 2006 uma embalagem para mudas de eucalipto feita com o plástico da P(3HB). Três meses depois de a muda ser plantada, o invólucro de P(3HB) se degrada na terra. A produtividade cresce e o plástico desaparece o que já interessa grandes indústrias de papel e celulose. Votorantim e International Papers, gigantes da indústria de papel e celulose, estão na lista de interessados pelo novo produto.

Outras aplicações segundo Ortega Filho produtos injetados ou termo formados, como frasco de cosméticos, tampas de PET, garfos, facas e embalagens de iogurte.

Marcos Maglio, o dono da empresa Injecom explica porque o novo produto será um sucesso “o processo de reprodução *in vitro* de eucaliptos é feito em tubets de plástico convencional. As pequenas mudas saem dos viveiros nesses tubos de plástico, de onde são retiradas antes de serem plantadas na terra. Os tubets de plástico convencional são reutilizáveis, mas pagam custos de frete, lavagem, esterilização e de reposição da ordem de 20% ao ano. Testes feitos em tubets de P(3HB) mostraram que, como as mudas são plantadas direto na terra, a eliminação do manuseio evita a contaminação — que atinge cerca de 20% das plantas quando são usados os tubets convencionais. Ainda segundo Maglio, “O aumento da produtividade provocará uma forte demanda pelos tubets biodegradáveis — para a cultura de eucaliptos e também para café, pupunha e mamão”.

Por ser biocompatível, o P(3HB) também atenderá a área da medicina. Poderá ser transformado, por exemplo, em fios de sutura que serão naturalmente absorvidos pelo organismo. Fabricantes de computadores também estudam trocar o plástico petroquímico pelo biodegradável dos seus produtos, que viram sucata rapidamente e entulham os lixões. Na Alemanha, as leis ambientais estão cada vez mais rígidas e obrigam as empresas a dar destinação ao seu próprio lixo.

Sylvio Ortega Filho, diretor executivo da PHB Industrial relata que a empresa mantém parcerias com institutos de pesquisa, universidades e empresas para testar as diversas aplicações do P(3HB) tais como: peças automotivas, espumas, fibras para tecidos, cartões de crédito etc (http://www.cempre.org.br/cempre_informa.php?lnk=ci_2007-0708_desafios.php).

Figura 2.19.



Figura 2.19 - Plásticos confeccionados com P(3HB) a partir de cana-de-açúcar.
Fonte: Tecnologia e informação a serviço da sociedade. Plásticos Biodegradáveis. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/noticentro/2007/08/maria_filomena.pdf

Segundo informações do Instituto de Pesquisa Tecnológicas de São Paulo (IPT), o P(3HB) destina-se à produção de vasilhames para defensivos agrícolas, vasilhames e filmes para alimentos, produtos injetados (brinquedos, material escolar), descartáveis, além de peças de recobrimento ou encapsulamento de produtos para uso agrícola. Indicado para a fabricação de peças pequenas, o Biocycle conta com o desafio de entrar no mercado de embalagens flexíveis (<http://www.plastico.com.br/revista/pm355/biodegradavel4.htm>).

CAPÍTULO III- MATERIAL E MÉTODOS

3- MATERIAL E MÉTODOS – UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Neste capítulo, são apresentadas as descrições dos equipamentos e metodologias utilizadas para execução dos experimentos realizados. As técnicas analíticas adotadas para as determinações das concentrações celulares, do consumo de substrato e produção, recuperação de P(3HB), bem como os procedimentos experimentais realizados também estão descritos.

3.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a bactéria mutante *Ralstonia eutropha*- DSM 545 (atualmente *Cupriavidus necator*). A nova classificação foi proposta por Makkar e Casida em 1987 e adotada pela Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Coleção de Microrganismos e Cultura de Células da Alemanha (dmsz)), por sua grande capacidade de acúmulo de polímero e crescimento em glicose como fonte de carbono (mutante espontâneo). A cepa de *R. eutropha* foi mantida sob refrigeração, em tubos contendo meio ágar nutriente (NA) composto de 5,0 g.L⁻¹ de peptona de carne, 3,0 g.L⁻¹ de extrato de carne e 1,5 % de ágar, com repiques periódicos a cada 15 dias.

3.2 Meios de cultura

A ativação das células foi realizada em caldo nutriente (NB) constituído de 5,0 g.L⁻¹ de peptona de carne, 3,0 g.L⁻¹ de extrato de carne, sendo este considerado a primeira pré-cultura, para as demais culturas e utilizado em uma fração de 10% em relação ao volume de trabalho utilizado.

O meio mineral (MM) foi utilizado como segunda pré-cultura (sem limitação de nitrogênio) e como meio final (com limitação de nitrogênio). Este meio foi elaborado por Ramsay et al., (1990) modificado por Aragão (1996) e sua composição, sem limitação, utilizada na segunda pré-cultura, está apresentada na Tabela 3.1.

Para a realização das culturas em biorreator, utilizou-se o mesmo meio da Tabela 3.1, com limitação em nitrogênio nas seguintes proporções: concentração final da fonte de nitrogênio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) no meio de $2,3 \text{ g.L}^{-1}$ ou $1,15 \text{ g.L}^{-1}$, dependendo do estudo a ser realizado. Estas quantidades são suficientes para a obtenção de $5,0 \text{ g.L}^{-1}$, ou $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa, respectivamente, no momento da limitação, baseado em um fator de conversão de nitrogênio em biomassa ($Y_{X/N}$) de $7,3 \text{ g.g}^{-1}$ (SCHNEIDER, 2006)

Cada uma das soluções concentradas, apresentadas na Tabela 3.1, foi preparada separadamente e armazenada como solução estoque. O pH da solução 1 foi ajustado a 7,0 com NaOH (0,1M) ou HCl (1M). Em seguida, as soluções 1, 2 e 3 foram autoclavadas separadamente durante 15 min/ 121°C e adicionadas assepticamente para compor o meio final que também foi autoclavado.

Tabela 3.1 - Composição do Meio Mineral sem limitação em nutrientes.

	Componente	Solução Conc.(g.L^{-1}) ^a	Volume adic. (mL.L^{-1} de meio)	Conc. no meio (g.L^{-1})
SOLUÇÃO 1	Ácido nitrilotriacético	19,1	10	0,19
	Citrato ferroso de amônia	10	6	0,06
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50	10	0,5
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5	2	0,01
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	200	25	5
	Solução de oligoelementos ^b		1	(1 mL.L^{-1})
	Água deslilada ^c			
SOLUÇÃO 2	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	223,8	40	8,95
	KH_2PO_4	37,5	40	1,5
SOLUÇÃO 3	Fonte de carbono (glicose/frutose)			30

^a concentrações das soluções estoque.

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

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

Tabela 3.2 - Composição da solução concentrada de oligoelementos.

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

Fonte: Ramsay et al., (1990) modificado por Aragão (1996)

3.3 Condições de cultura

3.3.1 Pré-culturas

Foram realizadas duas pré-culturas. A primeira em frasco erlenmeyer aletado de 500 mL contendo 150 mL de meio caldo nutriente (NB), inoculado com três alçadas da cepa mantida em meio nutriente ágar (NA). Esta pré-cultura foi incubada em shaker a 30⁰C e 150 rpm por 24 h. Após esse período, iniciou-se a segunda pré-cultura em frasco aletado de 1000 mL contendo 300 mL de meio MM não limitado, que recebeu uma quantidade correspondente a 10% de seu volume final de inóculo proveniente do meio NB. Da mesma forma, este meio foi incubado em shaker a 30⁰C e 150 rpm.

3.3.2 Cultura em Biorreator

As culturas foram realizadas em biorreator de 5 L (BIOFLO 110, New Brunswick Scientific CO), utilizando-se o volume útil de 4 L. O bioreator, contendo a solução 1 do meio MM (Tab. 3.1), foi autoclavado durante 15 min /121⁰C. Para o início da cultura, adicionou-se a solução de açúcar com concentração de 500 g.L⁻¹ para compor o meio inicial com 30 g.L⁻¹ de açúcar. O inóculo, proveniente da segunda pré-cultura (MM), foi adicionado na quantidade de 10% do volume final de meio no biorreator.

Durante a cultura, a temperatura foi mantida constante em valores que variam de acordo

com as condições de cultivo entre 30°C a 40°C e o pH ajustado a 7,0 com soluções de NH₄OH 0,1M, quando limitado em fosfato, ou NaOH 0,1 M, quando limitado em nitrogênio ou HCl 1M, para ambas as limitações. Como antiespumante, foi utilizado polipropilenoglicol Mn.ca. 2000 (Sigma-Aldrich).

As condições de agitação e aeração foram mantidas de acordo com cada experimento, com variação de 400 rpm - 900 rpm e 0,125 vvm – 0,9 vvm respectivamente, procurando-se assim manter a concentração de oxigênio dissolvido superior a 20%. A Figura 3.1 mostra o equipamento utilizado nos experimentos.



Figura 3.1 - Biorreator Bioflo 110 utilizado nos experimentos.

3.4 Técnicas analíticas

3.4.1 Amostragem

Amostras de 20 a 30 mL foram retiradas em intervalos de 1,5 horas. O volume de 2 mL foi utilizado para leitura em espectrofotômetro, 10 mL foram utilizados para determinação da concentração celular por gravimetria e o restante foi centrifugado em tubos Eppendorf de 2 mL cada, sendo que o sobrenadante foi guardado para posterior análises de substrato, nitrogênio e fosfato, e o precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e, após a última centrifugação, foi congelado para posterior análise de proteína e polímero.

3.4.2 Determinação da concentração de biomassa

3.4.2.1 Medida por espectrofotometria (medida indireta)

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

3.4.2.2 Medida por gravimetria (medida direta)

A concentração celular por gravimetria foi obtida a partir de um volume conhecido de cultura, compreendido entre 3-10 mL, filtrado através de membranas de poliamida (poro de 0,2 μ m) pré-secas em microondas por 10 minutos, resfriadas em dessecador por 10 minutos e pesadas segundo a metodologia de OLSSON e NIELSEN, 1997. O filtrado retido na membrana, foi lavado duas vezes com HCl 0,01 M para remoção de íons e sais presentes na biomassa, após, a sua secagem foi realizada segundo a metodologia OLSSON e NIELSEN, 1997 para determinação final da massa celular seca.

3.4.3 Dosagem de açúcares

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

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

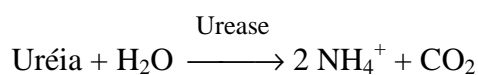
Após o preparo do reagente, a seguinte metodologia foi seguida.

Um volume de 400 μ L de sobrenadante, previamente diluído para uma faixa de 1:20, foi adicionado a 400 μ L de reativo DNS e depois colocado em banho-maria com água em ebulição, durante 5 minutos. Após esse período, fez-se o resfriamento em banho de gelo e adicionou-se 4 mL de água destilada. Após 15 minutos em repouso para estabilização da temperatura, foi realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm contra um branco de água destilada que passou pela mesma

reação. A curva de calibração expressa a concentração de glicose (g.L^{-1}) *versus* absorvância em uma escala compreendida entre 0 e 3 g.L^{-1} de glicose. Um exemplo de curva de calibração é apresentada no Anexo I - Figura A1.

3.4.4 Determinação de 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 é o seguinte:



onde: NP = nitroprussiato

Os reativos usados são os seguintes:

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

O procedimento adotado para a determinação do nitrogênio amoniacal é resumido 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 ⁰ C. Adicionar			
Oxidante	1 mL	1 mL	1 mL
Agitar e incubar por 10 min a 15-30 ⁰ 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 é feito da seguinte maneira (equação 3.1):

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

3.4.5 Dosagem de Proteínas

Amostras de 2 mL do meio de cultura foram centrifugadas a 14.000 rpm/3 min e o precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e congelado para posterior análise pelo método de Biureto (STICKLAND, 1951). 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) (molar) e incubação em banho-maria a 100⁰C/5 min. Após resfriamento, foram adicionados 170 µL de CuSO₄.5H₂O 25% (p/v) (molar), agitados e deixados em repouso por 5 minutos. O sobrenadante obtido, após centrifugação a 3100 rpm/5 min, 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 3g.L⁻¹ como padrão, conforme ilustrado no Anexo I - Figura A2.

3.4.6 Dosagem de P(3HB)

O P(3HB) foi dosado por cromatografia gasosa, conforme o método de metanólise baseado em Braunegg et al., (1978), com as modificações propostas por Brandl et al., (1988). As amostras, com volume conhecido de meio de cultura, foram centrifugadas a 14000 rpm/3 min. O precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e congelado para posterior análise. Após descongelamento, o precipitado foi ressuspensão em um volume de 2 mL de clorofórmio e 2 mL de metanol acidificado (H_2SO_4 15%), contendo ácido benzóico $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ como padrão interno. Após agitação em vórtex, a mistura foi então aquecida a $100^\circ\text{C}/140 \text{ min}$. Depois da 1ª hora de aquecimento, a mistura foi agitada durante alguns segundos e devolvida ao aquecimento. Após resfriamento em banho de gelo, adicionou-se 1 mL de água destilada e as amostras foram agitadas durante 30 segundos, seguido de repouso para separação das fases. A fase orgânica (inferior) foi retirada com uma pipeta Pasteur e armazenada sob refrigeração para posterior análise em cromatografia gasosa. A curva padrão foi feita utilizando-se o poli-(3-hidroxi-butirato) (Sigma), como padrão externo, com massa variando entre 0,0010 g a 0,03 g. A curva padrão foi estabelecida através da relação das áreas de P(3HB)/padrão interno *versus* massa de polímero. Submeteu-se os padrões à mesma metanólise que as amostras. Um exemplo da curva se encontra no Anexo I – Figura A.3.

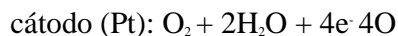
A coluna utilizada para dosagem do P(3HB) foi de sílica fundida ($\varnothing 0,53\text{mm} \times 30\text{m}$) modelo Supercowax-10. O cromatógrafo foi um CG-90 equipado com um detector de ionização de chama (DIC ar-hidrogênio). O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio a 30 mL/min e as temperaturas de injeção, detecção e coluna foram respectivamente de 190°C , 230°C e 90°C . Foi utilizada uma rampa de aquecimento com as seguintes condições: temperatura inicial da coluna de 60°C , temperatura final de 110°C , taxa de aquecimento de 7°C.min^{-1} e taxa de resfriamento de $35^\circ\text{C.min}^{-1}$. O volume injetado foi de $1 \mu\text{L}$. A integração e os cromatogramas foram obtidos através do *software* Clarity Lite (DataApex®). Um exemplo de cromatograma pode ser visto no Anexo I – Figura A.4.

3.4.7 Medida do oxigênio dissolvido no meio

3.4.8 Princípio de funcionamento do eletrodo de oxigênio

O eletrodo de oxigênio dissolvido tipo In Pro 6800 Series (Mettler Toledo) opera com princípio polarográfico e consiste de um ânodo de prata e um cátodo de platina, que são separados do meio de cultivo por uma membrana polimérica (teflon/silicone), permeável ao gás (oxigênio). O ânodo e o cátodo são conectados condutimetricamente por um eletrólito (solução de KCl), que forma uma fina camada entre a membrana e o cátodo. Com uma voltagem adequada de polarização, o oxigênio, que se difunde através da membrana em direção ao cátodo, é reduzido. Esta reação química produz uma corrente elétrica, que é diretamente proporcional à pressão parcial de oxigênio no meio.

As reações são as seguintes:



3.4.9 Procedimento de calibração do eletrodo de oxigênio

Definiu-se como sendo o 0% de saturação de O_2 no controlador, o momento em que o eletrodo está desconectado do sistema de leitura de dados. A seguir, conecta-se o eletrodo ao sistema de leitura de dados e deixa-se a sonda polarizando por um tempo mínimo de 6 horas. Após este período, estabelece-se para o sistema de leitura de dados o valor obtido como 100% de saturação.

3.5 Respirometria

A respirometria é uma ferramenta muito adequada para se obter valores das constantes cinéticas de uma cultura, de maneira ampla. Os testes usando a respirometria são muito mais simples e levam a resultados precisos em muito menos tempo do que várias técnicas analíticas convencionalmente utilizadas durante os cultivos. A respirometria é a medida da velocidade do consumo de oxigênio em sistemas aeróbios.

3.5.1 Velocidade específica de respiração

Sabe-se que, através da respirometria, calcula-se a velocidade de consumo de oxigênio $Q_{O_2}X$ (onde Q_{O_2} é a velocidade específica de respiração celular e X é a concentração celular), que é obtida quando se plota a variação da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo, a partir do instante em que se elimina a aeração.

De acordo com SHMIDELL (2001), em um biorreator descontínuo aerado e agitado e com volume constante, o balanço de massa para o oxigênio na fase líquida pode ser descrito pela equação 3.2:

$$\left(\frac{dC}{dt} \right) = K_L a (C_s - C) - Q_{O_2} X_r \quad (\text{Eq. 3.2})$$

onde:

C = concentração de oxigênio dissolvido no instante t (mg.L^{-1})

C_s = concentração de oxigênio dissolvido na saturação (mg.L^{-1})

$K_L a$ = coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (min^{-1})

$Q_{O_2} X_r$ = velocidade de consumo de oxigênio ($\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)

Q_{O_2} = velocidade específica de respiração ($\text{mgO}_2 \cdot \text{gcel}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)

X_r = concentração celular (g.L^{-1})

t = tempo (min)

A grandeza Q_{O_2} representa a característica biológica do sistema, pois ela depende do microrganismo empregado, da composição do meio e das condições de cultivo (pH, temperatura, etc.). A sua determinação é feita conjuntamente com o $K_L a$.

3.5.2 Transferência e consumo de oxigênio durante o cultivo: determinação do $K_L a$ e Q_{O_2}

Apesar de o método dinâmico ser utilizado para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($K_L a$) sem a presença do microrganismo, a maior importância da aplicação do método é na determinação do $K_L a$ durante o cultivo e, também, da velocidade específica de respiração (Q_{O_2}). Durante o cultivo, enquanto o biorreator transfere oxigênio da fase gasosa para a fase líquida, o microrganismo consome o oxigênio dissolvido.

O equacionamento através de um balanço de oxigênio no meio líquido, sem levar em conta

o volume total do biorreator, e a ausência de transferência, resulta na equação 3.2.

A variação da concentração de oxigênio dissolvido no líquido é o resultado da diferença entre a quantidade que se consegue dissolver $\{K_{La}(C_S-C)\}$ e o oxigênio consumido pelo microrganismo ($Q_{O_2}X_r$). A cinética do cultivo está considerada pela equação anterior, pois X_r varia com o tempo e Q_{O_2} varia com μ_{X_r} .

A determinação do K_{La} e da Q_{O_2} foi realizada com emprego do método dinâmico. Em determinado instante, interrompe-se a aeração para anular a transferência de oxigênio. Conforme ilustra a Figura 3.2, a concentração de O_2 dissolvido 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 normais e registra-se o aumento da concentração de O_2 dissolvido até atingir novamente o valor anterior C_0 . Este procedimento deve levar somente alguns minutos, dependendo muito do estágio do cultivo, sendo importante que a concentração não atinja valores críticos que possam afetar o metabolismo. Nesse curto espaço de tempo, pode se supor que não ocorre aumento de X_r e que Q_{O_2} se mantém constante.

Para o trecho sem aeração, resulta a Equação 3.3:

$$-Q_{O_2} X = \left(\frac{dC}{dt} \right) \quad (\text{Eq 3.3})$$

Com a consideração anterior de que Q_{O_2} é constante, a Equação 3.3 pode ser integrada resultando em:

$$C = C_0 - Q_{O_2} X \cdot (t - t_0) \quad (\text{Eq 3.4})$$

A Equação 3.4 prevê uma variação linear com o tempo no trecho sem aeração. Assim, foi obtido o valor de Q_{O_2} através do coeficiente angular $Q_{O_2}X$ e do valor de X obtido da análise da amostra retirada no momento da realização desse ensaio.

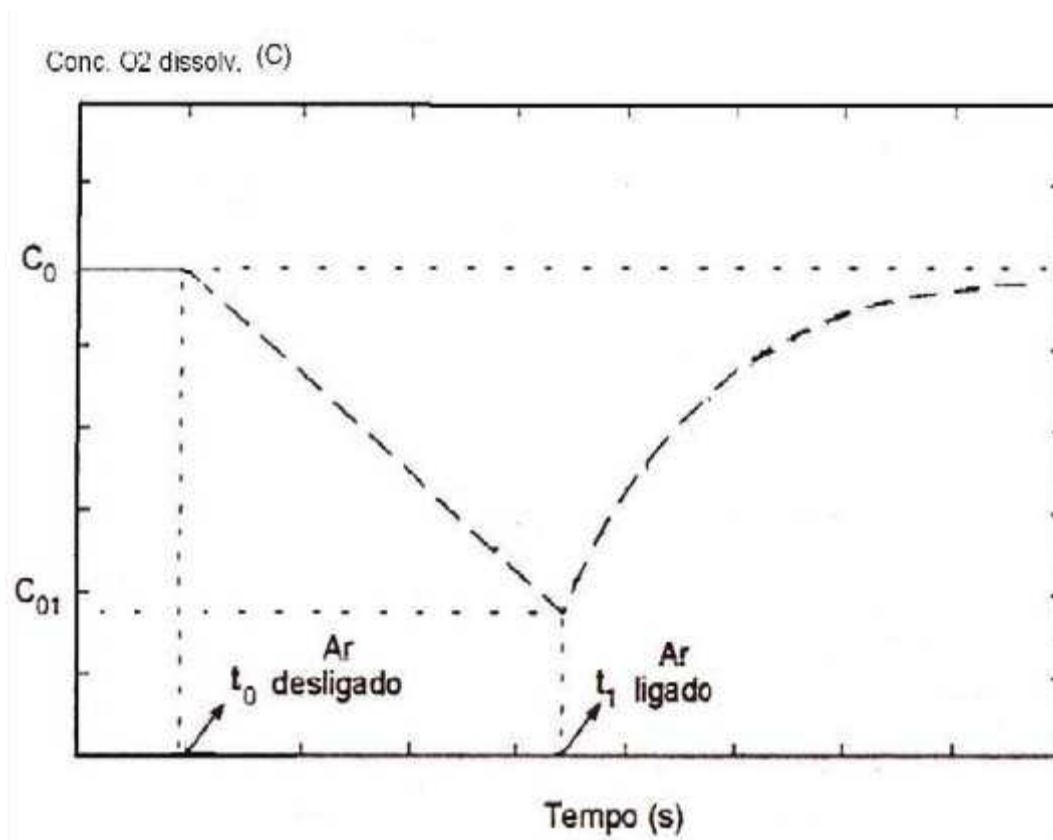


Figura 3.2 - Ilustração para explicar o método dinâmico utilizado para determinar o K_La e a QO_2 .
 Fonte: (adaptada de SCHMIDELL, 2001).

O valor de K_La foi determinado com a utilização dos dados obtidos durante o aumento da concentração do O_2 dissolvido, ilustrado pelo segundo trecho da Figura 3.2, onde a Equação 3.4 foi aplicada integralmente. Considerando estado estacionário no momento que antecede a interrupção da aeração ($C = C_0$), verifica-se que:

$$C_0 = C_S - \left(\frac{Q_{O_2} \cdot X_r}{K_L a} \right) \quad (\text{Eq 3.5})$$

Re-arranjando a Equação 3.5, obtêm-se:

$$\frac{dC}{dt} = K_L a \cdot \left(C_S - \left(\frac{Q_{O_2} \cdot X_r}{K_L a} \right) - K_L a \cdot C \right) \quad (\text{Eq 3.5})$$

Substituindo a equação 3.4 na equação 3.5, obtém-se a equação 3.6.

$$\frac{dC}{dt} = K_L a \cdot (C_0 - C) \quad (\text{Eq 3.6})$$

A integração da equação 3.6 acima, onde para o instante inicial de retomada da aeração $t = t_1$ tem-se $C = C_{01}$, fornece:

$$\ln\left(\frac{C_0 - C}{C_0 - C_{01}}\right) = -K_L a \cdot (t - t_1) \quad (\text{Eq 3.6.1})$$

Plotando-se C em função de t , conforme a Equação 3.6.1, obtêm-se uma reta cujo coeficiente angular fornece o valor de $K_L a$.

3.6 Tratamento de dados

3.6.1 Ajuste dos dados experimentais

Os dados experimentais obtidos foram ajustados pelo programa Lissage, desenvolvido pelo laboratório do “Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse” França, por Ardaillon-Simoes, Arroyo, Uribelarrea.

3.6.2 Análise Cinética

Como o acúmulo de P(3HB) é intracelular, as velocidades específicas de crescimento celular e de produção de P(3HB) foram 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) [$X_r = X_T - P(3HB)$].

3.6.3 Fatores de Conversão

3.6.3.1 Fator de conversão de substrato em produto

$$Y_{P(3HB)/S} = \frac{(P(3HB)_t - P(3HB)_{t_0})}{(S_{t_0} - S_t)} \quad (\text{Eq. 3.7})$$

Onde:

$Y_{P(3HB)/S}$ = fator de conversão de substrato em produto P(3HB) (g/g).

$P(3HB)_t$ = representa a quantidade de P(3HB) final num determinado instante t (g/L).

$P(3HB)_{t_0}$ = representa a quantidade de P(3HB) inicial num determinado instante t_0 (g/L).

S_{t_0} = representa a quantidade de substrato inicial num determinado instante t_0 (g/L).

S_t = representa a quantidade de substrato final num determinado instante t (g/L).

3.6.3.2 Fator de conversão de substrato em biomassa total

$$Y_{XT/S} = \frac{(XT_t - XT_{t_0})}{(S_{t_0} - S_t)} \quad (\text{Eq 3.8})$$

Onde:

$Y_{XT/S}$ = fator de conversão de substrato em biomassa total (g/g).

XT_t = representa a quantidade de biomassa total final num determinado instante t (g/L).

XT_{t_0} = representa a quantidade de biomassa total inicial num determinado instante t_0 (g/L).

S_{t_0} = representa a quantidade de substrato inicial num determinado instante t_0 (g/L).

S_t = representa a quantidade de substrato final num determinado instante t (g/L).

3.6.3.3 Fator de conversão de substrato em biomassa residual

$$Y_{Xr/S} = \frac{(Xr_t - Xr_{t_0})}{(S_{t_0} - S_t)} \quad (\text{Eq 3.9})$$

Onde:

$Y_{Xr/S}$ = fator de conversão de substrato em biomassa residual (g/g).

Xr_t = representa a quantidade de biomassa residual final num determinado instante t (g/L).

Xr_{t_0} = representa a quantidade de biomassa residual inicial num determinado instante t_0 (g/L).

S_{t_0} = representa a quantidade de substrato inicial num determinado instante t_0 (g/L).

S_t = representa a quantidade de substrato final num determinado instante t (g/L).

3.6.3.4 Fator de conversão de nitrogênio em biomassa residual

$$Y_{Xr/N} = \frac{(Xr_{t_f} - Xr_{t_0})}{(N_{t_0} - N_{t_f})} \quad (\text{Eq 3.10})$$

Onde:

$Y_{Xr/N}$ = fator de conversão de nitrogênio em biomassa residual (g/g).

Xr_{t_f} = representa a quantidade de biomassa residual final no instante t_f (g/L).

Xr_{t_0} = representa a quantidade de biomassa residual inicial no instante t_0 (g/L).

N_{t_0} = representa a quantidade de nitrogênio inicial no instante t_0 (g/L).

N_{t_f} = representa a quantidade de nitrogênio final no instante t_f (g/L).

3.6.4 Produtividade

3.6.4.1 Produtividade em P(3HB)

$$\text{Pr}_{P(3HB)} = \frac{(P(3HB)_t - P(3HB)_{t_0})}{(t - t_0)} \quad (\text{Eq 3.11})$$

Onde:

$\text{Pr}_{P(3HB)}$ = produtividade média de P(3HB) ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

$P(3HB)_t$ = concentração de P(3HB) no instante de tempo t (g.L^{-1}).

$P(3HB)_{t_0}$ = concentração de P(3HB) no instante de tempo t_0 inicial (g.L^{-1}).

t = tempo de cultivo num determinado instante t (h).

t_0 = tempo inicial do período considerado (h).

3.6.4.2 Produtividade em células

$$\text{Pr}_{Xr} = \frac{(Xr_t - Xr_{t_0})}{(t - t_0)} \quad (\text{Eq 3.12})$$

Onde:

Pr_{Xr} = produtividade média de biomassa residual ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Xr_t = concentração de biomassa residual no instante de tempo t (g.L^{-1}).

Xr_{t_0} = concentração de biomassa residual no instante de tempo t_0 inicial (g.L^{-1}).

t = tempo de cultivo num determinado instante t (h).

t_0 = tempo inicial do período considerado (h).

3.6.4.3 Velocidade Específica máxima de Crescimento Celular ($\mu_{\text{máx}}$)

Para o cálculo da velocidade específica de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$), derivou-se a equação da função polinomial de Xr em função de t ajustada aos pontos experimentais obtidos, calculou-se a derivada em intervalos de tempo e dividiu-se o valor da derivada pelo valor da concentração celular correspondente àquele tempo, segundo a equação:

$$\mu_{Xr} = \frac{1}{Xr} \cdot \frac{dXr}{dt} \quad (\text{Eq 3.13})$$

Com o acompanhamento cinético da concentração celular, a máxima velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), foi calculada traçando-se curvas, relacionando os logaritmos neperianos das concentrações celulares, obtidas com os dados da curva ajustada aos pontos experimentais, com os seus respectivos tempos de amostragem (equação 3.14). Neste gráfico, a fase exponencial apresenta um comportamento linear, sendo o coeficiente angular desta reta, o próprio valor de $\mu_{\text{máx}}$.

$$Xr_f = Xr_i \cdot e^{\mu_{\text{máx}}(t_f - t_i)} \quad (\text{Eq 3.14})$$

Ou, re-escrevendo a equação 3.14, tem-se:

$$\ln Xr_f = \ln Xr_i + \mu_{\text{máx}} \cdot (t_f - t_i) \quad (\text{Eq 3.15})$$

$$\ln\left(\frac{Xr_f}{Xr_i}\right) = \mu_{\text{máx}} \cdot (t_f - t_i) \quad (\text{Eq 3.16})$$

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{\ln\left(\frac{Xr_f}{Xr_i}\right)}{(t_f - t_i)} \quad (\text{Eq 3.17})$$

3.7 Modelagem do crescimento microbiano

3.7.1 Modelos Primários

3.7.1.1 Modelo de Gompertz modificado

O Modelo de Gompertz foi introduzido na microbiologia de alimentos por GIBSON et al., em 1987 (ROSS & McMEEKIN, 1994; GIANUZZI et al., 1998; LABUZA & FU, 1993), que compararam a equação logística e a de Gompertz no ajuste de uma curva de crescimento de *Clostridium botulinum*. O Modelo de Gompertz, está representado pela Equação 3.18 (ERKMEN & ALBEN, 2002).

$$\text{Ln}\left(\frac{x}{x_0}\right) = A \cdot \exp\left\{-\exp\left[-B \cdot (t - M)\right]\right\} \quad (\text{Eq 3.18})$$

Nessa equação: X_0 é a concentração celular no tempo zero (g.L^{-1}) e X é a concentração celular no tempo t (g.L^{-1}), A é $\text{Ln}(X_\infty/X_0)$ onde X_∞ é a concentração celular máxima atingida no tempo $t = \infty$, B é a velocidade relativa máxima de crescimento no tempo M (h^{-1}), e M é o tempo necessário para atingir a velocidade máxima de crescimento (h).

A função ou Modelo de Gompertz foi modificado por ZWIETERING et al. (1990). A reparametrização do modelo foi feita para que os parâmetros estimados pudessem ter um significado biológico. Assim, os parâmetros, velocidade específica máxima de crescimento foram introduzidos no modelo, o que facilitou o encontro de valores iniciais e o cálculo de intervalos de confiança durante o ajuste da curva (LABUZA & FU, 1993; VAN IMPE et al., 1995). O Modelo de Gompertz Modificado é dado pela equação 3.19.

$$\text{Ln}\left(\frac{x}{x_0}\right) = A \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_{\max} \cdot e}{A} (\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (\text{Eq 3.19})$$

Onde: μ_{\max} é a velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}) e λ é a duração da fase lag (h). Os modelos desenvolvidos no laboratório PROFI (EQA-UFSC), foram ajustados aos dados experimentais nas diferentes condições testadas.

3.7.1.1.1 Modelo Logístico

O modelo Logístico foi aplicado de acordo com a equação (3.20) (Erkmen, 2000):

$$\text{Ln}\left(\frac{x}{x_0}\right) = \frac{A}{[1 + \exp(D - B.t)]} \quad (\text{Eq 3.20})$$

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 modelos desenvolvidos no laboratório PROFI (EQA-UFSC), foram ajustados aos dados experimentais nas diferentes condições testadas.

3.7.2 Modelos Secundários – Aplicado ao melhor modelo primário, selecionado segundo o item 1.61

3.7.2.1 Modelo da Raiz Quadrada

O Modelo de Belehradek, ou Modelo da Raiz Quadrada é baseado na relação linear entre a raiz quadrada da velocidade específica máxima de crescimento e a temperatura. Este modelo foi inicialmente utilizado por Ratkowsky et al. (1982) para modelar o efeito da temperatura na velocidade específica máxima de crescimento. A versão mais comum do modelo está na equação 3.21:

$$\sqrt{k} = b(T - T_{\min}) \quad (\text{Eq 3.21})$$

onde: onde k representa um dos parâmetros do modelo primário (μ , λ ou A), b é a constante de regressão, T_{\min} representa a temperatura mais baixa onde o crescimento é observado (parâmetro do modelo), e T é a temperatura, ambos obtidos pelo ajuste do modelo aos dados experimentais. (van IMPE et al., 1992). Os modelos desenvolvidos no laboratório PROFI (EQA-UFSC), foram ajustados aos dados experimentais nas diferentes condições testadas.

3.7.2.2 Equação de Arrhenius

Fu & Labuza (1993) mostraram que a lei de Arrhenius se aplica para uma determinada faixa de temperatura, uma vez que o crescimento microbiano é um processo bioquímico. Deste modo, a dependência da temperatura nos parâmetros primários de crescimento pode ser caracterizada por uma energia de ativação uma vez que todos os outros fatores são mantidos constantes. A equação de Arrhenius é representada pela equação 3.22.

$$k = A.\exp\left(\frac{-Ea}{RT}\right) \quad (\text{Eq 3.22})$$

onde: k é o parâmetro de crescimento do modelo (μ , λ ou A), A é um parâmetro obtido pelo ajuste do modelo (h^{-1}), T é a temperatura absoluta (K), Ea é a energia de ativação para crescimento bacteriano (kJ.mol^{-1}) e R é a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$). A equação de Arrhenius foi ajustada aos dados experimentais por um programa desenvolvido no PROFI (EQA-UFSC).

3.7.3 Análises Estatísticas

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

Quanto menor o valor de MSE (equação 3.23), melhor é o ajuste do modelo aos dados experimentais.

$$\text{MSE} = \frac{\text{RSS}}{n} = \frac{\sum (\text{Valor}_{\text{observado}} - \text{Valor}_{\text{predito}})^2}{n} \quad (\text{Eq 3.23})$$

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 (3.24):

$$\text{fator bias} = 10^{\left(\frac{\sum \log(\text{Valor}_{\text{observado}} / \text{Valor}_{\text{predito}})}{n} \right)} \quad (\text{Eq 3.24})$$

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

$$\text{fator de exatidão} = 10^{\left(\frac{\sum \left| \log(\text{Valor}_{\text{observado}} / \text{Valor}_{\text{predito}}) \right|}{n} \right)} \quad (\text{Eq 3.25})$$

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.

MATERIAL E MÉTODOS - UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

3.8 Microrganismo

O microrganismo utilizado neste etapa do trabalho foi o mesmo utilizado no Brasil, a bactéria mutante *Ralstonia eutropha*- DSM 545 (atualmente *Cupriavidus necator*), a cepa foi fornecida pelo Instituto Tecnológico de Pesquisa (IPT).

A cepa liofilizada de *R. eutropha* foi reativada em meio nutriente (NB) composto de 5,0 g.L⁻¹ de peptona de carne e 3,0 g.L⁻¹ de extrato de carne, durante 24 horas após foi repicada e mantida sob refrigeração, em tubos contendo meio ágar nutriente (NA) composto de 5,0 g.L⁻¹ de peptona de carne, 3,0 g.L⁻¹ de extrato de carne e 1,5 % de ágar, com repiques periódicos a cada 15 dias.

3.9 Condições de cultura

Para a realização das culturas em biorreator, utilizou-se o mesmo meio da Tabela 3.1, o Meio Mineral, com limitação em fonte de nitrogênio. O meio mineral, foi preparado e autoclavado em fermentador (Biostat B-plus, Sartorius, 2 litros) (Figura 3.3), a 121°C/30 min. As soluções de fonte de carbono (Solução 3, Tabela 3.1) e fósforo (Solução 2, Tabela 3.1), foram autoclavados separadamente (121°C/20 min) e adicionados ao fermentador, em condições de assépsia.

O biorreator foi operado nas seguintes condições: temperatura controlada de acordo com a faixa de temperatura estudada; pH controlado entre 6.75 e 7.00, por adição automática de NaOH 1M ou H₂SO₄ 1M; a concentração de oxigênio dissolvido, foi mantida controlada em 40% através da adição de ar comprimido ou frações de oxigênio puro e ar comprimido além do aumento gradativo da velocidade de agitação iniciando em 400 rpm e tendo como máximo 900 rpm.



Figura 3.3 - Biostat B-plus, Sartorius, 2 litros.

Os experimentos de alta densidade celular foram conduzidos em biorreator Biostat B-plus, Sartorius, 10 litros (Figura 3.4), nas mesmas condições de operação acima e igual composição do meio de cultivo, com aumento gradativo da velocidade de agitação iniciando em 400 rpm e tendo seu máximo em 1500 rpm.



Figura 3.4 - Biostat B-plus, Sartorius, 10 litros.

3.10 Amostragem

Ao longo do tempo de fermentação, foram retiradas amostras do caldo de fermentado (15 ml) para posterior avaliação do crescimento celular, determinação da concentração dos nutrientes e quantificação da produção de polihidroxibutirato.

As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm/ 5 min, para separar as células (precipitado contendo P(3HB) do sobrenadante. O sobrenadante foi congelado para posterior análise, o precipitado foi congelado e posteriormente liofilizado em liofilizador *Telstar, Cryodos* durante 12 horas, sob vácuo, -50°C e 0.071 mbar. O precipitado liofilizado foi utilizado para posterior determinação do conteúdo em polímero intracelular (P(3HB)). O sobrenadante foi utilizado para a determinação da concentração da fonte de carbono e da fonte e nitrogênio.

3.11 Quantificação do crescimento microbiano

Para seguir a evolução do crescimento microbiano, utilizaram-se dois métodos, um indireto e outro direto. O primeiro baseou-se na relação entre a massa celular e a dispersão da luz que atravessa a suspensão. Esta relação foi obtida através da medição da absorbância a 600 nm (DO_{600nm}) das amostras brutas, medida no espectrofotômetro (*Elios α , ThermoSpectronic*).

O segundo método consistiu na determinação da massa celular seca das amostras brutas por gravimetria: a amostra foi filtrada a vácuo em membrana de poliamida porosidade 0,2 μ m estéril, o filtrado retido na membrana foi lavado duas vezes com HCl 0,01 M para remoção de íons e sais presentes na biomassa. A membrana com a amostra foi seca em microondas conforme metodologia descrita por Olsson e Nielsen, 1997, para determinação final da massa celular seca.

3.12 Determinação da concentração de Nitrogênio

A concentração de nitrogênio foi determinada tendo por base a relação entre a concentração de amônia nas amostras (sobrenadante obtido por centrifugação do caldo de fermentação) e o potencial existente na solução medida pelo eletrodo de amônia (*Thermo Electron Corporation, Orion 9512*), após adição do reagente ISA (20 μ l de reagente ISA para 1 ml de amostra). Esta solução, que ajusta a força iônica do meio, é composta por NaOH 5 M, EDTA dissódico 0.05 M, metanol 10% (v/v) e um indicador de cor azul. A determinação foi feita com a introdução do eletrodo na solução e contados 5 minutos para obter o resultado. A gama de validade deste método situa-se entre 0 e 100 mg N-NH₄/L.

A curva de calibração foi obtida com padrões de cloreto de amônia com as seguintes concentrações 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15 e 20 mg N-NH₄/L. Em Anexo encontra-se um exemplo da curva Padrão (Anexo A-Figura A5).

3.13 Dosagem de açúcares redutores

O sobrenadante obtido por centrifugação do caldo de fermentação foi diluído cinquenta vezes em água deionizada, sendo posteriormente filtrado por centrifugação (8000 rpm/15 a 20 min) em filtros com um diâmetro de poro de 0,22 µm de diâmetro (*Whatman, Vectaspin Micro*). As amostras filtradas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *High-Performance Liquid Chromatography*), utilizando uma coluna *Biorad (Aminex HPX-87H, 300 mm x 7,8 mm)*, acoplada a uma pré-coluna (*Biorad*). O eluente utilizado foi uma solução de ácido sulfúrico (0.01 M), com um fluxo de 0,6 ml/min, a uma temperatura de 50°C. Foi utilizado um detector de Índice de Refração (*Merck*). Foram preparados padrões, a partir de uma solução mãe de concentração 1,0 g/l, a partir da qual foram preparadas soluções com concentrações entre 0,05 a 1,0 g/l. Em Anexo, encontra-se um exemplo da curva Padrão para a determinação dos açúcares redutores (Anexo A6).

3.14 Quantificação do P(3HB) acumulado intracelular

A determinação da concentração de polihidroxibutirato foi realizada através de cromatografia gasosa, de acordo com o método proposto por Braunegg et al (1978) e Comeau et al (1998) com ligeiras modificações introduzidas por Satoh (1991). O método consiste na destruição das estruturas celulares, com hidrólise das cadeias de PHA e esterificação (metilação) dos monômeros obtidos. O precipitado obtido a após centrifugação das amostras retiradas do reator foi liofilizado e ressuspenso em 1 ml de solução de metanol acidificado (2,5M H₂SO₄), contendo 0,50 mg/ml de heptadecano (padrão interno), e 1 ml de clorofórmio.

A mistura foi digerida num termobloco, a 100°C, durante 3,5 horas. Decorrido este tempo, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e adicionados de 0,5 ml de água deionizada sendo a mistura agitada num *vortex* por 60 segundos, para extrair o polímero. Após separação das fases, a fase contendo clorofórmio foi recolhida para um recipiente contendo receptores moleculares de água (0,3 nm), para retenção de água que pode ainda estar presente nesta fase. A fase do clorofórmio contendo o polímero foi, então, analisada por cromatografia gasosa (GC) (*Chrompack*) equipada com um detector de ionização de chama a 220°C. Foi injetado 1 µl da fase do clorofórmio numa coluna *DBWAX 60m' 0.53mm '1µm*. em Anexo encontra-se um exemplo da curva Padrão (Anexo A-Figura A6).

O gás de arraste foi o hélio, com uma pressão equivalente de 100 KPa. O programa de temperaturas do forno usado para as análises foi de: 40°C a 100°C (15 °C/min), 100° C/1 min, 100 a 175°C (10 °C/minuto), 175°C/2 min, 175 a 220 °C (10°C/minuto), 220°C/31 min.

Para a curva padrão foram utilizados padrões de PHB/HV (70 %/30 %; *Merck*) de nas concentrações de 0, 24, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 600, e 700 mg. mL⁻¹ sujeitos ao mesmo procedimento utilizado para as amostras e injetados no GC (Gas Chromatography). Deste modo, foi obtida uma curva de calibração (Anexo A6), que permitiu obter uma correlação direta entre as concentrações de HB/HV e as áreas dos picos correspondentes. Determinação da porcentagem de pureza e porcentagem de recuperação de P(3HB).

Uma massa conhecida do filme formado pelos métodos padrão (solvente clorofórmio) e novo método (solvente carbonato de propileno) foram submetidas à análise cromatográfica conforme procedimento descrito no item 3.14, para a determinação da porcentagem de pureza do filme, que está expressa na equação (3.26).

$$\% \text{ pureza} = \frac{m_{P(3HB)}}{m_{\text{filme}}} * 100 \quad (3.26)$$

onde: $m_{P(3HB)}$ 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 pureza conhecida do filme, foi possível determinar a porcentagem de recuperação, que é expressa pela equação 3.27:

$$\% \text{ recuperação} = \frac{m_p}{m_i} 100 \quad (3.27)$$

$$\text{sendo } m_p = \frac{(m_f \cdot \% \text{ pureza})}{100\%} \quad (3.28)$$

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 3.28).

$$\text{sendo } m_i = \frac{(m_t \cdot \% P(3HB)_{\text{cultivo}})}{100\%} \quad (3.29)$$

onde: m_i é a massa total de células (m_t) vezes a porcentagem P(3HB) obtida durante o cultivo (equação 3.29).

3.15 Determinação do peso molecular médio (GPC)

A determinação das médias numérica (\overline{M}_n), ponderal (\overline{M}_w) e da distribuição do peso molecular dos polímeros obtidos foi determinada através de cromatografia líquida de exclusão molecular, GPC (do inglês *gel permeation chromatography*) ou SEC (*size exclusion chromatography*). Utilizou-se um equipamento modular de baixa temperatura com termostatização (Waters), constituído por um sistema de distribuição de solvente modelo 510, um injetor U6K e um detector de índice de refração modelo 2410. A fase móvel utilizada foi clorofórmio, com um caudal de 1ml/min, e a temperatura de análise foi de 30°C. Foram usadas três colunas em série, Waters Ultrastyrigel, de porosidades 10³Å, 10⁴Å e 10⁵Å (cobrindo a gama de pesos moleculares de 2×10² a 6×10⁶ Å) colocadas num forno com controlador de temperatura. Utilizou-se o método de calibração universal recorrendo a oito padrões monodispersos de poliestireno (PS), de pesos moleculares 2698, 7500, 30254, 105560, 382000, 758000, 2400000 e 3950000 (Waters & Polymer Laboratories). Este método baseia-se na equivalência do volume hidrodinâmico, V_h (traduzido pelo produto $[\eta]M$) de diferentes polímeros com o mesmo peso molecular.

O volume hidrodinâmico é proporcional ao raio de rotação das cadeias de polímero em solução (YAU et al., 1979). Desta forma, a curva de calibração correspondente ao volume de eluição dos picos de padrões de poliestireno (os únicos polímeros monodispersos solúveis em compostos orgânicos existentes no mercado numa maior gama de pesos moleculares) é transformada numa curva de calibração adequada aos polímeros em análise. Essa transformação é realizada através da equação de Mark-Houwink $[\eta]=K M^a$, em que $[\eta]$ é o número limite de viscosidade e “K” e “a” são as constantes de Mark-Houwink, válidas para um dado sistema polímero/solvente/temperatura, as quais estão relacionadas com a conformação do polímero em solução (YAU et al., 1979). O valor das constantes utilizadas para os pares P(3HB)/clorofórmio e PS/clorofórmio, foram respectivamente $K = 0.0118 \text{ ml/g}$ e $a = 0.78$; $K = 0.0049 \text{ ml/g}$ e $a = 0.78$ (KURATA et al., 1989).

Foi preparada uma solução dos oito padrões em clorofórmio, com a concentração de 0,02% (g/ml) em cada um deles, da qual era injetado um volume de 50 μl . O volume de injeção das amostras de P(3HB), com uma concentração de 0,2% (g/ml), foi de 150 μl .

A Figura 3.5 apresenta um ilustração do equipamento utilizado para a determinação do peso molecular.



Figura 3.5 - Ilustração do equipamento utilizado para a determinação do Peso molecular

3.16 Determinação da calorimetria diferencial exploratória (DSC)

3.16.1 Descrição do método

A calorimetria diferencial de exploratória (DSC) é uma técnica de análise térmica onde a diferença de temperaturas ($T_{\text{amostra}} - T_{\text{referência}}$) é registada em função da temperatura do sistema, à medida que a amostra é aquecida ou resfriada, a uma velocidade constante. Esta técnica permite a caracterização de materiais através de: fusão, cristalização, transição vítrea, polimerização, e graus de pureza, cristalização e cura. Os resultados fornecidos são : temperatura de início (“onset”) da transição e do máximo do pico ou do ponto médio (“mid-point”) no caso da transição vítrea; variação de calor específico e entalpia associados à transição.

3.16.2 Descrição do aparelho

Calorímetro Diferencial exploratório (Setaram, França) modelo DSC 131. Gama de temperaturas entre -150 e 700°C . Velocidades de aquecimento e arrefecimento entre $0,01$ e $99,99^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Sinal de fluxo de calor compreendido entre -100 e $+100$ mW, com resolução de $\pm 0,2$ μW .

3.16.3 Descrição dos ensaios de DSC

3.16.3.1 Ensaios a temperaturas a ambiente

10 mg de amostra são pesadas em cadinhos de alumínio de 30 μl , que são mantidos aberto durante os ensaios de degradação. Este ensaios são realizados sob atmosfera de N_2 .

3.16.3.2 Ensaios a temperaturas acima da ambiente

As amostras foram sujeitas a um aquecimento desde a temperatura ambiente até 300°C , à velocidade de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

O grau de cristalinidade por esta técnica foi calculado por meio da equação 3.30

$$\chi_c = \frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{\Delta H_m^o} \times 100\% \quad (\text{equação 3.30})$$

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

ΔH_c = entalpia decristalização da amostra (J/g)

ΔH_m^o = entalpia de fusão para P(3HB) 100% cristalino (J/g)

Para P(3HB) 100% cristalino $\Delta H_m^o = 142$ (J/g) (Tsuji & Ikada, 1996)

CAPÍTULO IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4- MODELAGEM MATEMÁTICA

O processo de produção de PHAs por *Ralstonia eutropha* é conduzido em duas fases distintas: **fase de crescimento** não limitado com produção de biomassa e **fase de produção** com acúmulo de polímero (DAWES E SENIOR, 1973). Se a primeira fase tiver uma produtividade elevada de células haverá uma melhoria na produtividade global do polímero. Portanto, é interessante utilizar condições de cultivo que proporcionem valores de velocidade de crescimento altos.

A temperatura ótima de crescimento é um parâmetro muito importante na condução de culturas de microrganismos. A literatura cita duas temperaturas ótimas de crescimento 30-34°C (MARANGONI, 2000, GROTHE et al., 1999), e a maioria dos estudos são realizados a 30°C. A partir disto, propõe-se estudar a influência destas duas temperaturas na velocidade específica máxima de crescimento de *Ralstonia eutropha*. Considerando que em escala industrial quando mais alta a temperatura de operação, menor será o custo atribuído a outras etapas do processo produtivo como as de resfriamento, temperaturas mais elevadas são mais interessantes. Considerando este fator, um estudo comparativo entre as temperaturas 30°C, 32,5°C, 35°C, 37,5°C e 40°C para síntese celular e produção de polímero foi realizado.

O estudo do comportamento do crescimento microbiano através de modelos matemáticos é uma ferramenta que pode auxiliar na previsão do crescimento microbiano, sendo fundamental para o estabelecimento de estratégias de cultivo, em produção de PHAs, ou seja, sendo fundamental na predição dos resultados durante o crescimento celular sem a limitação em nutrientes. Além disso, os modelos primários de crescimento podem ser aplicados para determinar parâmetros cinéticos de cultivo em batelada (EKMEN e ALBEN, 2002).

4.1 Modelagem do crescimento de *Ralstonia eutropha* em diferentes temperaturas

A modelagem matemática do crescimento microbiano foi utilizada para se estimar parâmetros como: velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}), tempo de fase lag (λ) e aumento logarítmico da população (A) (Figura 4.1), necessários para o estudo do crescimento da bactéria sob diferentes condições. Os modelos foram aplicados para descrever o crescimento de *Ralstonia eutropha* nas diferentes temperaturas de cultivo.

Os parâmetros μ_{\max} , λ , A, foram calculados pelos modelos Gompertz Modificado (GM) e Logístico (LO).

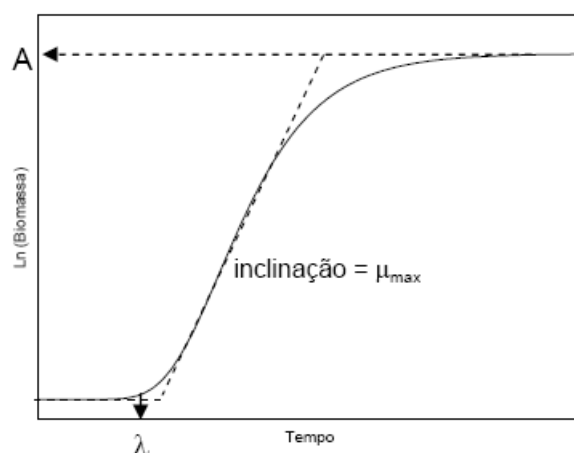


Figura 4.1 - Curva de crescimento microbiano com os parâmetros biológicos em função do tempo.

O estudo da temperatura de cultivo de *R. eutropha* também é importante pois, se houver a possibilidade de operação a temperaturas mais altas que a utilizada (30°C) em níveis industriais, é interessante em virtude da economia em algumas etapas de resfriamento.

4.2 Utilização dos Modelos Primários para descrever o comportamento de *R. eutropha* nas diferentes temperaturas de cultivo analisadas

Os modelos de GM e LO foram ajustados aos dados de crescimento de *R. eutropha* nas diferentes temperaturas de cultivo, e comparados pelos seus índices estatísticos. Os resultados das análises estatísticas realizadas para comparação dos modelos primários aplicados às curvas de crescimento de *R. eutropha* nas diferentes temperaturas de cultivo de 30°C, 32,5°C, 35°C, 37,5°C e 40°C, estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Valores dos índices estatísticos para os modelos de Gompertz Modificado e Logístico, ajustados às curvas de crescimento de *R. eutropha* nas diferentes temperaturas de cultivo.

Índices	Modelos matemáticos									
	Modelos Primários									
	Gompertz Modificado (GM)					Logístico (LO)				
	30°C	32,5°C	35°C	37,5°C	40°C	30°C	32,5°C	35°C	37,5°C	40°C
MSE^a	0,0039	0,0098	0,1257	0,0024	0,0026	0,0102	0,0214	0,0268	0,0143	0,0023
Fator bias	0,9931	0,9905	0,9896	0,9916	0,9998	0,9870	0,9881	0,9836	0,9739	0,9958
F.exatidão	1,0544	1,1009	1,0933	1,0547	1,0512	0,1090	1,143	1,1442	1,1235	1,0537
R^{2b}	0,9933	0,9922	0,9858	0,9985	0,9908	0,9826	0,9829	0,9709	0,9895	0,9900

^aMSE: erro médio quadrático; ^bR²: coeficiente de correlação.

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 para o GM e LO, observa-se que o modelo que obteve a melhor predição dos dados de crescimento de *Ralstonia eutropha* nas diferentes temperaturas testadas foi o modelo de Gompertz modificado. Sendo que os cultivos a 37,5°C e 40°C foram os que apresentaram os melhores valores de predição dos dados de crescimento de *Ralstonia eutropha*.

Os coeficientes de correlação obtidos no modelo de Gompertz Modificado estiveram acima de 0,99 nas temperaturas de 30°C, 32,5°C, 37,5°C e 40°C, apresentando valor abaixo deste, apenas na temperatura de 35°C, indicando que este modelo apresenta um bom ajuste aos dados experimentais, podendo, desta forma, ser utilizado para a predição do crescimento da bactéria.

Para o modelo Logístico, somente os cultivo a 40°C obteve o coeficiente de correlação acima de 0,99 e, nas outras temperaturas, esse coeficiente esteve entre 0,97 e 0,98, mostrando dessa maneira que o modelo Logístico apresenta ajuste inferior do que o apresentado pelo modelo de Gompertz Modificado.

O fator bias e de exatidão fornecem uma indicação objetiva do desempenho do modelo. Os valores do fator bias pelo modelo de Gompertz Modificado em todas as temperatura estiveram próximos de 1,0, com exceção da temperatura de 35°C que apresenta-se ligeiramente abaixo. Já o modelo Logístico, apresentou valor próximo a 1,0 apenas na temperatura de 40°C, para os demais cultivos a diferentes temperaturas estes valores foram inferiores a 1, indicando que o valor predito é menor que o observado.

Os valores do fator de exatidão representam quanto os preditos diferem dos observados em média. Conforme aumenta esse valor, o modelo é menos exato na média, isto é, menor a exatidão da estimativa. Os valores do fator de exatidão obtidos estão próximos de 1, em todos os parâmetros estimados pelo modelo de Gompertz Modificado e modelo Logístico.

Pode-se dizer que, para as diferentes temperaturas testadas nos cultivos, o modelo Gompertz Modificado foi o que apresentou os melhores resultados para a predição do crescimento de *Ralstonia eutropha*. Na modelagem matemática realizada por Dalcanton (2006), o mesmo comportamento com relação aos modelos testados foi observado, e sua escolha também foi por Gompertz Modificado. Devido a estes fatores, o modelo de Gompertz Modificado foi escolhido para o cálculo dos parâmetros de crescimento.

A Figura 4.2 apresenta o ajuste do modelo GM aos dados experimentais do crescimento de *R. eutropha* cultivada a diferentes temperaturas.

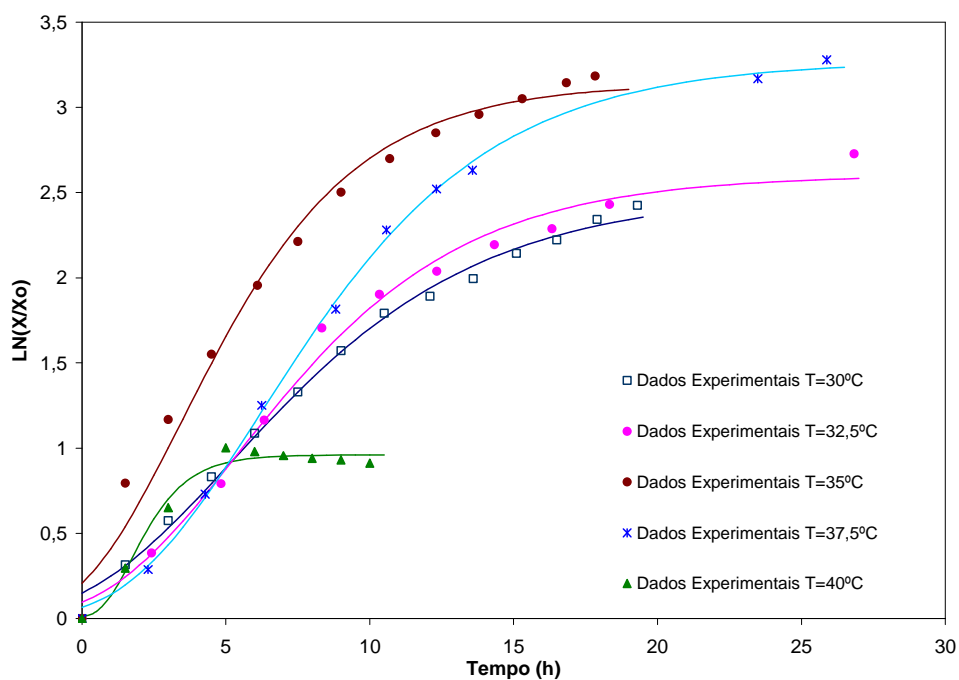


Figura 4.2 - Curvas de crescimento de *R. eutropha* em glicose expressa em $\ln(X/X_0)$ pelo tempo (h) nas temperaturas de 30°C, 32,5°C, 35°C, 37,5°C e 40°C. As linhas representam o modelo de Gompertz Modificado ajustado aos dados experimentais.

Observa-se que o modelo de GM ajusta-se perfeitamente bem aos dados obtidos através dos experimentos realizados, apresentando uma performance ligeiramente inferior na temperatura de 40°C.

A partir das curvas ajustadas (Figura 4.2) pelo modelo de Gompertz Modificado, obtiveram-se os parâmetros μ_{\max} , λ e A, para as cinco temperaturas de cultivo que são apresentados na Tabela 4.2. Os valores de duração da fase exponencial nas diferentes temperaturas de cultivo testadas encontram-se apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.2 - Parâmetros obtidos pelo modelo de Gompertz Modificado para os cultivos em glicose/frutose.

Parâmetro	Temperatura de Cultivo				
	30°C	32,5°C	35°C	37,5°C	40°C
μ_{\max} (h ⁻¹) ^a	0,18	0,21	0,33	0,26	0,32
λ (h) ^b	0,17	0,88	0	1,65	0,65
A ^c	2,50	2,60	3,14	3,27	0,96

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

Os resultados apresentados na Tabela 4.2 mostram que *Ralstonia eutropha* pode crescer nas diferentes temperaturas de cultivo testadas. Pode-se perceber que as velocidades específicas máximas de crescimento para as temperaturas de 32,5°C e 37,5°C estão de acordo com os valores encontrados na literatura, onde a faixa de crescimento encontra-se em torno de 0,23 h⁻¹ (KIM e LEE 1994, SCHNEIDER 2006)

Observa-se (Figura 4.2) que o crescimento da bactéria a 40°C, após 5 horas de cultivo, passa a sofrer um decaimento progressivo (Figura 4.2), após apresentar um crescimento acelerado na fase exponencial. Este comportamento é melhor visualizado quando se analisa o parâmetro A, onde nota-se que, a 40°C, a bactéria apresenta um aumento logarítmico da população baixo em relação às demais temperaturas de cultivo testadas, aproximadamente 71% a menos do que a concentração celular final quando comparado ao cultivo de 37,5°C. Dalcanton (2006), em seus experimentos realizados a esta temperatura também observou uma inibição do crescimento a 40°C, assim como um baixo aumento logarítmico da população quando comparado às demais temperaturas testadas.

O aumento logarítmico da população a 35°C e 37,5°C foi praticamente o mesmo, e os mais elevados, quando comparados às demais temperaturas .

A maior fase de adaptação da célula à temperatura de cultivo foi de 1,65 h para a temperatura de 37,5°C, sendo para as demais temperaturas menor que 1 h. Isto pode ser devido ao fato dos pré-inóculos terem sido cultivados à temperatura de 30°C, ocorrendo a troca de temperatura quando inoculados ao reator. Entretanto, observa-se que, em todas as temperaturas testadas, a fase de adaptação foi pequena, mostrando que não há problemas com relação à adaptação do microrganismo às diferentes temperaturas de cultivo testadas. Com relação à temperatura de cultivo 35°C observa-se que o modelo não apresentou um bom ajuste no início do cultivo, especialmente em relação ao parâmetro λ , apresentando um valor negativo para este, isto ocorre porque o modelo admite que sempre exista uma fase de adaptação, quando isto não ocorre experimentalmente, o modelo não é capaz de modelar o parâmetro apresentado valores negativos.

4.2.1 Considerações finais

Os resultados apresentados mostram que as melhores temperaturas de crescimento observadas, dentro da faixa testada, foram as de 35°C e 37,5°C. Este fato pode ser interessante, em nível industrial, por poder levar a uma diminuição do custo de resfriamento do processo de produção.

4.3 Influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento: $\mu_{\text{máx}}$, λ e A

4.3.1 Utilização dos modelos secundários para prever a influência da temperatura sobre os parâmetros de crescimento de Ralstonia eutropha

Os modelos secundários descrevem como os parâmetros do modelo primário mudam com os fatores ambientais, como o pH, temperatura, atividade de água, etc. Foram avaliados dois modelos secundários: Modelo da Raiz Quadrada e Modelo da Equação de Arrhenius para ajustes dos dados experimentais. Estes modelos foram aplicados para os parâmetros obtidos, nas diferentes temperaturas, como pode ser observado na Tabela 4.3 e Figura 4.3.

Tabela 4.3 - Coeficiente de Correlação (R^2) obtidos pelos modelos: Raiz Quadrada, Equação de Arrhenius para os parâmetros de crescimento μ , λ , A obtidos pelo modelo GM.

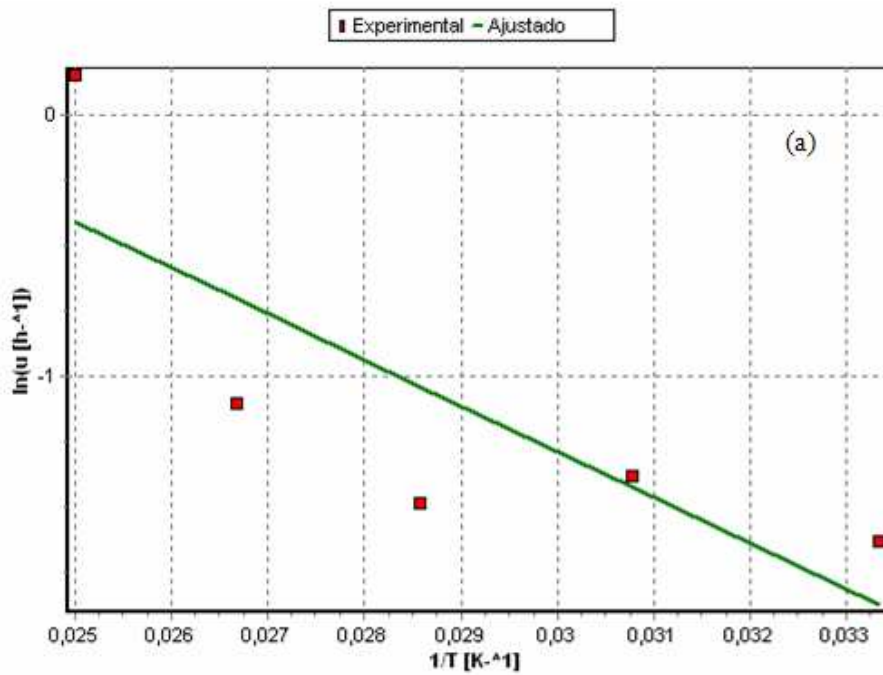
Parâmetros de crescimento	Coeficiente de Correlação (R^2) obtidos pelos modelos:	
	Eq. Arrhenius	Raiz Quadrada
μ (h^{-1})	0,64	0,65
A	0,25	0,26

O maior coeficiente de correlação obtido para μ foram de 0,65 pela Equação da Raiz Quadrada e 0,64 pela Equação de Arrhenius. Como esses coeficientes foram muito baixos, não se pode escolher um modelo que descreva a variação de μ com a temperatura. Isso acontece porque o comportamento da bactéria *R. eutropha* é bastante diferente em todas as temperaturas, principalmente nas temperaturas de 35° e 37,5°C. Não foi possível ajustar A em função da temperatura, pois os coeficientes de regressão foram muito baixos, como pode ser observado na Tabela 4.4. Os valores encontrados foram inferiores aos coeficientes de correlação para o ajuste da velocidade específica máxima de crescimento em função da temperatura.

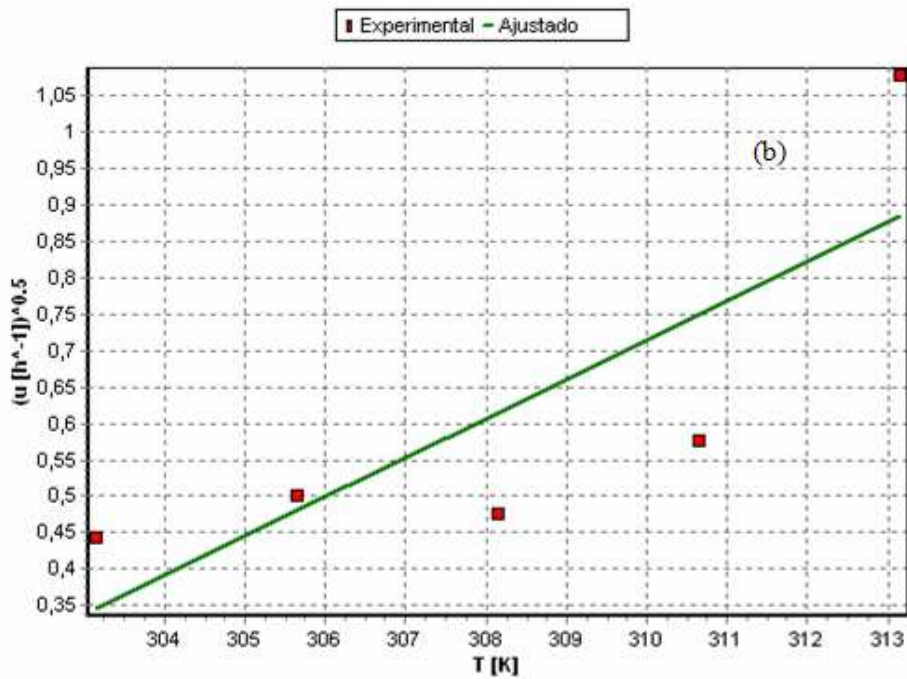
Este comportamento também foi observado por Dalcanton, (2006) em seus experimentos realizados em shaker nas mesmas condições de temperatura aqui testadas, onde o seu maior coeficiente de correlação foi de 0,60 para o modelo da Raiz Quadrada.

Não foi possível ajustar λ em função da temperatura, pois este parâmetro apresentou valor negativo para a temperatura de 35°C.

Modelo Arrhenius – Parâmetro μ



Modelo Raiz Quadrada – Parâmetro μ



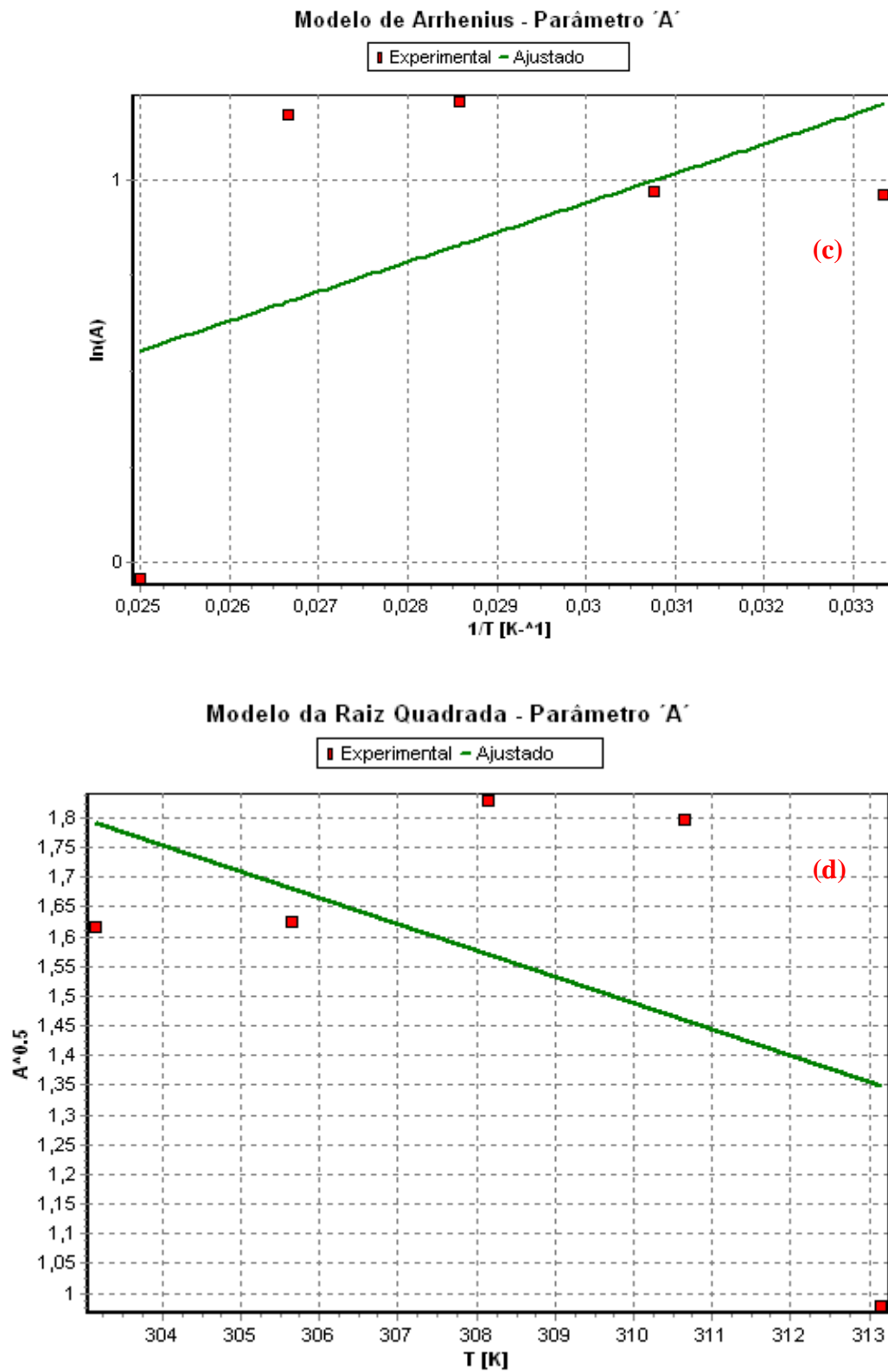


Figura 4.3 - Efeito da temperatura sobre os parâmetros μ_{max} (a),(b) e A (c),(d) para os modelos Raiz Quadrada e Equação de Arrhenius.

4.3.2 Considerações finais

Os modelos secundários não apresentaram resultados satisfatórios quando utilizados para prever a influência da temperatura nos parâmetros de crescimento de cultivo, apresentando coeficientes de correlação muito baixos em ambos os modelos testados.

Não há uma correlação entre a variação da temperatura com a variação dos parâmetros testados, levando a uma grande dificuldade de prever o comportamento do crescimento microbiano, dentro da faixa testada.

5 - ANÁLISE DO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO P(3HB) POR *RALSTONIA EUTROPHA* A DIFERENTES TEMPERATURAS

5.1 Análise do crescimento de *Ralstonia eutropha* a diferentes temperaturas

Embora os cultivos visando à produção de P(3HB) por *Ralstonia eutropha* sejam normalmente conduzidos a 30°C (ASENJO, 1995; YAN et al., 2003; KAHAR et al., 2004; SHAHHOSSEINI, 2004; KHANNA et al., 2005), há poucos relatos sobre o efeito da temperatura sobre o crescimento e produção de P(3HB) por *Ralstonia eutropha*. Grothe e colaboradores (1999) sugeriram, com base nos seus resultados, que 33°C era a temperatura ótima para o crescimento e síntese de P(3HB) por *Alcaligenes latus*.

Segundo Aragão (1996), a concentração inicial da fonte de nitrogênio ((NH₄)₂SO₄) no meio comumente utilizada é de 2,3 g.L⁻¹, suficiente para a obtenção de 5,0 g.L⁻¹ de biomassa no momento da limitação, baseado em um fator de conversão de nitrogênio em biomassa (Y_{N/X}) de 8,3 g.g⁻¹ (SCHNEIDER, 2006). Entretanto, para a realização dos cultivos a 30°C, 35°C e 40°C, utilizou-se a fonte de nitrogênio ((NH₄)₂SO₄) com uma concentração final no meio de 1,15 g.L⁻¹, suficiente para a obtenção de 2,5 g.L⁻¹ de biomassa no momento da limitação, evitando-se assim a necessidade de alimentação de fonte de carbono durante o cultivo. Este procedimento foi adotado para permitir a realização de um estudo de respirometria, que será apresentado no próximo capítulo. Os cálculos referente ao fator de conversão de nitrogênio em biomassa residual, foram feitos utilizando-se o valor de 0,24 g de N para todos os experimentos, este procedimento foi adotado, uma vez que, a quantificação de nitrogênio é feita utilizando kit colorimétrico para sua determinação, procedimento este que, apresenta muitas interferências com relação a quantificação exata, sendo bom apenas para indicar o momento da exaustão de nitrogênio mas não para indicar valores quantitativos. Nos cultivos a 32,5°C e a 37,5°C, a concentração final da fonte de nitrogênio ((NH₄)₂SO₄) no meio utilizada foi de 1,15g.L⁻¹, entretanto houve uma alimentação de fonte de carbono, visando assim estender a fase de produção do polímero.

As evoluções das concentrações (g.L^{-1}) de biomassa total e residual, polímero, proteína e nitrogênio residual, ao longo dos cultivos nas diferentes temperaturas 30°C, 32,5°C, 35°C, 37,5°C e 40°C estão mostradas nas Figuras 5.1 a 5.5, respectivamente. As culturas foram realizadas por um período de 10-27 horas, variando de acordo com o momento da limitação. Um resumo dos dados gerais obtidos nos cultivos encontra-se na Tabela 5.1

Analisando-se os resultados obtidos em todos os ensaios, observaram-se duas fases características: a fase de crescimento celular, sem limitação de nitrogênio, na qual o aumento da massa celular resulta, quase que totalmente, do aumento da biomassa residual. A duração da fase de crescimento foi variável de acordo com a temperatura utilizada. Segundo Aragão (1996), a produção de P(3HB) em condições balanceadas no meio de cultivo é de 15% a 20% da biomassa total. Pode-se observar um acúmulo de P(3HB) pouco antes da exaustão do nitrogênio, indicando que baixas concentrações de nitrogênio já são limitantes para permitir o acúmulo intracelular de polímero. Segundo Ramsay e colaboradores (1990), concentrações abaixo de 0,2g/L de nitrogênio já permitem o acúmulo de P(3HB) durante a fase de crescimento não limitado.

Neste estudo, isto pode ser confirmado quando se observa a Tabela 5.1, onde nota-se que, ao final da fase de crescimento, já foi possível detectar concentrações de P(3HB), variando de 0,01 a 0,3 g/L ou 3,7-39,6% de conteúdo de P(3HB). A segunda fase - fase de produção do polímero – inicia-se quando ocorre a limitação do nitrogênio. A linha pontilhada nas Figuras 5.1 a 5.5 indica o momento da exaustão em nitrogênio, entretanto observa-se a formação de P(3HB) antes dessa exaustão, como pode ser observado na Tabela abaixo.

A segunda linha pontilhada nas Figuras 5.2 e 5.4 indica que o momento que representa 10 horas de fase de produção. Os cálculos apresentados nas Tabelas 5.1 e 5.2 foram realizados levando-se em consideração este tempo de fase de produção em todos os cultivos testados a diferentes temperaturas, para facilitar a comparação dos resultados.

Tabela 5.1 - Tempo de duração da fase de crescimento sem limitação de Nitrogênio, fator de conversão de nitrogênio em biomassa residual, consumo de substrato, biomassa residual, biomassa total dos cultivos realizados a diferentes temperaturas.

Fase de Crescimento									
Temperatura (°C)	Tempo (h)	$Y_{Xr/N}$ (g·g) ^(a)	Substrato consumido (g/L)	$Y_{Xr/S}$ (g/g) ^(b)	P_{Xr} (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹) ^(c)	X_r final (g/L)	X_T final (g/L)	P(3HB) final g/L	P(3HB) (%)
30	9,0	8,8	6,9	0,22	0,20	2,5	2,7	0,20	7,5
32,5	10,3	9,1	9,5	0,22	0,21	2,7	4,6	1,8	39,6
35	7,5	8,2	6,0	0,33	0,26	2,3	2,6	0,3	11,6
37,5	10,6	12,9	9,3	0,33	0,29	3,5	4,4	0,9	20,9
40	10,0	3,6	11,2	0,07	0,08	1,4	1,5	0,1	3,7

^(a) fator de conversão de nitrogênio em biomassa residual, ^(b) fator de conversão de substrato em biomassa residual, ^(c) produtividade em biomassa residual.

Lee et al. (1999) relatam que, sob condições suficientes de nitrogênio, o crescimento celular é aparente a partir do aumento da concentração da biomassa residual (concentração celular menos a concentração de P(3HB)), como observado na fase de crescimento nas Figuras 5.1 e 5.5.

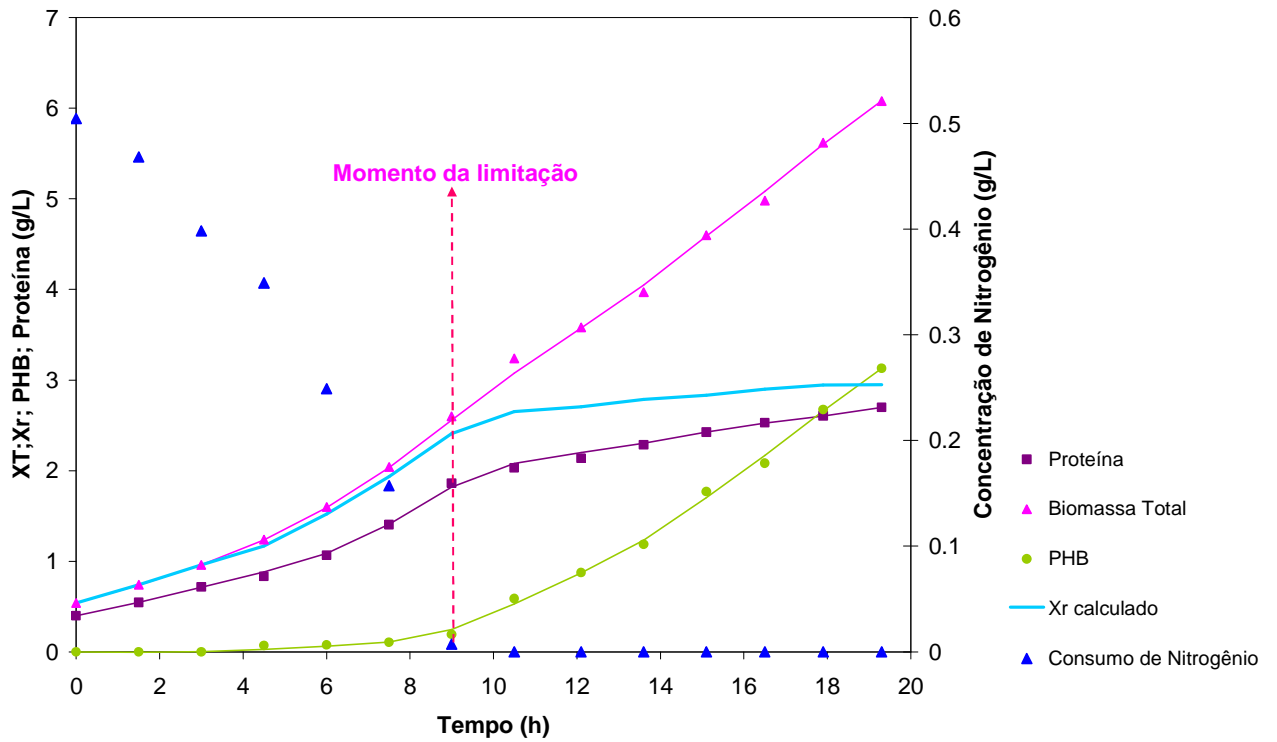


Figura 5.1 - Evoluções da Biomassa Total (XT); P(3HB); Biomassa Residual (Xr); Proteína e Consumo de Nitrogênio, expressos em g/L, em função do tempo na temperatura de 30°C. As linhas contínuas representam as curvas ajustadas pelo *software* Lissage.

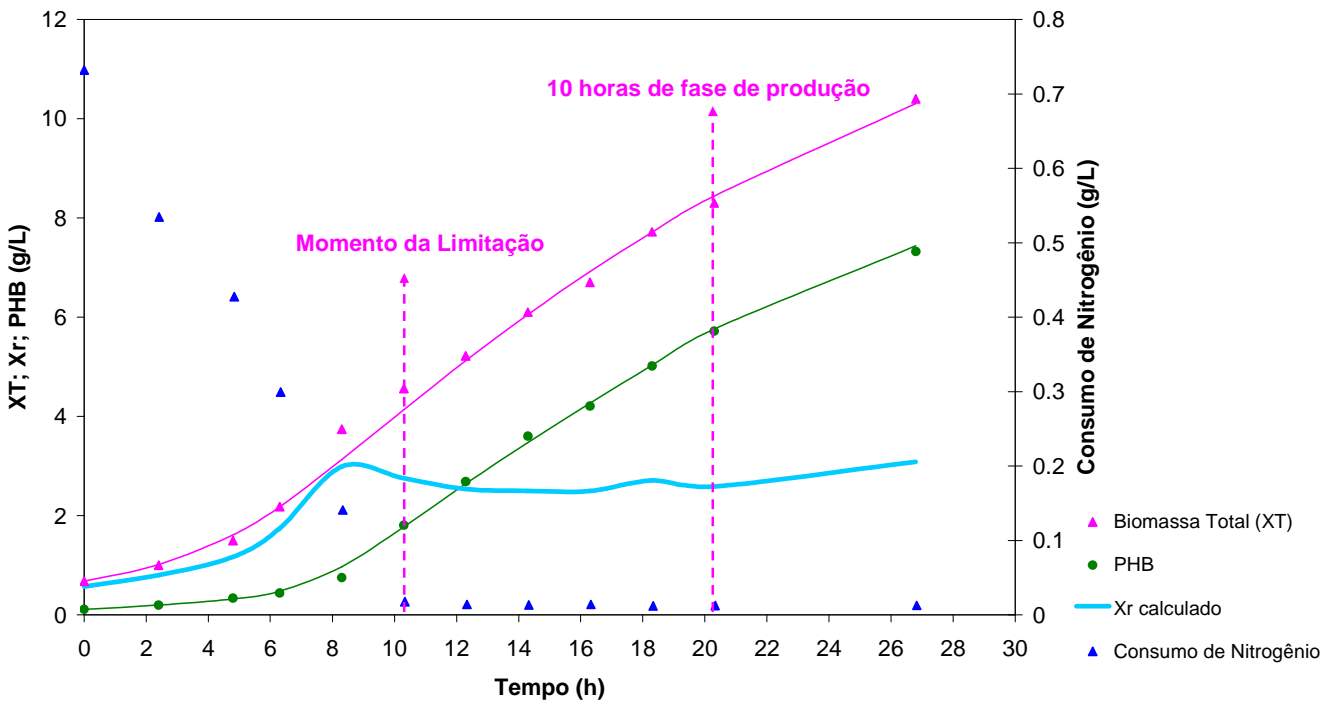


Figura 5.2 - Evoluções da Biomassa Total (XT); P(3HB); Biomassa Residual (Xr); Consumo de Nitrogênio, expressos em g/L, em função do tempo na temperatura de 32,5°C. As linhas contínuas representam as curvas ajustadas pelo *software* Lissage.

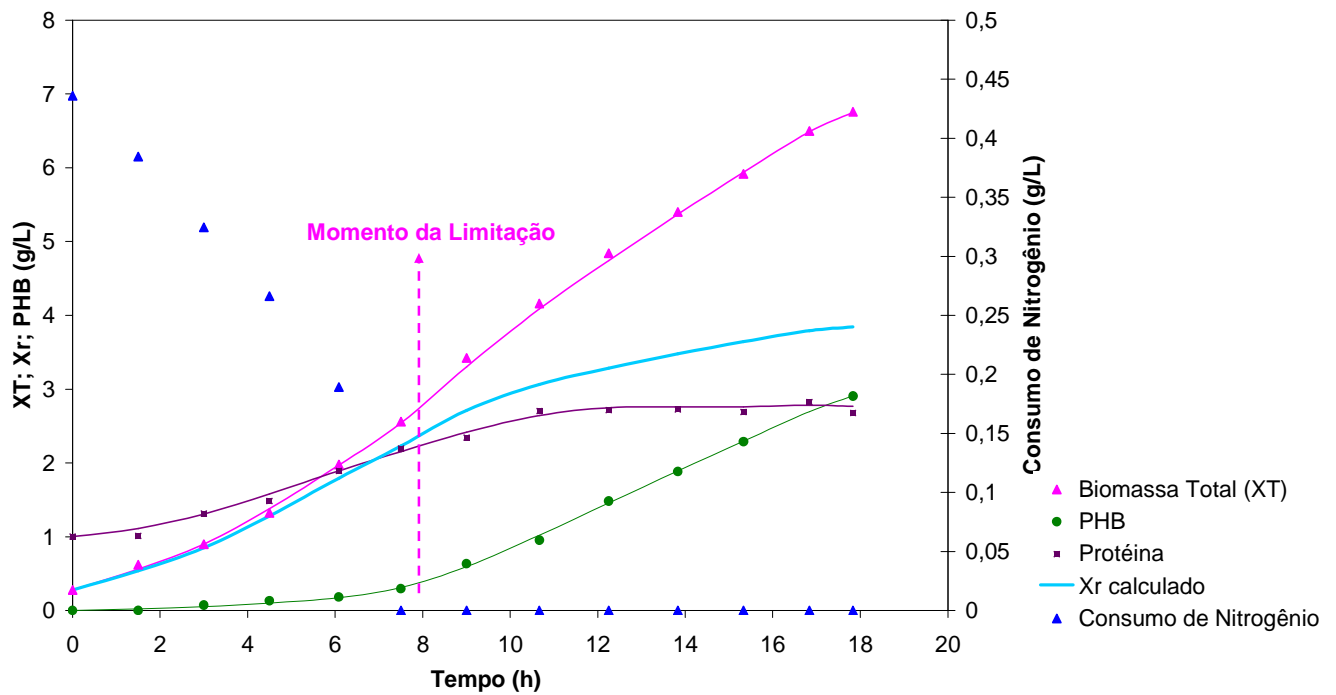


Figura 5.3 - Evoluções da Biomassa Total (XT); P(3HB); Biomassa Residual (Xr); Proteína e Consumo de Nitrogênio, expressos em g/L, em função do tempo na temperatura de 35°C. As linhas contínuas representam as curvas ajustadas pelo *software* Lissage.

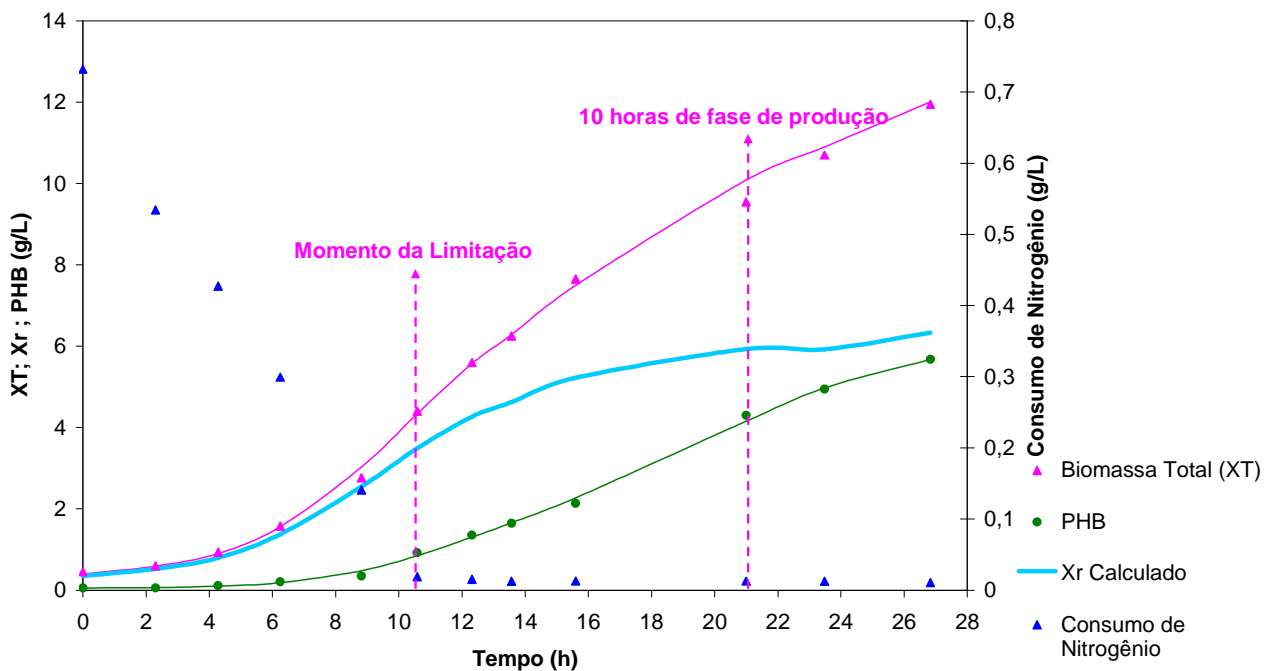


Figura 5.4 - Evoluções da Biomassa Total (XT); P(3HB); Biomassa Residual (XR); Proteína e Consumo de Nitrogênio expressos em g/L em função do tempo na temperatura de 37,5°C. As linhas representam as curvas ajustadas pelo software Lissage.

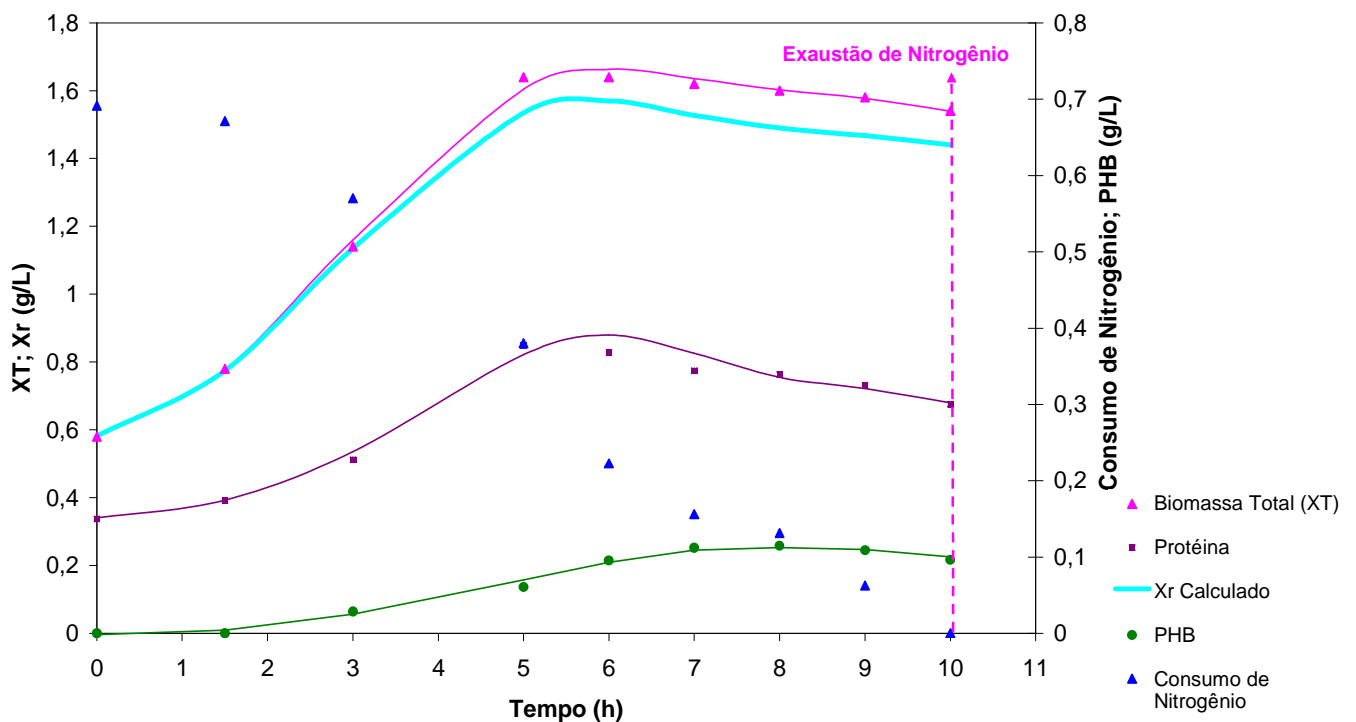


Figura 5.5 - Evoluções da Biomassa Total (XT); P(3HB); Biomassa Residual (Xr); Proteína e Consumo de Nitrogênio, expressos em g/L, em função do tempo na temperatura de 40°C. As linhas contínuas representam as curvas ajustadas pelo *software* Lissage.

Analisando-se as Figuras 5.3 e 5.4, observa-se um ligeiro aumento da biomassa residual mesmo após a exatidão da fonte de nitrogênio, sendo maior a temperatura de 37,5°C. Doi e colaboradores (1989), Aragão (1996) e Schneider (2006) também observaram este aumento e explicam que ele pode decorrer da continuidade da síntese de proteínas em função do acúmulo de nitrogênio residual intracelular. Entretanto, na Figura 5.3 a síntese de proteína no presente estudo cessa e a explicação parece pouco provável. Yamane e colaboradores (1996) constataram, ao comparar as células cultivadas em carência de nitrogênio (fase de produção do polímero) com as células cultivadas em limitação de nitrogênio, que no primeiro caso, houve um aumento dos fosfolipídeos, do peptidoglicano e da camada lipopolissacáride (LPS), com uma forte concentração de polissacárides.

O mesmo foi observado por Aragão (1996) e Schneider (2006). Os fosfolipídeos e a camada LPS são os principais constituintes da membrana externa das bactérias gram negativas (TORTORA, 2004). Esta observação permite concluir que a variação na composição da biomassa durante a exaustão em nitrogênio é devido, principalmente, ao acúmulo dos componentes lipídicos da parede celular (ARAGÃO, (1996) e SCHNEIDER, (2006)). Isto pode explicar porque, nos ensaios realizados nesse trabalho, ocorreu um aumento da biomassa residual embora a curva de proteína permanecesse constante após o esgotamento do nitrogênio.

A determinação dos valores do fator de conversão de nitrogênio em células é muito importante para definir a extensão da replicação celular sendo isto fundamental em um processo onde o acúmulo do polímero ocorre sob condições limitadas de nutrientes.

Como pode ser observado pela Tabela 5.1, o valor de biomassa residual no momento da exaustão de nitrogênio, para a temperatura padrão 30°C, foi igual ao estimado de 2,5g/L, com um fator de conversão de biomassa residual em nitrogênio ($Y_{Xr/N}$) de 8,8g/g. O valor de biomassa residual a 32,5°C, no momento da exaustão, esteve próximo ao obtido a 30°C ficando ligeiramente mais elevado 2,75g/L com um fator de conversão de ($Y_{Xr/N}$) de 9,1g/g. A 35°C, estes valores apresentaram-se um pouco abaixo do cultivo padrão, conforme mostra a Tabela 5.1. Entretanto, para o cultivo a 37,5°C, o valor de biomassa residual foi de 3,5g/L no final da fase de crescimento, apresentando um crescimento 40% maior que o cultivo padrão, e um de fator de conversão ($Y_{Xr/N}$) 12,9g/g, sendo um crescimento maior com a mesma concentração de fonte de nitrogênio utilizada em todos os cultivos.

Ensaio realizado por Schneider (2006), a 30°C e 37°C em biorreator, mostraram um comportamento semelhante em relação aos fatores de conversão para o cultivo a 30°C, com um fator de conversão ($Y_{Xr/N}$) de 8,3g/g e para o cultivo a 37°C, com um valor do fator de conversão ($Y_{Xr/N}$) de 12,5g/g.

Este fenômeno pode ter ocorrido em decorrência de uma maior permeabilidade da membrana celular com o aumento da temperatura, o que facilita o aumento da eficiência na absorção de nutrientes (PELCZAR et al., 1996) citado por Schneider (2006).

A comparação dos cultivos realizados permite observar uma maior produção de biomassa total (X_T) na fase de crescimento a 37,5°C. Esse resultado mostra que o aumento da temperatura influenciou positivamente o crescimento entre 30°-37,5°C.

Os valores dos fatores de conversão de substrato em célula ($Y_{Xr/S}$) e produtividade (P_{Xr}) na fase de crescimento (Tabela 5.1) para 30°C e 37,5°C foram de 0,22g.g⁻¹/0,20 g.L⁻¹h⁻¹ e 0,33g.g⁻¹/0,29 g.L⁻¹h⁻¹, respectivamente, confirmando assim que a temperatura mais elevada, até 37,5°C, favorece o crescimento. Os valores obtidos por Schneider (2006) em biorreator a 30 e 37°C foi de 0,32g.g⁻¹/0,32 g.L⁻¹h⁻¹ e 0,45g.g⁻¹/0,42 g.L⁻¹h⁻¹. Valores estes acima dos encontrados neste trabalho.

O mesmo fenômeno de permeabilidade da membrana celular com o aumento da temperatura pode ser observado no cultivo à temperatura de 35°C onde os valores dos fatores de conversão de substrato em célula e produtividade 0,33g.g⁻¹/0,26 g.L⁻¹h⁻¹ foram praticamente os mesmos obtidos a 37,5°C.

Uma possível explicação para o aumento da biomassa durante a fase de crescimento na temperatura de 37,5°C pode ser atribuída ao acúmulo de material celular, particularmente os componentes da parede celular. Possivelmente, a mesma mudança na composição elementar de biomassa observada durante a fase de produção a 30°C (ARAGÃO, 1996), ocorre também a 37,5°C, levando a um aumento no fator de conversão $Y_{Xr/N}$ (12,9 g X/g N), como foi verificado.

Os resultados apresentados mostram que a elevação da temperatura, de 30°C para 37,5°C, favorece o crescimento. Entretanto, a temperaturas mais altas pode ocorrer inibição do crescimento, como observado a 40°C (Figura 5.5).

5.1.1 Considerações Finais

Após a avaliação da fase de crescimento de *Rastonia eutropha* através da modelagem matemática e dos parâmetros aqui analisados concluiu-se que a temperatura de 37,5°C favorece o crescimento desta bactéria. Confirmando assim as informações obtidas por Schneider (2006), à temperatura de 37°C.

5.2 Produção de P(3HB) em diferentes temperaturas de cultivo

No item anterior, foi observado que, em temperaturas de cultivo acima do padrão 30°C, o crescimento celular é favorecido, tendo seu melhor desempenho à temperatura de 37,5°C. Neste item, será analisado se esta elevação na temperatura também favorece o acúmulo do polímero.

A Figura 5.6 apresenta a evolução da produção de P(3HB) nas diferentes temperaturas de cultivo testadas e a Tabela 5.2 apresenta os valores de conversão de substrato em biomassa residual, porcentagem de polímero P(3HB) na célula, produtividade em biomassa residual, produtividade em conteúdo de P(3HB), e fator de conversão de substrato em polímero.

A fase de produção foi de 10 horas para os cultivos a 30°C, 32,5°C, 35°C e 37,5°C. A 40°C, não foi possível fixar este tempo uma vez que, a esta temperatura, o microrganismo teve seu crescimento inibido antes mesmo da sua limitação em nitrogênio. O início da fase de produção encontra-se indicada pela seta no ponto de limitação do cultivo.

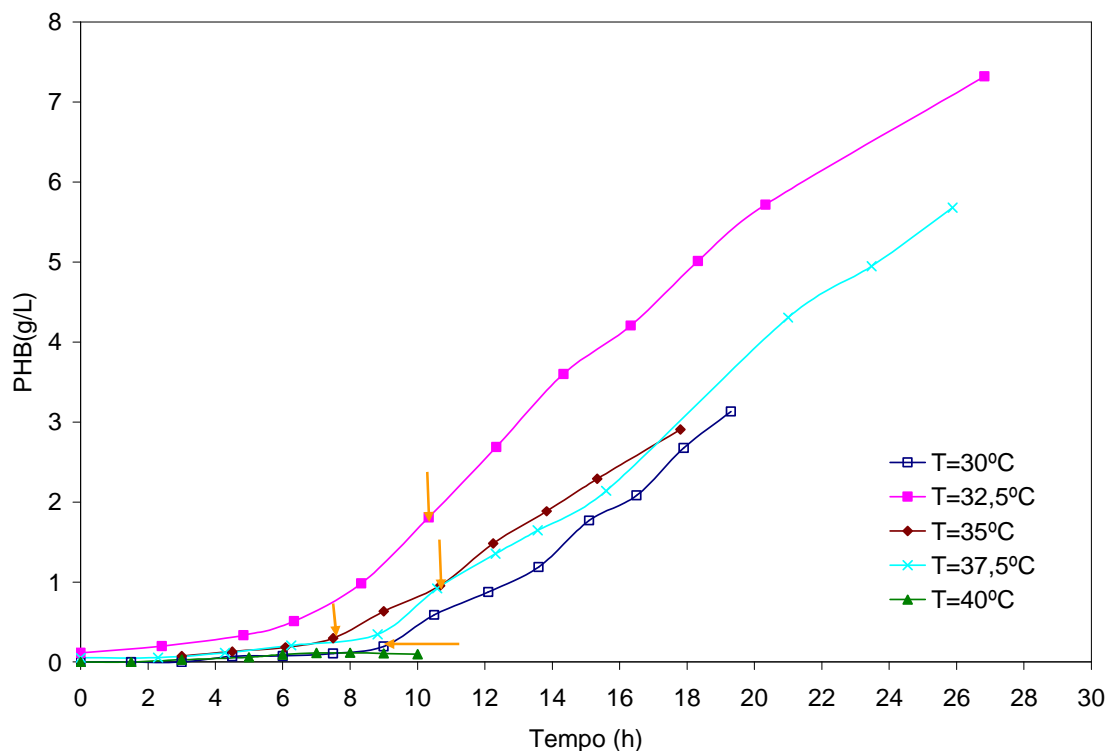


Figura 5.6 - Evolução da concentração de P(3HB) (g/L) em função do tempo nas diferentes temperaturas de cultivo testadas.

Em relação à produção de P(3HB), após 10 horas de limitação final dos cultivos, o conteúdo de P(3HB) no interior da célula variou de 5,7 e 2,9 g/L e teve um o fator de conversão

$Y_{P(3HB)/S}$ que variou de 0,84 e 0,26g/g, respectivamente para as temperaturas de 32,5 e 35°C, para a temperatura de 37,5°C obteve-se 4,3g/L de célula e $Y_{P(3HB)/S}$ 0,52g/g como pode ser observado na Tabela 5.2. Esse resultado mostra que a cultura realizada a 37,5°C favorece o crescimento, como visto na fase anterior a este item, entretanto com menor acúmulo e produtividade de P(3HB) quando comparado à temperatura de 32,5°C.

Tabela 5.2 - Fator de conversão, produtividade e porcentagem de P(3HB) ao longo da fase de produção de P(3HB).

Temperatura	Fase de Produção				
	$Y_{Xr/S}$ (g/g) ^(a)	Concentração de P(3HB) (g/L) ^(b)	$P_{P(3HB)}$ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^(c)	$Y_{P(3HB)/S}$ (g/g) ^(d)	Conteúdo de P(3HB) (%)
30°C	0,09	3,1	0,28	0,48	51
32,5°C	0,05	5,7	0,23	0,84	69
35°C	0,16	2,9	0,25	0,26	43
37,5°C	0,19	4,3	0,32	0,52	45
40°C	-	-	-	-	-

^(a) Fator de conversão de substrato em biomassa residual, ^(b) % de P(3HB), ^(c) produtividade em conteúdo de P(3HB), ^(d) conversão de substrato em P(3HB).

O fator de conversão de substrato em célula para temperatura de 30°C (0,09g/g) é próximo ao encontrado por Schneider (2006) em seus cultivos em biorreator a esta temperatura (0,10g/g).

Através dos dados apresentados na Tabela 5.2 para o conteúdo de P(3HB) acumulado no interior da célula, é possível verificar que as melhores temperaturas para a sua produção são 32,5°C e 30°C. Foi também possível constatar que o cultivo realizado à temperatura de 32,5 °C foi o que apresentou o melhor valor em relação ao acúmulo do biopolímero, ocasionando um aumento de 18% a mais no conteúdo de P(3HB), se comparado à produção na temperatura padrão de 30°C.

Embora 37,5°C seja a melhor temperatura para o crescimento, não foi a melhor para a produção. Foi observado que a elevação da temperatura acima de 32,5°C promove um declínio na produção de P(3HB). A partir destes resultados, foi realizado um estudo mais detalhado nas melhores condições de produção (30 e 32,5°C), com duração de 16,5 h de fase de produção, comparando-se com a temperatura de 37,5°C, que foi a melhor para o crescimento.

5.3 Avaliação da produção de P(3HB) em diferentes temperaturas

No item anterior foi avaliado a produção de P(3HB) nas diferentes temperaturas de cultivo durante 10 horas de fase de produção. Neste item irá ser avaliado o comportamento da produção de P(3HB) estendendo-se este tempo para 16,5 horas. Para isto foram escolhidas as temperaturas que apresentaram os melhores resultados nos itens anteriores temperaturas de 30°C, 32,5°C e 37,5°C.

Os valores de conversão de substrato em biomassa residual, porcentagem de polímero P(3HB) na célula, produtividade em biomassa residual, produtividade em conteúdo de P(3HB), e fator de conversão de substrato em polímero, são mostrados nas Figuras 5.7 a 5.10, respectivamente. As culturas foram realizadas por um período aproximado de 27 horas, variando de acordo com o momento da limitação. Um resumo dos dados gerais obtidos nos cultivos encontra-se na Tabela 5.3.

Em relação à produção de P(3HB), ao final dos três cultivos, observa-se que, no cultivo realizado a 32,5°C, o conteúdo de P(3HB) no interior da célula atingiu 7,3g.L⁻¹, seguido das temperaturas de 30°C e 37,5°C onde ambas apresentaram praticamente o mesmo valor 5,8-5,7g.L⁻¹. O fator de conversão $Y_{P(3HB)/S}$ obtido variou de 0,37 e 0,20g/g, respectivamente para as temperaturas de 30 e 37,5°C, para a temperatura de 32,5°C obteve-se 0,33g/g como pode ser observado na Tabela 5.3. A produtividade obtida nos diferentes cultivos variou de $P_{P(3HB)}$ 0,33 a 0,47 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente, nas temperaturas de 30°C e 32,5°C. A produtividade a 37,5°C foi praticamente a mesma obtida a 32,5°C, ou seja, 0,45g.L⁻¹.h⁻¹.

A temperatura de 32,5°C foi a que apresentou o maior índice de P(3HB), em porcentagem, ao final de 16,5 horas de fase de produção, atingindo um valor de 70,3 %. Seguido da temperatura de 30°C (49,5%) e 37,5°C (47,5%), confirmando assim o resultado obtido nos cultivos anteriores onde também a 32,5°C foi obtido o maior índice de P(3HB) no interior da célula.

Esta comparação entre as evoluções das porcentagens de P(3HB) nas diferentes temperaturas de cultivo é melhor visualizada quando se observa a Figura 5.10, onde nota-se claramente a maior porcentagem adquirada na temperatura de 32,5°C.

Através da Figura 5.10 também é possível visualizar que, após 20,3 horas de fase produção não ocorre mais aumento na porcentagem de P(3HB), fazendo-se necessário o uso de estratégias de cultivo para aumentar a produção de P(3HB), como cultivos em alta densidade com alimentação do elemento limitante, um breve estudo sobre este assunto será discutido nesse trabalho nos próximos itens.

Tabela 5.3 - Fator de conversão, produtividade e porcentagem de P(3HB) ao longo das fases de crescimento e produção de P(3HB).

Temperatura (°C)	Fase de Produção					
	tempo de fase de produção (h)	$Y_{Xr/S}$ (g/g) ^(a)	Concentração de P(3HB) (g/L) ^(b)	$P_{P(3HB)}$ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^(c)	$Y_{P(3HB)/S}$ (g/g) ^(d)	Conteúdo de P(3HB) (%)
30	16,5	0,22	5,8	0,33	0,37	49,5
32,5	16,5	0,02	7,3	0,47	0,33	70,3
37,5	16,5	0,12	5,7	0,45	0,20	47,5

(a) Fator de conversão de substrato em biomassa residual, ^(b) concentração no final da fase de produção, ^(c) produtividade em conteúdo de P(3HB), ^(d) conversão de substrato em P(3HB).

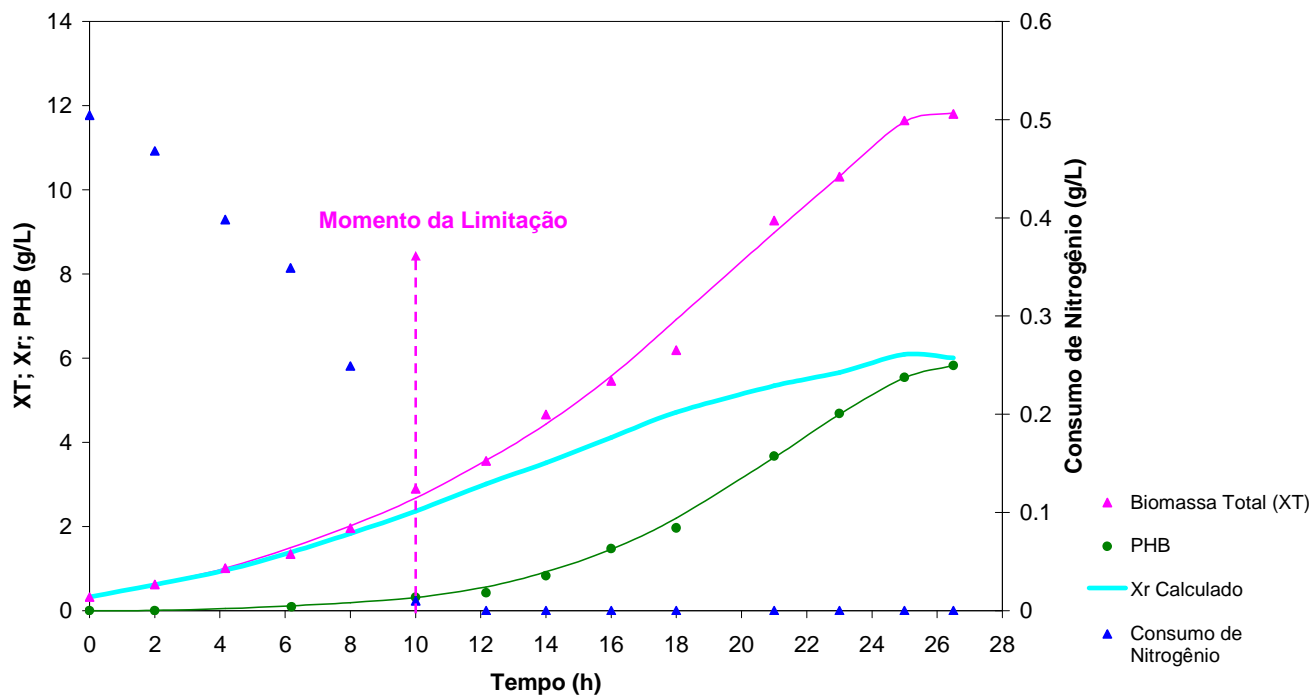


Figura 5.7 - Evoluções da Biomassa Total (XT); P(3HB); Biomassa Residual (Xr) e Concentração de Nitrogênio expressos em g/L em função do tempo na temperatura de 30°C. As linhas contínuas representam as curvas ajustadas pelo *software* Lissage.

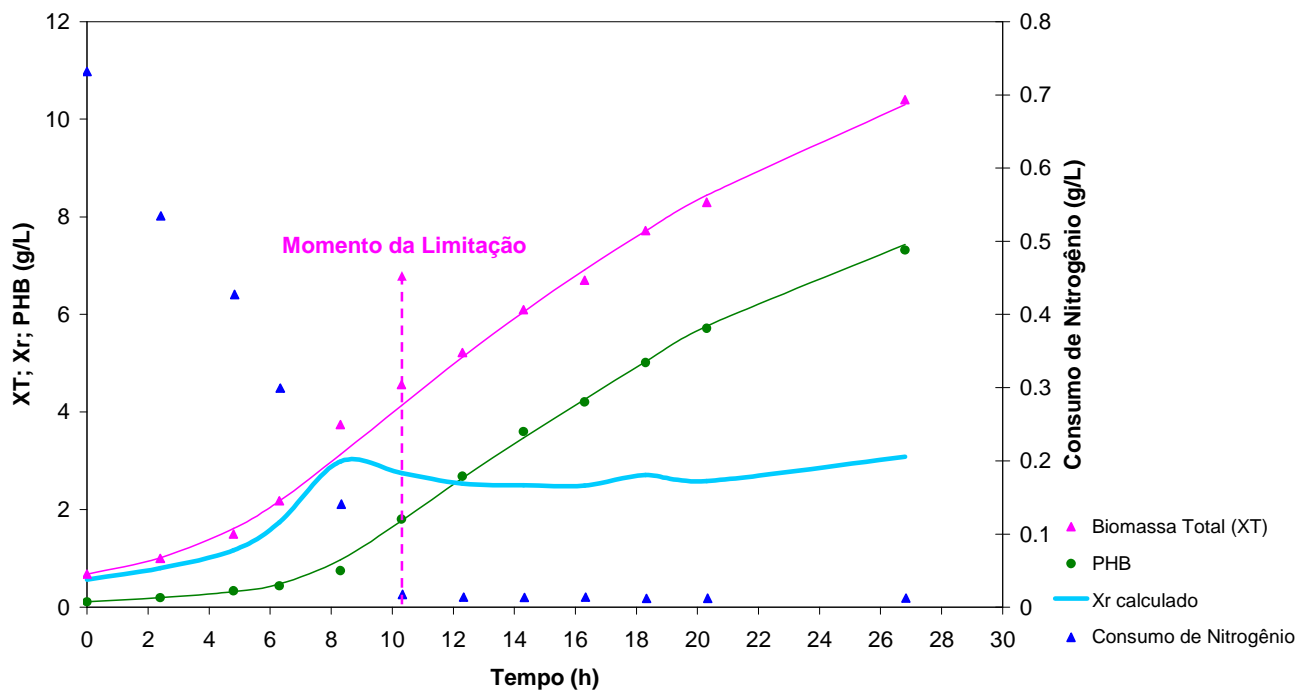


Figura 5.8 - Evoluções da Biomassa Total (XT); P(3HB); Biomassa Residual (Xr) e Concentração de Nitrogênio expressos em g/L em função do tempo na temperatura de 32,5°C. As linhas contínuas representam as curvas ajustadas pelo *software* Lissage.

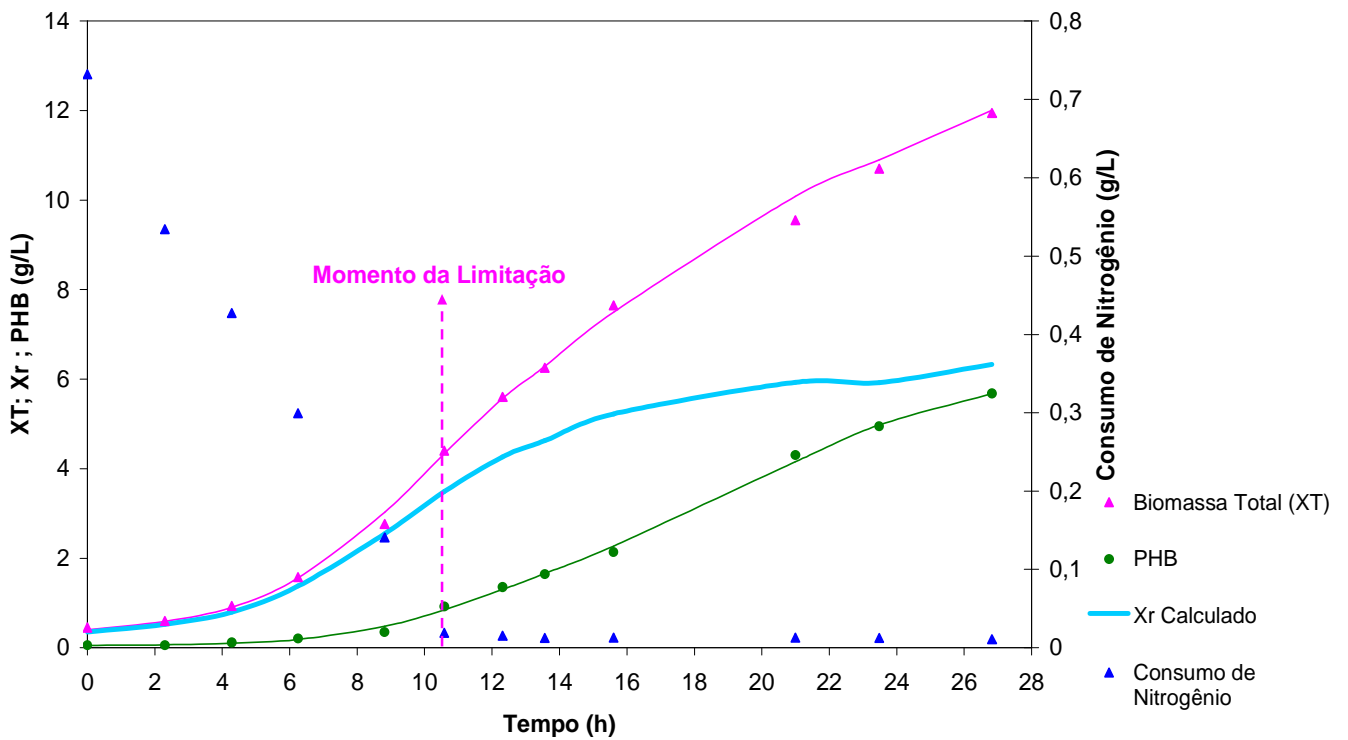


Figura 5.9 - Evoluções da Biomassa Total (XT); P(3HB); Biomassa Residual (Xr) e Concentração de Nitrogênio expressos em g/L em função do tempo na temperatura de 37,5°C. As linhas contínuas representam as curvas ajustadas pelo software Lissage.

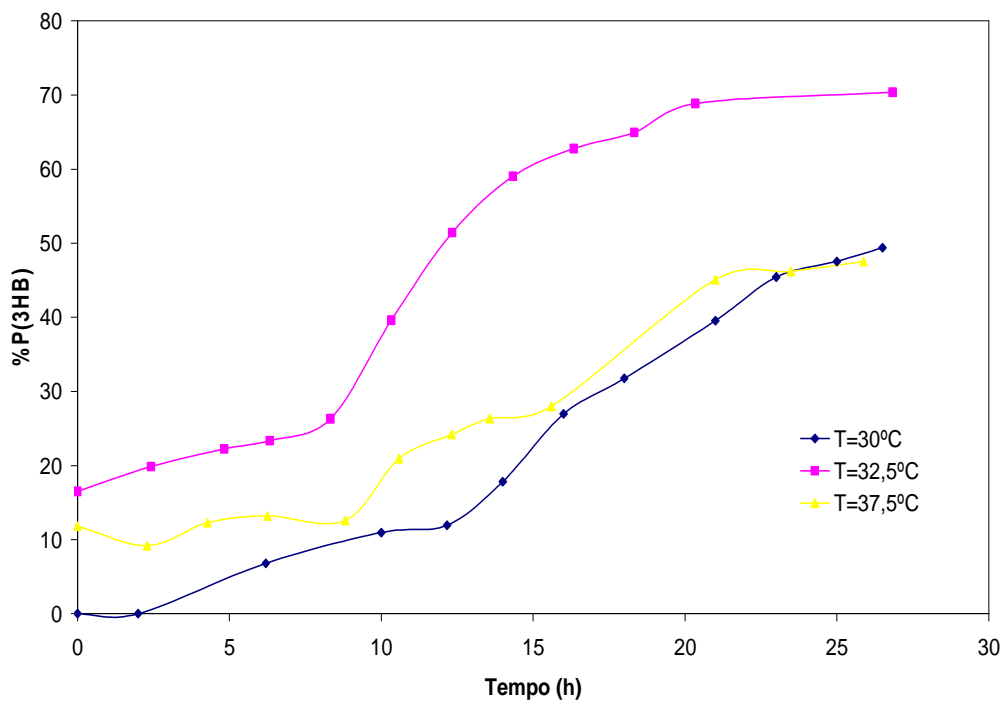


Figura 5.10 - Evoluções da Porcentagem de P(3HB) em função do tempo (h) para as diferentes temperaturas de cultivo 30°C, 32,5°C e 37,5°C.

6 - UTILIZAÇÃO DA ANÁLISE RESPIROMÉTRICA NO ACOMPANHAMENTO DE CULTURAS PARA A PRODUÇÃO DE *P(3HB)*.

6.1 Determinação do K_La e QO_2 durante o cultivo

A análise respirométrica envolvida em processos biológicos fornece valiosas informações para a caracterização desses processos, com a vantagem de ser uma técnica que não interfere com o processo e que não causa riscos de contaminações (FERREIRA et al., 1998).

Os primeiros a se ocuparem da técnica respirométrica foram Jenkins (1960) e Montgomery (1967), tendo como base seus próprios estudos experimentais sobre a quantificação do consumo de oxigênio dissolvido em sistemas de lodos ativados.

Em praticamente todos os processos biológicos envolvendo microrganismos vivos, ocorre o consumo e a produção de gases ou voláteis, quer se trate de bactérias, leveduras, fungos, células animais e de insetos ou células vegetais. Em qualquer fermentação microbiana aeróbica, existe consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono (FERREIRA et al. 1998). Zabriskie e Humphrey (1978) descreveram um modelo, exclusivamente baseado em parâmetros respiratórios, para a quantificação indireta de concentrações microbianas (biomassa). De acordo com estes autores, o modelo é satisfatório para microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos utilizando, apenas, a via glicolítica e o ciclo de Krebs para a produção de energia.

Na presença de células ativas e na ausência de aeração, Taguchi e Humphrey (1966) utilizaram a atividade respiratória dos microrganismos para remover o oxigênio do meio e determinar o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La), grandeza esta de suma importância para o dimensionamento do sistema de transferência de oxigênio em um processo aeróbio.

Este método tem a vantagem de ser realizado durante uma fermentação fornecendo um resultado mais realista do K_La . O procedimento envolve duas etapas, uma de parada da aeração e outra de retomada da aeração nas condições de operação. Assim, na primeira etapa, o monitoramento do decréscimo da concentração de oxigênio dissolvido permite determinar a velocidade específica de consumo de oxigênio. A aeração é retomada antes de ser atingido o valor crítico da concentração de oxigênio, valor abaixo do qual o consumo de oxigênio é limitado. Segundo Tribe et al., (1995), é aconselhável retomar a aeração, quando se atinge 20 % do valor da concentração de saturação. A necessidade de oxigênio por um microrganismo depende da natureza bioquímica da célula e do seu ambiente nutricional.

Na Figura 6.1, é apresentada uma curva típica da evolução da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo, obtida durante a execução do método dinâmico. Esta curva é utilizada para determinar a velocidade específica de respiração (QO_2) e o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La).

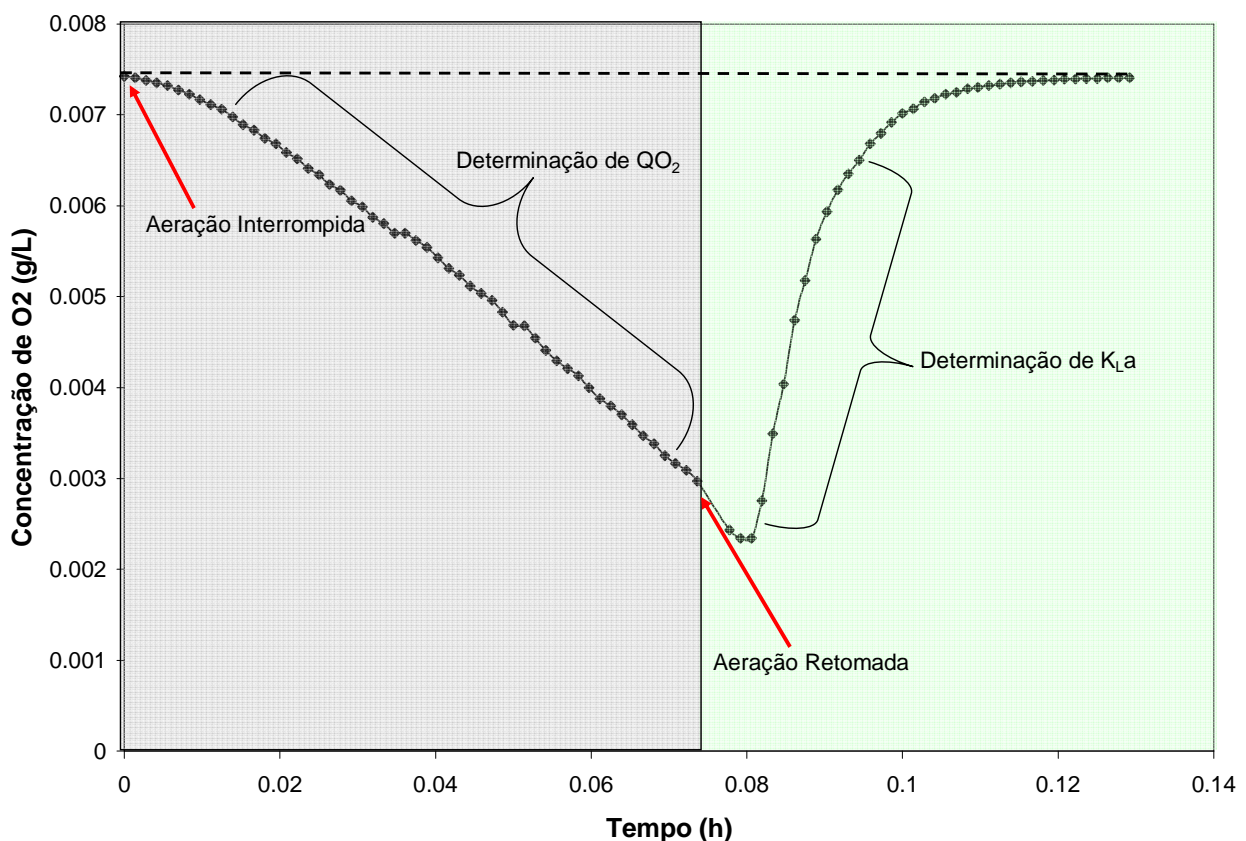


Figura 6.1 - Variação da concentração de O_2 dissolvido durante a realização do método dinâmico.

6.2 Ensaio preliminar para a determinação das melhores condições para determinação de QO_2

A fonte de carbono é talvez o fator que tenha maior influência no crescimento de um microrganismo. Em estudos realizados por Ienczak, 2006, o autor observou que concentrações de açúcares redutores totais acima de 40 g.L^{-1} começaram a causar inibição do crescimento de *Ralstonia eutropha*. Segundo Kim e colaboradores (1994), *R. eutropha* utiliza glicose eficientemente como fonte de carbono com uma velocidade específica máxima de crescimento de $0,23 \text{ h}^{-1}$, em concentrações de glicose em torno de 20 g.L^{-1} . Além disto, foi observado por Oliveira (1999) que em valores abaixo de 10 g.L^{-1} ocorre limitação no crescimento desta bactéria.

Foram realizados dois experimentos com objetivo de se verificar o comportamento do crescimento de *Ralstonia eutropha*, em concentrações de substrato abaixo de 10 g/L . Estes ensaios também tiveram como objetivo definir a melhor condição de agitação para o acompanhamento da QO_2 . As duas condições de agitação e aeração testadas para a determinação de QO_2 foram 600 rpm e $0,125 \text{ vvm}$ e 900 rpm e $0,125 \text{ vvm}$, respectivamente. Na primeira situação, as determinações foram feitas apenas com a interrupção da aeração e, na segunda, com a interrupção da aeração e agitação diminuída para 300 rpm , a fim de se verificar a influência de uma eventual transferência de oxigênio na superfície do líquido em agitação. Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 6.2 e 6.3, para as situações 600 rpm e $0,125 \text{ vvm}$ e 900 rpm e $0,125 \text{ vvm}$, respectivamente.

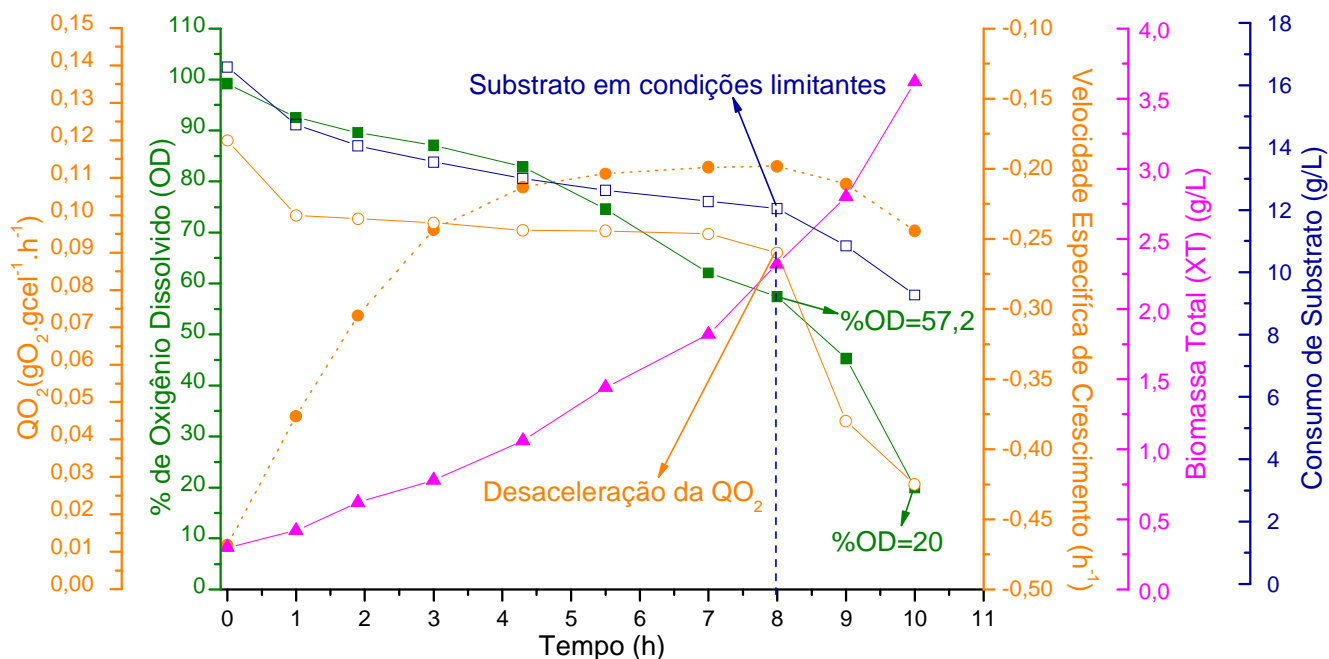


Figura 6.2 - Acompanhamento do consumo de substrato (□), evolução da biomassa total (XT) (▲) em (g/L), velocidade específica de crescimento (μ) (h^{-1}) (●), determinação de QO_2 ($gO_2/gcel \cdot h$) (○) e porcentagem de oxigênio dissolvido (■) sob agitação de 600 rpm e 0,125 vvm em função do tempo de cultivo (h). A linha pontilhada indica o momento em que ocorre a limitação do substrato (---).

Analisando-se a Figura 6.2, observa-se que, até 12 g/L de substrato, a QO_2 permanece constante com um valor aproximado de $0,09gO_2/gcel \cdot h$. Para concentração de substrato inferior a essa, a cultura começa a sofrer uma desaceleração na sua velocidade específica de respiração sofrendo uma queda de $0,09gO_2/gcel \cdot h$ para $0,02gO_2/gcel \cdot h$. É possível notar ainda que, a porcentagem de oxigênio no momento da limitação encontra-se acima do limite crítico de 20%, o que descarta a possibilidade da desaceleração da velocidade específica de respiração ter sido provocada pela limitação em oxigênio. Isto indica que, em concentrações em torno de 12 g/L de substrato, o microrganismo começa a sofrer limitação no seu crescimento.

Quanto à agitação e aeração, observa-se que, a 600 rpm e 0,125 vvm, não foi possível obter um acompanhamento mais prolongado da cultura, uma vez que, em 10 horas de cultivo, a porcentagem da concentração de O_2 dissolvido no meio tornou-se crítica, ficando abaixo dos 20%, mínimo exigido para que a célula mantenha sua atividade metabólica normal.

A Figura 6.3 apresenta o mesmo comportamento de desaceleração na velocidade específica de respiração com relação à concentração de substrato limitante no meio, visto nas figuras anteriores. Entretanto, neste ensaio, a cultura foi mantida até se atingir uma concentração de substrato próxima a zero, com o intuito de melhor visualizar o seu comportamento perante esta limitação.

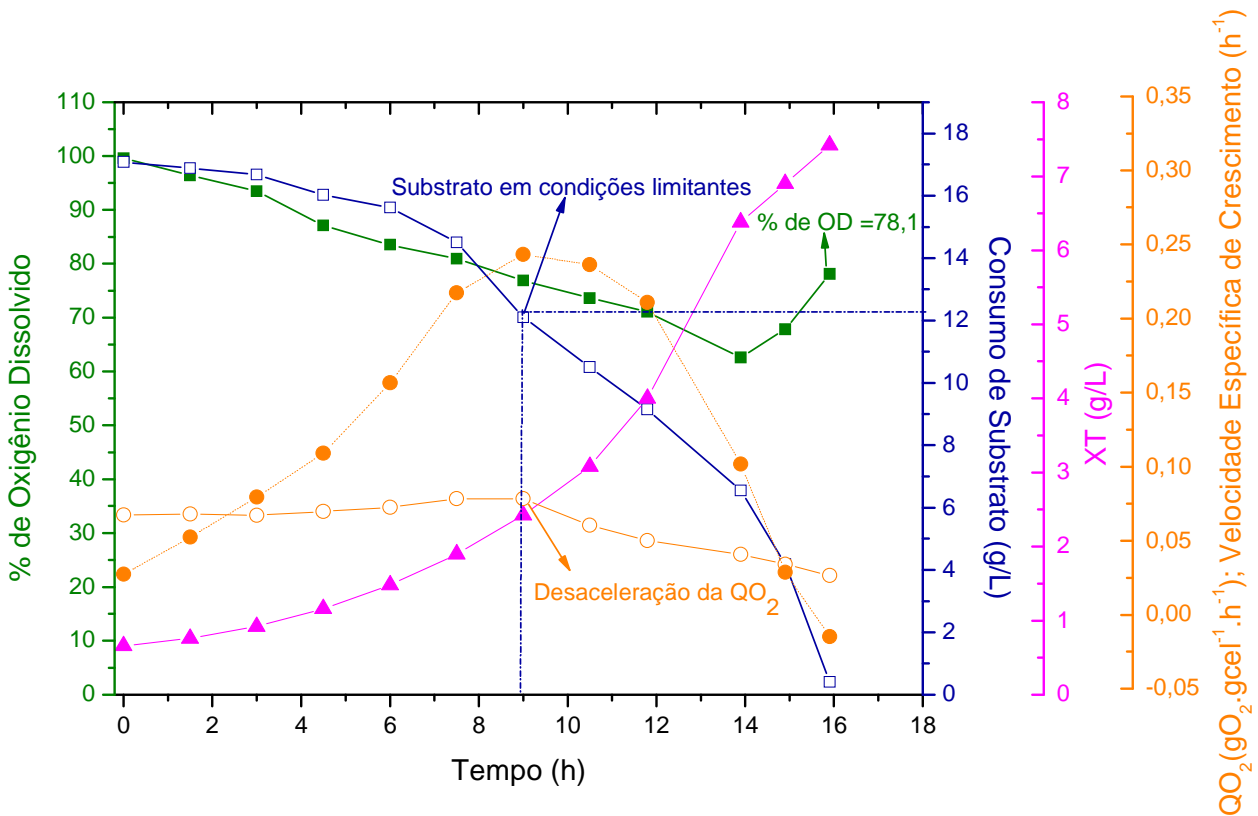


Figura 6.3 - Acompanhamento do consumo de substrato (□), evolução da biomassa total (XT) (▲) em (g/L), velocidade específica de crescimento (μ) (h^{-1}) (●), determinação de QO_2 ($\text{gO}_2/\text{gcel.h}$) (○) e porcentagem de oxigênio dissolvido (■) sob agitação de 900 rpm e 0,125 vvm em função do tempo de cultivo (h). A linha pontilhada indica o momento em que ocorre a limitação do substrato (---).

Nota-se que a QO_2 decresce com o consumo de substrato, assim como a velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ), chegando ambas próximas de zero quando a concentração de substrato é praticamente zero. Conclui-se que, em concentrações abaixo de 10-12 g/L, o microrganismo *Ralstonia eutropha* sofre inibição no seu crescimento, confirmando assim o que já havia sido observado por Oliveira (1999).

Através destes ensaios, foi possível definir a velocidade de agitação a ser utilizada nos estudos posteriores. Observa-se que, a 600 rpm e 0,125 vvm, não foi possível o acompanhamento total do cultivo, sendo necessário elevar esta porcentagem de O₂ dissolvido no meio para que não se torne crítica. A 900 rpm e 0,125 vvm, foi possível a determinação de todas as grandezas do início ao fim do cultivo. Dessa forma, adotou-se esta agitação e aeração como padrão nos experimentos posteriores, com manutenção de 300 rpm durante as medidas.

6.3 Estudo de QO₂ como indicativo de limitação no meio a diferentes temperaturas

Após a fase inicial de produção de biomassa, o acúmulo de P(3HB) é favorecido pela limitação de um elemento nutritivo como oxigênio, magnésio, potássio, enxofre, nitrogênio ou fósforo (SCHLEGEL et al., 1961; DAWES e SENIOR 1973; OEDINH et al., 1973; ASENJO et al., 1995; KIM et al., 1996).

A análise respirométrica permite calcular grandezas como a respiração e a velocidade específica de crescimento, que fornecem importantes informações sobre o estado fisiológico das células. A relação direta destas grandezas estimadas com o estado fisiológico das culturas, torna-as excelentes medidas de controle em processos biológicos.

Neste trabalho, foi escolhido como elemento limitante o nitrogênio, pois o crescimento da biomassa é mais dependente deste elemento, já que 95% do nitrogênio metabolizado é utilizado na síntese de proteínas (REPASKE e REPASKE, 1976). Como as proteínas representam cerca de 60% da biomassa residual, o nitrogênio é facilmente consumido, o que facilita o controle do crescimento limitado.

Como a determinação da quantidade de nitrogênio presente no meio durante os cultivos é realizada através de Kit colorimétrico, sendo a coloração de sua reação facilmente alterada pela composição do meio, decidiu-se testar a QO₂ como ferramenta na determinação exata da exaustão deste nutriente e produção de P(3HB). Os ensaios foram realizados a diferentes temperaturas uma vez que estas estavam sendo avaliadas para o crescimento celular e produção de P(3HB).

Em sistemas homogêneos, muitas variáveis podem afetar a velocidade global de reação, podendo-se destacar a velocidade de transferência de massa através das fases, as características hidrodinâmicas do reator e os parâmetros cinéticos intrínsecos. Em muitos sistemas aeróbios, a disponibilidade de oxigênio para os microrganismos depende da transferência de massa, bem como da velocidade com que o oxigênio dissolvido é utilizado. Por causa da sua baixa solubilidade na

água, a velocidade de transferência de oxigênio desde a bolha de gás até as células pode ser o fator limitante, que determina a velocidade de conversão biológica (KARGI & MOO-YOUNG, 1985).

Visando minimizar esses fatores, a concentração de nitrogênio nestes experimentos foi reduzida em 50% de modo a se produzir uma concentração celular menor, evitando-se assim possíveis interferências na determinação de QO_2 . A concentração da fonte de carbono foi mantida em 20 g/L. As determinações de QO_2 e K_La fora realizadas às temperaturas de 30°C, 32,5°C e 35°C.

Os dados obtidos nestes experimentos encontram-se nas Figuras 6.4 a 6.6, respectivamente ,para as temperaturas de 30°C, 32,5°C e 35°C.

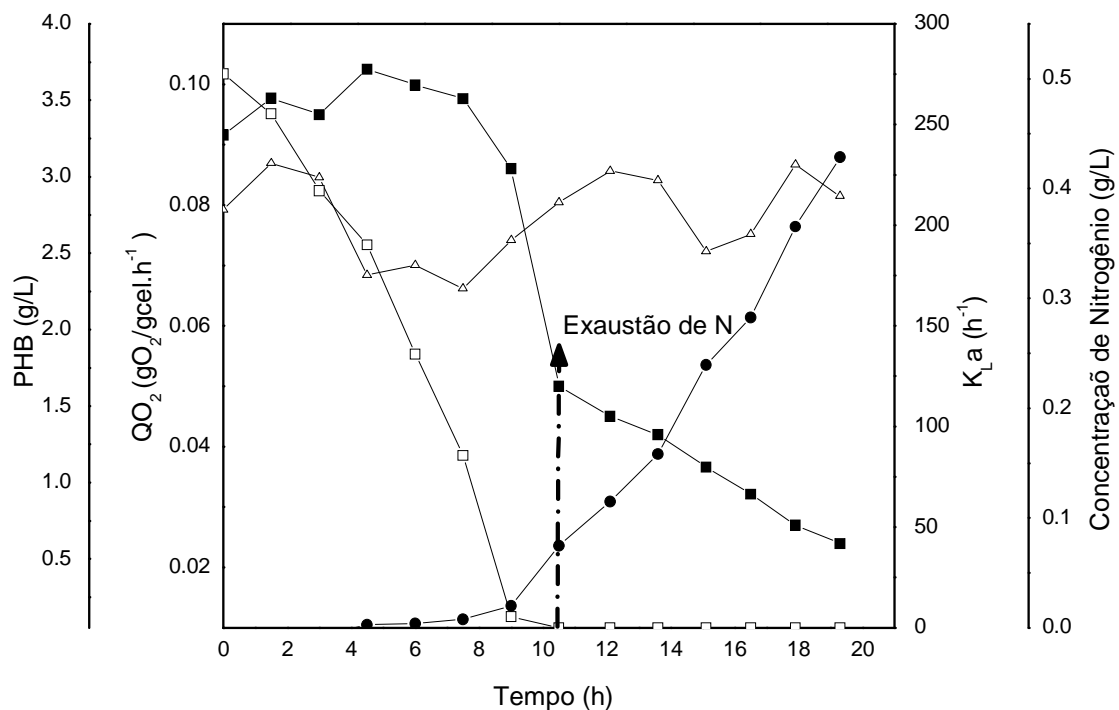


Figura 6.4 - Evolução do consumo de nitrogênio (g/L) (□), produção de P(3HB) (●), determinação de QO_2 (gO₂/gcel.h) (■) e K_La (h⁻¹) (Δ) em função do tempo de cultivo a 30°C. A linha pontilhada indica o momento em que ocorre a exaustão em nitrogênio.

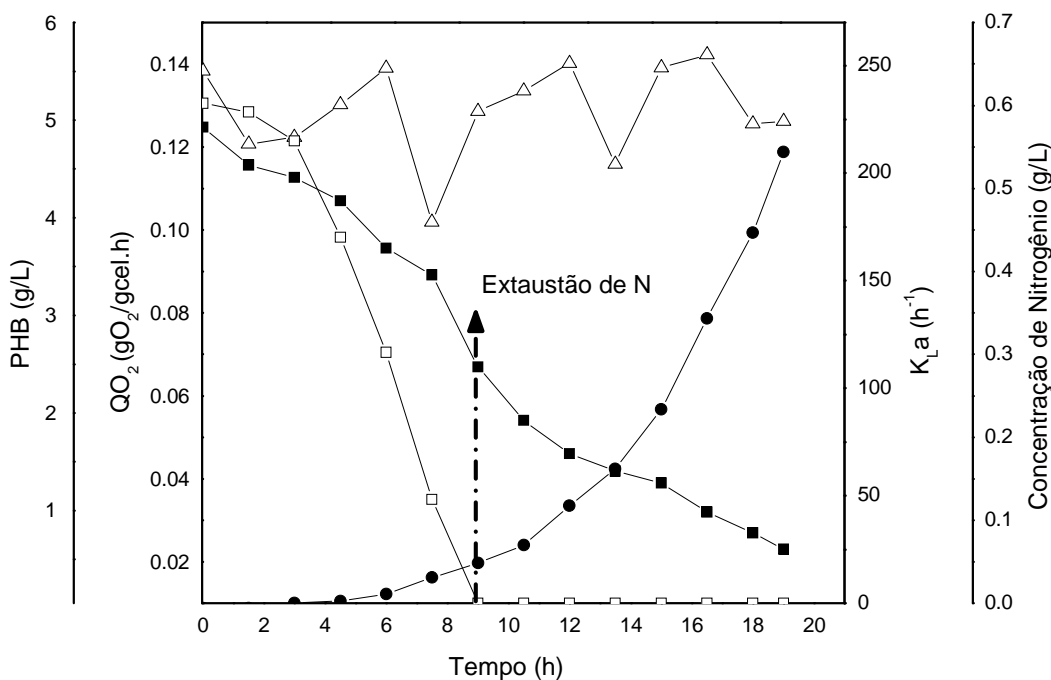


Figura 6.5 - Evolução do consumo de nitrogênio (g/L) (□), produção de P(3HB) (●), determinação de QO_2 (gO₂/gcel.h) (■) e $K_L a$ (h⁻¹) (Δ) em função do tempo de cultivo a 32,5°C. A linha pontilhada indica o momento em que ocorre a exatstão em nitrogênio.

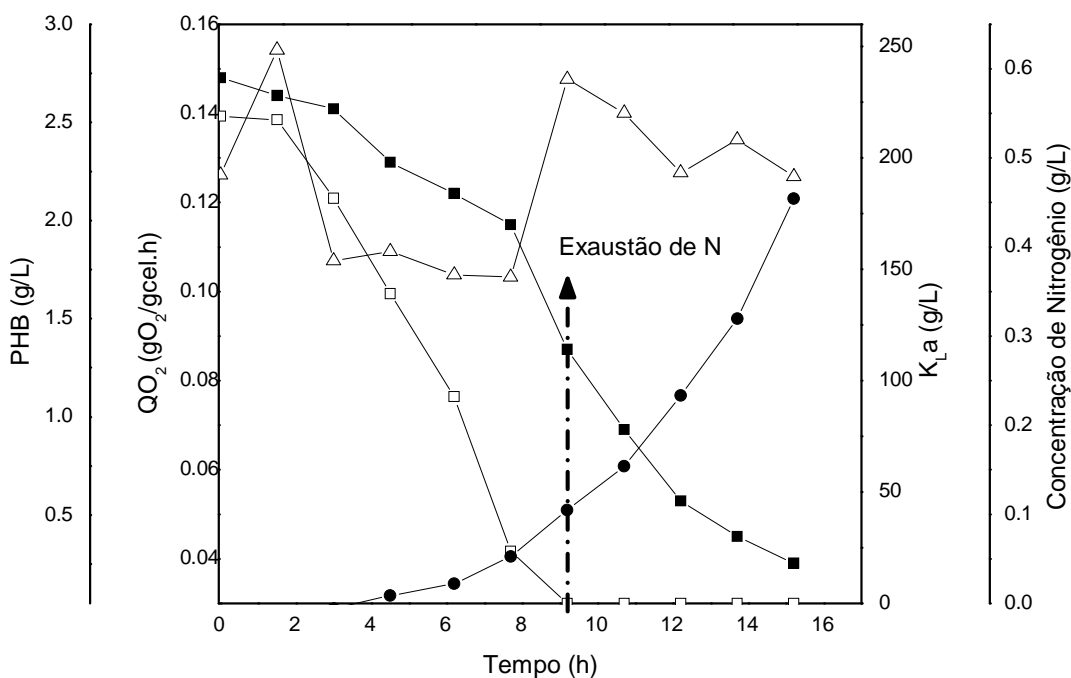


Figura 6.6 - Evolução do consumo de nitrogênio (g/L)(□), produção de P(3HB)(●), determinação de QO_2 (gO₂/gcel.h)(■) e $K_L a$ (h⁻¹) (Δ) em função do tempo de cultivo a 35°C. A linha pontilhada indica o momento em que ocorre a exatstão em nitrogênio.

O nitrogênio determinado no meio de cultura é o nitrogênio amoniacal. A dosagem do nitrogênio amoniacal é 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 em espectrofotômetro.

Analisando-se a quantidade de nitrogênio adicionada ao meio de cultivo no início de cada experimento, que é de 1,15g/L de $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, ou seja, 0,24g/L de nitrogênio, nota-se que, os valores obtidos na determinação do nitrogênio inicial através do kit colorimétrico apontam valores maiores do que o adicionado, variando entre 0,50-0,60 g/L de nitrogênio, indicando assim que a análise de nitrogênio inicial e de consumo durante o experimento, realizadas através do kit colorimétrico não expressam valores quantitativos e sim qualitativos. Esta observação leva a concluir que o kit colorimétrico é confiável apenas para identificar o momento da exaustão de nitrogênio, e não o momento em que este elemento torna-se limitante no meio (Figuras 6.4-6.6).

Entretanto, se for observada a evolução da velocidade específica de respiração (QO_2), nota-se que é possível visualizar através dela o momento em que começa ocorrer a limitação de nitrogênio e, conseqüentemente, o início da produção de P(3HB), isto é indicado através do início da desaceleração desta velocidade, que passa a ser mais acentuada a partir do momento em que ocorre a exaustão do nitrogênio no meio.

Como na fase de produção de P(3HB) a célula tem sua respiração celular reduzida, uma vez que não ocorre mais a multiplicação das células e sim o acúmulo do biopolímero, e este não requer grandes quantidades de O_2 dissolvido para sua produção, ou seja, a síntese de P(3HB) enquanto macromolécula exige menos energia do que a exigida para o crescimento celular. Acredita-se que a respirometria como grandeza indicativa da produção do biopolímero seja mais precisa do que a análise de nitrogênio por kit colorimétrico, permitindo, assim, um melhor acompanhamento da cultura e do seu estado fisiológico e possibilitando a identificação das fases de crescimento e produção de P(3HB) por *Ralstonia eutropha*.

A medição em tempo real dos parâmetros respirométricos envolvidos em processos biológicos permite calcular velocidades de reação que fornecem uma informação direta sobre a atividade da cultura (KONSTANTINOV, 1996).

Quando um processo é aplicado em escala de produção, é necessário monitorizá-lo e controlá-lo eficazmente, no sentido de otimizar e de detectar qualquer anomalia no processo a tempo de resolvê-lo sem causar prejuízo para a qualidade do produto nem para a produtividade do processo. Esta otimização visa a produção de um produto com qualidade elevada e homogêneo, com o menor custo e o menor impacto ambiental possível, fatores estes que ditam a viabilidade de um projeto. Deste modo, a respirometria vem ganhando particular importância como técnica de análise em tempo real nos processos biotecnológicos que competem entre si num concorrido mercado com margens de lucro cada vez mais apertadas, podendo com isso promover um melhor acompanhamento do processo em termos de condição fisiológica da célula (FERREIRA et al., 1998; STANBURY et al., 1995).

Por se tratar de uma técnica de análise em tempo real, pode ser utilizada em processos industriais envolvendo sistemas biológicos como é o caso do presente trabalho. Sabe-se que o estudo da respirometria em processos envolvendo a produção de P (3HB) não tem sido reportado na literatura.

Esta inovação envolvendo o uso da respirometria como controle da cinética de crescimento de *Ralstonia eutropha* para a produção de P(3HB) torna-se uma vantagem na sua produção uma vez que, esta técnica tem a vantagem de não ser uma análise invasiva, isto é, utiliza apenas um sensor no interior do bioreator, não acarretando problemas de manutenção, além de manter as condições de assepsia e de esterilização do equipamento, não provocando influência direta nas condições do processo e na qualidade da análise, além de possibilitar um controle *on-line* da fisiologia da cultura, durante o processo.

ESTÁGIO PDEE - PORTUGAL

7 - CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE P(3HB) POR RALSTONIA EUTROPHA EM ALTA DENSIDADE

7.1 Análise do Crescimento e produção de *Ralstonia eutropha* em alta densidade a temperatura de 32,5°C

Neste capítulo, será descrito o estudo realizado sobre crescimento de *Ralstonia eutropha* em alta densidade celular, à temperatura de cultivo de 32,5°C, com o objetivo de aumentar a produção de P(3HB). O estudo realizou-se em duas etapas. A primeira consistiu em dar condições ao microrganismo para um crescimento balanceado, sem limitação em qualquer nutriente, com o objetivo de observar qual o comportamento de *Ralstonia eutropha* durante o crescimento e qual concentração de células viáveis era possível chegar, antes de iniciar-se a produção do polímero. A segunda etapa, consistiu em otimizar as condições de cultivo visando aumentar a produção do polímero.

Este estudo é apresentado nas Figuras 7.1e 7.2.

ETAPA 1

O primeiro experimento, como já mencionado anteriormente, visou apenas acompanhar a evolução do crescimento celular, não objetivando a produção do polímero. Este cultivo foi realizado com uma concentração inicial de fonte de nitrogênio (N) de 2,15 g.L⁻¹, sendo adicionado de um pulso de fonte de nitrogênio após 14,5 horas de cultivo com a mesma concentração, de modo a obter 40g/L de biomassa total ao final do experimento. A concentração de fonte de carbono variou entre 20 e 40g/L, evitando-se assim uma possível inibição por falta ou excesso de carbono. Sempre que necessário foi realizada a adição de pulsos de fonte de carbono para manter esta concentração. A porcentagem de oxigênio dissolvido permaneceu constante durante todo o experimento em 40% de saturação.

Observa-se através da Figura 7.1 que, ao final de 66 horas de cultivo, obteve-se uma biomassa total de 470 g. Um total de 1043 g de fonte de substrato e 17,2 g de fonte de nitrogênio foram consumidos durante o cultivo. Nota-se que o microrganismo teve seu crescimento desacelerado a partir de 46 horas de cultivo, onde neste ponto atingiu-se uma biomassa total de 445 g, um fator de conversão de ($Y_{XT/N}$) de 26,5 g/g, e um fator de conversão de biomassa total em fonte de carbono de 0,79 g/g.

Após atingir esta concentração de biomassa total nota-se que o crescimento exponencial cessa e dá lugar a um fase estacionária.

Através deste estudo foram retiradas as informações necessárias para a segunda etapa, onde fixou-se em iniciar a produção de P(3HB) a partir de 25-30g/L de células viáveis, e com alimentação da fonte de nitrogênio.

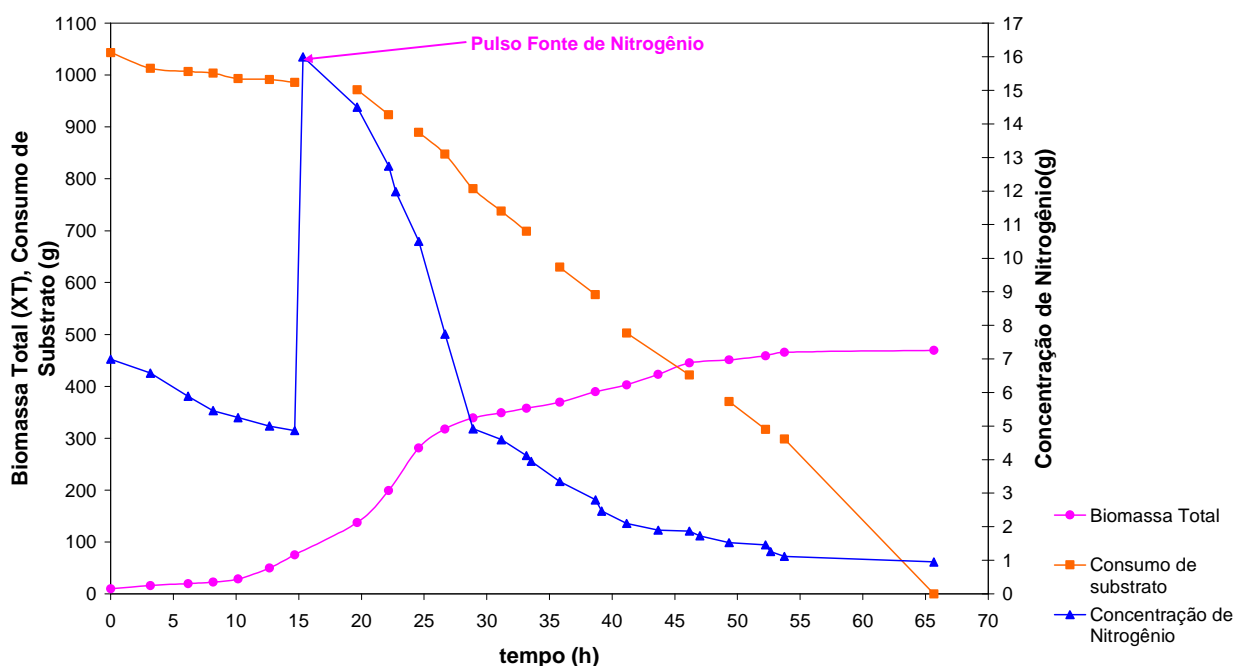


Figura 7.1 - Evolução da Biomassa Total (XT) e Consumo do substrato e concentração de Nitrogênio expressos em g em função do tempo.

ETAPA 2

Nesta segunda etapa, foi realizado um experimento completo, com crescimento e produção de P(3HB), com limitação da fonte de nitrogênio. As condições de cultivo, após a limitação, foram mantidas em: alimentação contínua de fonte de nitrogênio na vazão de $0,17\text{gN}\cdot\text{h}^{-1}$, valor este estimado por Aragão (1996), alimentação contínua de fonte de carbono mantendo a concentração variando entre 20-35g/L, porcentagem de oxigênio dissolvido em 40% da saturação.

Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 7.1 e 7.2 e na Figura 7.2.

Tabela 7.1 – Valores obtidos para fator de conversão de nitrogênio em biomassa residual, consumo de substrato, fator de conversão de substrato em biomassa residual, produtividade, biomassa residual, biomassa total, produção de P(3HB) e Conteúdo de P(3HB) obtidos durante a fase inicial (crescimento).

FASE DE CRESCIMENTO	$Y_{Xr/N}^{(a)}$	Substrato consumido (g)	$Y_{Xr/S}^{(b)}$	P_{Xr} (g.h⁻¹)^(c)	Xr final (g)	XT final (g)	P(3HB) final (g)	Conteúdo de P(3HB) %
	27,1	246	0,67	7,05	170	191	21,2	13,9

(a) fator de conversão de nitrogênio em biomassa residual, (b) fator de conversão de substrato em biomassa residual, (c) produtividade em biomassa residual.

O efeito da estratégia de alimentação de nitrogênio durante a fase de produção do polímero não apresentou efeito significativo no conteúdo de P(3HB) acumulado ficando em torno de 42%.

Verificou-se que com a alimentação contínua de nitrogênio ocorreu o aumento da produção de biomassa residual como pode ser visto na Figura 7.2, nota-se que, após a limitação e início da alimentação de nitrogênio, a biomassa residual continua crescendo. O baixo valor de produtividade de polímero obtido nesse cultivo 2,45g.h⁻¹, pode ter sido causado pelo alto nível de produção de biomassa residual.

Nessas condições, foi obtido 386 g de concentração celular total, sendo destas 162 g de P(3HB) correspondente a 42% do peso seco celular, em 57 h, conforme dados apresentados na Tabela 7.2.

Tabela 7.2 – Tempo de fase de produção de P(3HB), massa de polímero (P(3HB)), produtividade de P(3HB), conteúdo de P(3HB) em porcentagem e Biomassa total, obtidos durante a fase de limitação em fonte de Nitrogênio.

FASE DE PRODUÇÃO	Tempo de fase de produção (h)	Massa P(3HB) (g)	$P_{P(3HB)}$ ($g \cdot h^{-1}$)^(a)	Conteúdo de P(3HB) (%)	Biomassa Total (g)
	57	162	2,45	42	386

^(a)Produtividade em conteúdo de P(3HB)

Kim et al. 1994, no intuito de melhorar a produtividade de P(3HB), estudaram a produção de polímero por *R. eutropha* NCIMB 11599, em batelada alimentada com alta densidade de células, utilizando métodos para manter a concentração de glicose em um valor ótimo: Segundo os autores, controlando a concentração de glicose entre 10 – 20 g/L, o crescimento do microrganismo seria otimizado, resultando em produção mais eficiente de P(3HB). Também estudaram o efeito da limitação de nitrogênio em diferentes concentrações de biomassa (30, 55 e 70 g/L) sobre a produção de P(3HB). Encontraram os melhores resultados de concentração de células, de P(3HB) e de produtividade com o analisador de glicose “on-line” e limitação de nitrogênio, quando a biomassa era de 70 g/L. Nessas condições, obtiveram 164 g/L de concentração celular, 121 g/L de P(3HB) correspondente a 76% do peso seco celular, com produtividade de 2,42 g/L , em 50 h.

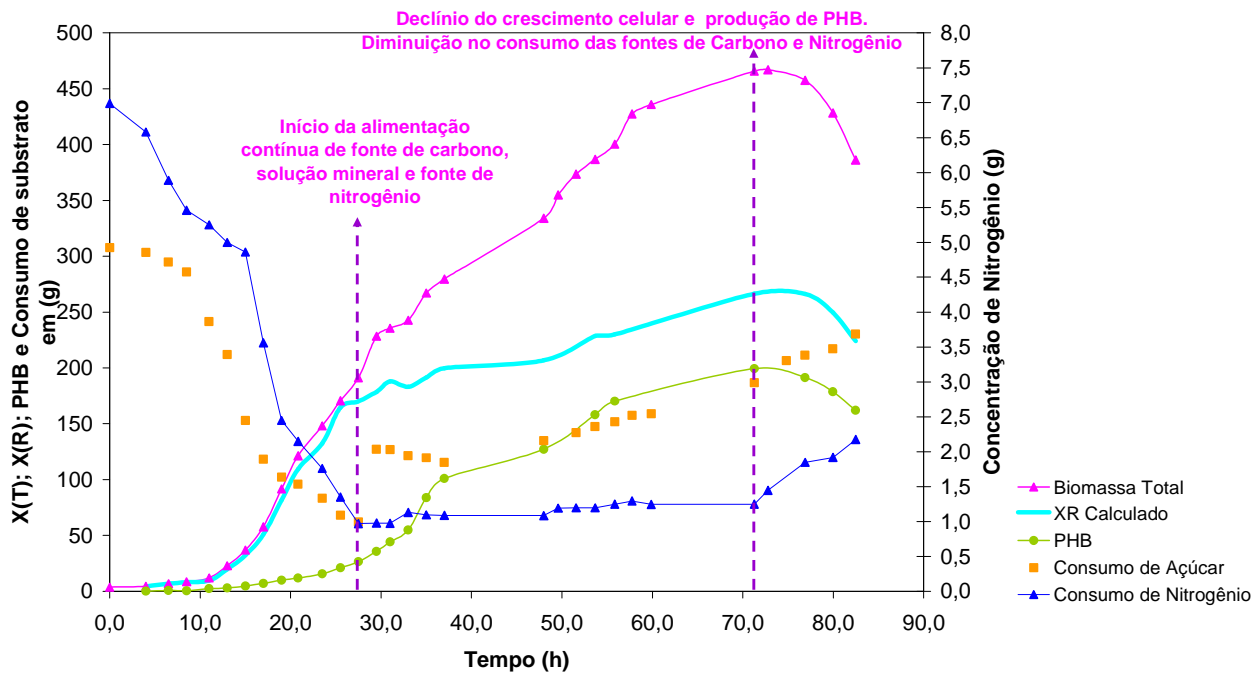


Figura 7.2 - Evoluções da Biomassa Total (XT); Biomassa Residual (XR); P(3HB); Consumo de substrato e concentração de Nitrogênio expressos em g em função do tempo.

Paralelamente a este experimento, foi realizado um teste a partir do momento em que a biomassa total começou a decair, visando com isto analisar a causa do declínio da biomassa e da produção de P(3HB).

Observa-se na Figura 7.2 que, após 71 horas de cultivo ocorre o declínio da biomassa, juntamente com o declínio da produção de P(3HB). Percebe-se também que, a partir desse ponto, as fontes de nitrogênio e carbono, alimentadas continuamente começam a subir em decorrência do não consumo pelo microrganismo.

Testou-se três diferentes estratégias para se verificar se o problema de decaimento da biomassa estava relacionado ao estado fisiológico das células. Retirou-se 600 ml de meio do reator, centrifugou-se este volume em frascos estéreis, separando assim as células (precipitado) do meio de cultivo (sobrenadante). De maneira estéril e em câmara asséptica, pesou-se o equivalente a 1 g de célula proveniente desta centrifugação. O sobrenadante foi separado em 2 frascos agitados, o primeiro frasco foi composto por 200 ml deste sobrenadante adicionados a 200 ml de água deionizada estéril acrescido com 1g de célula proveniente do reator, este cultivo foi denominado de T1. O restante do sobrenadante 400 ml, foi adicionado de 1g de célula proveniente de um pré-inóculo ou segunda pré-cultura este cultivo foi denominado de T2. Um terceiro cultivo foi testado utilizando 1g de célula proveniente do reator adicionado de meio mineral novo, este cultivo foi denominado de T3. Nos três casos, seguiu-se a absorvância de cada cultura ao longo de 21 horas.

Os resultados obtidos neste teste são mostrados nas Figura 7.3 e 7.4

A Figura 7.3 mostra os valores de \ln absorvância/absorvância inicial, onde nota-se claramente que o cultivo T3, contendo meio novo, foi o que apresentou os melhores resultados, chegando a um μ de $0,12 \text{ h}^{-1}$, frente aos demais testes. Em segundo lugar aparece o meio T1, o qual, foi diluído com água estéril onde nota-se um crescimento exponencial durante todo o teste, entretanto mais baixo do que o observado no teste T1, e por último o meio T2 oriundo do sobrenadante do reator inoculado com células novas, no meio T2 é possível visualizar que, durante as 5 primeiras horas do teste ele apresentou um crescimento exponencial, após decorrido este tempo nota-se, que, ocorre uma desaceleração do seu crescimento, fator este que, pode estar relacionado a uma inibição do crescimento, lembrando que, este meio é oriundo do reator sem modificação ou diluição, esta inibição é provável ser devida a formação de compostos tóxicos a célula, que possivelmente são expelidos por ela mesma para o meio durante a produção de P(3HB) (condição em que o meio foi retirado do reator) em culturas de alta densidade, decorrentes do processo de biossíntese de P(3HB), ou lise celular, acredita-se que a duração da fase exponencial durante as 5 primeiras horas do teste deu-se por as células serem novas apresentando uma maior resistência a sua sobrevivência.

Um exemplo de inibição pode dar-se em razão da aeração do sistema. Postula-se que a diminuição no fornecimento de oxigênio ao meio de cultura na fase de acúmulo, prejudicaria ou até inviabilizaria a formação do P(3HB). Nos ensaios em que a razão de aeração (L/mim) foi limitada, observou-se que a bactéria excreta uma grande quantidade de metabólitos para o meio. A limitação de oxigênio fez com que grande parte do substrato seja desviada para a formação de ácidos orgânicos e outros metabólitos (DU et al., 2004).

De acordo com a via metabólica da bactéria, a baixa quantidade de O₂ no meio faz com que um excesso de coenzimas reduzidas (NADH e NADPH) se acumulem. A única via, portanto, para a reoxidação dessas coenzimas, é aquela de formação de polímero no passo de atuação da enzima acetoacetylCoA-redutase (LAFFERTY 1988). Entretanto, uma limitação muito severa desse parâmetro, ocasiona a excreção de intermediários da via de oxidação dos carboidratos, do Ciclo de Krebs e mesmo de análogos da via biossintética do polímero, prejudicando ou mesmo inviabilizando a formação de P(3HB). De acordo com Vollbrecht et al. (1979), os tipos de metabólitos excretados estão correlacionados com a baixa velocidade de respiração que é provocada pela restrição no suprimento de oxigênio (TAVARES et al., 2000).

Culturas de *A. eutrophus* NCIMB 11599 em fermentador de 60 L, regime de batelada alimentada com alta densidade de células, foram estudadas por Ryu et al (1999). Em seus experimentos com limitação em nitrogênio não conseguiram alta densidade de células devido à significativa lise das mesmas, causada pela toxicidade da solução de NaOH excessivamente adicionada para controle de pH.

Acredita-se que estes dois fenômenos possam ser os de maior significância no que se refere a baixa produtividade de P(3HB) obtida em nosso estudo envolvendo alta densidade.

Na Figura 7.4, encontram-se os valores de pH obtidos durante o teste, novamente observa-se que apenas no cultivo T3 o pH decai, comportamento este que, indica um crescimento celular normal e exponencial, nos demais ocorre a elevação do pH, indicativo de que algo não está de acordo com o comportamento normal de crescimento.

Este experimento mostra que o meio neste ponto onde foi realizado o teste encontrava-se com interferentes inibitórios ao crescimento e manutenção celular da cultura em alta densidade, impossibilitando a continuidade da produção de P(3HB). Acredita-se que ocorra uma reação de saturação do meio (interferentes inibitórios) quando trabalha-se com alta densidade e alimentação contínua de nitrogênio, estima-se que as próprias células passem a produzir alguma substância tóxica expelindo-a para o meio e provocando a sua morte.

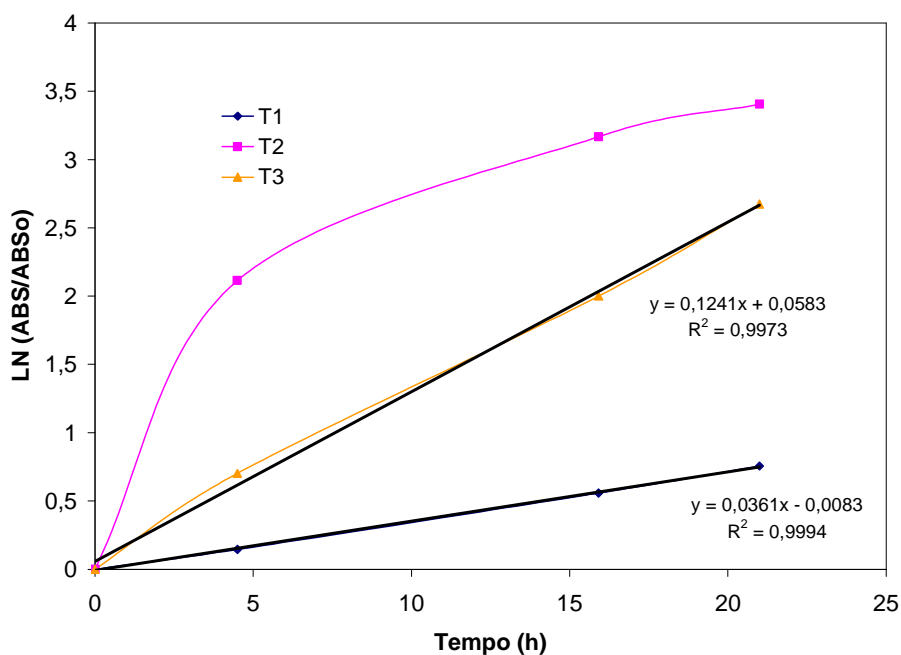


Figura 7.3 - Evolução do crescimento celular medido por espectrofotometria e expresso em LN(Absorbância/Absorbância inicial) em função do tempo.

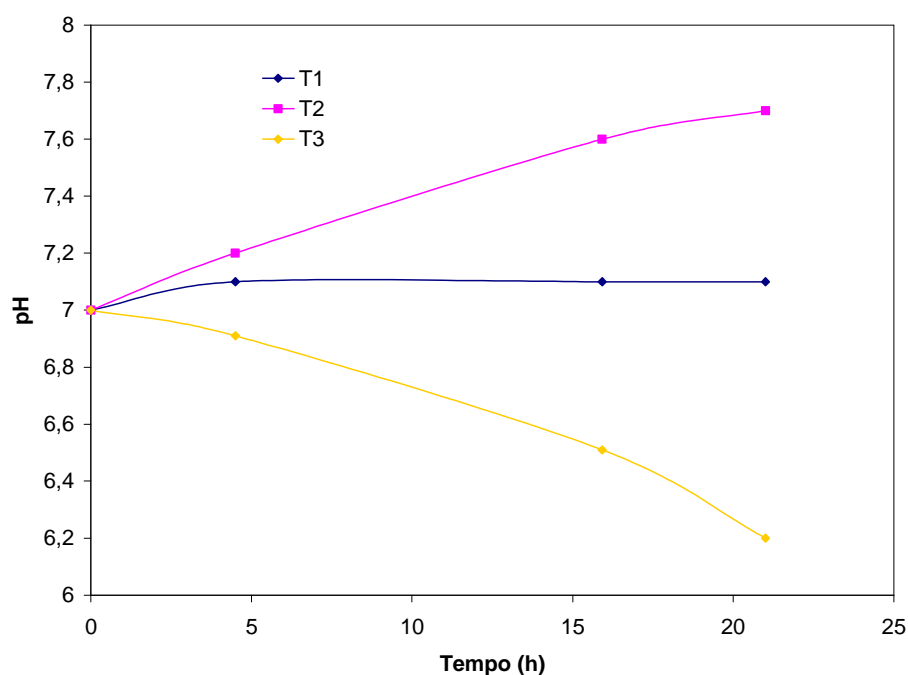


Figura 7.4 - Evolução do pH em função do tempo.

7.1.1 Considerações Finais

A análise dos dados obtidos neste experimento levam a supor que é possível a realização de cultivos em alta densidade com *Ralstonia eutropha* a temperatura de 32,5°C, segundo estudos realizados por Aragão 1996, existe a necessidade de adição de nírogênio durante a fase de produção, mesmo que em quantidades baixas para que o polímero possa ser produzido. Wong e Lee (1998) estudaram a produção de P(3HB) em culturas de alta densidade de células de *Escherichia coli recombinante* GCSC 6576, em batelada alimentada, utilizando soro de leite concentrado como fonte de carbono. Obtiveram 87 g/L de células e 69 g/L de P(3HB), perfazendo um total de 80% de polímero com produtividade de 1,4 g/L h. Mostrando assim que culturas em alta densidade diminuem os custos de produção final no processo de produção de P(3HB), uma vez que, tem sua produtividade aumentada.

Cultivos com reciclo celular promovem um aumento significativo na produtividade do processo desde que as condições de agitação e aeração sejam fornecidas adequadamente para atendendo assim a demanda de oxigênio, sem prejudicar as células. Estes cultivos tem como objetivo obter altas velocidades do processo e assim obter maiores produtividades, além de evitar problemas de limitação à transferência de massa decorrente do aumento da viscosidade do caldo bem como a influencia da viscosidade nos valores dos parâmetros em modelos cinéticos, tal como reportado por Lafforgue-Delorme et al. (1994).

Uma nova estratégia de fermentação usando um sistema de reciclo de células foi estudado por Ahn et al., (2001) os autores desenvolveram um método de reciclo de células com membrana promovendo uma alta eficiência na produção de P(3HB) utilizando como microrganismo *E. coli recombinante* CGSC 4401. Através do reciclo das células por um modulo de membrana externo, foi possível manter o meio nutricional com um volume de funcionamento constantemente em 2,3 L, chegando ao final do cultivo com uma concentração final de células de 194 g.L⁻¹ e um conteúdo de P(3HB) de 168 g. L⁻¹ respectivamente 87% de polímero intracelular foram obtidos em 36,5 h de cultivo. A concentração do soro utilizada como fonte de carbono foi de 280 g de lactose resultando em uma alta produtividade de 4,6 g P(3HB) L⁻¹.h⁻¹.

Baseado nestes fatos, e levando em consideração os resultados obtidos nesse estudo, pode-se concluir que seria importante se fazer uso da técnica de reciclo de células para que ocorra o aumento e a continuidade da produção de P(3HB) sem interferentes tóxicos no meio de cultivo, visando assim uma maior produtividade e conseqüentemente uma diminuição nos custos de produção do processo.

Sugere-se a continuidade deste assunto realizando-se experimentos com reciclo de células.

8 - EXTRAÇÃO, RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

O processo escolhido para as extrações realizadas nesse estudo foi o descrito no Exemplo 7 da Patente US 4140741.

Exemplo 7: Extração com carbonato de propileno utilizando massa celular nativa contendo P(3HB)

Uma massa equivalente a 11,5 g de células fermentadas é suspensa em 25 ml de carbonato de propileno. A solução é, então, aquecida entre 119-135°C, por 40-50 minutos. Após se atingir a temperatura testada e decorrido o tempo estipulado, a solução é filtrada à quente, sob vácuo. Um volume de 1-5 ml de água deionizada é adicionado, sob agitação, ao filtrado. Imediatamente após, nota-se a precipitação do polímero P(3HB). O filtrado, passa por uma nova filtração a vácuo, à temperatura ambiente, separando assim o precipitado (P(3HB)) do solvente utilizado. O precipitado é lavado com etanol e seco a vácuo. Levando 95% do P(3HB) contido nas células a ser extraído.

O ponto de fusão do produto obtido fica entre 174-178°C, e permanece inalterado mesmo após duas recristalizações com cloroformio e éter. O filtrado (solvente utilizado na extração) obtido após a segunda filtração foi novamente utilizado em posteriores extrações sem ter suas características alteradas.

As informações contidas na Patente US 4140741 acrescentaram ainda que quanto maior o tempo de extração maior a % de polímero extraída, sendo esta grandeza inversamente proporcional ao peso molecular obtido. Quanto maior a temperatura, maior a % de polímero extraído.

Levando em consideração essas informações, decidiu-se optar por esta técnica de extração, com algumas modificações. Como solvente optou-se pelo carbonato de propileno, uma vez que, como citado acima, ele, comparado ao carbonato de etileno, apresenta menor grau de despolimerização.

As condições testadas foram:

- Temperatura de extração : 100°C, 115°C, 130°C e 145°C.
- Tempo de extração: 15, 30 e 45 minutos.
- Técnicas de separação solvente/polímero: filtração a frio e centrifugação.
- Homogeneidade das cadeias poliméricas a serem formadas: 0 e 48 horas.

8.1 Descrição dos métodos de extração utilizados no estudo

Ao término do cultivo, as células foram separadas por centrifugação. O precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e congelado para posterior extração do polímero. Uma massa equivalente a 11,5 g de células úmidas fermentadas foram suspensas em 25 ml de carbonato de propileno. Esta suspensão foi homogenizada a frio em chapa de alumínio com agitador magnético até se obter uma solução homogênea entre o solvente e as células fermentadas. Esta solução homogênea foi aquecida em banho de óleo até as temperaturas de teste (100°C, 115°C, 130°C e 145°C) dependendo do experimento. O tempo de reação foi iniciado a partir do momento em que se atingiu a temperatura de teste. O tempo de contato entre o solvente e as células variou de acordo com o experimento dentro da faixa de 15, 30 ou 45 minutos;

Após decorrido o tempo estipulado para cada experimento, a solução foi submetida a uma primeira filtração à quente à vácuo. A massa celular não P(3HB) retida no filtro foi lavada três vezes com carbonato de propileno, aquecido a 100°C, para arrastar totalmente o polímero extraído. A partir deste ponto, testou-se diferentes métodos para a separação e homogeneização das cadeias poliméricas. Os métodos testados são descritos abaixo.

Método 1: o filtrado (polímero + carbonato de propileno) ainda quente foi submetido a centrifugação a 14000 rpm/15 min, para separar o polímero do carbonato de propileno. Duas fases foram formadas, um precipitado (polímero extraído) e uma fase líquida (carbonato de propileno). O precipitado foi lavado com acetona PA até apresentar coloração branca, indicativo de isenção de carbonato de propileno (o carbonato de propileno apresenta uma coloração amarelada, sendo mais acentuada após ser aquecido com material celular). Posteriormente, esse precipitado foi resuspendido em acetona PA e novamente filtrado à vácuo, em filtro previamente seco e tarado, ficando assim retido no filtro o material polimérico. Este material polimérico foi, então, lavado com acetona PA sob vácuo. O filtro contendo o polímero foi seco em estufa a 65°C durante 24 horas, para posterior determinação da massa de polímero extraída.

Método 2:

O filtrado (polímero + carbonato de propileno) foi deixado em repouso até atingir a temperatura ambiente. Duas fases distintas foram formadas, uma fase contendo aglomerados esbranquiçados (polímero extraído) e outra líquida (carbonato de propileno). A maior parte do carbonato de propileno foi retirada com o auxílio de uma pipeta. O restante do carbonato de propileno foi filtrado junto com o material polimérico formado. O filtro utilizado foi devidamente seco e tarado e a filtração foi realizada sob vácuo a temperatura ambiente. O material polimérico retido no filtro foi lavado com acetona PA sob vácuo. O filtro, contendo o polímero, foi seco em estufa a 65°C durante 24 horas, para posterior determinação da massa de polímero extraída.

Método 3:

A terceira técnica empregada difere da segunda técnica em apenas um ponto. O filtrado (polímero + carbonato de propileno) foi deixado em repouso por 24 horas. Decorridas as 24 horas, foi adicionado 2 vezes o valor do volume utilizado de carbonato de propileno para a extração em volume de acetona PA, e a solução deixada em repouso por mais 24 horas. Novamente, como observado na segunda técnica, duas fases distintas foram formadas, uma fase de aglomerados esbranquiçados (polímero extraído) e outra líquida (amarela) (carbonato de propileno + acetona PA). A partir daí, a mesma técnica apresentada no Método 2 foi utilizada.

8.1.1 Método Padrão utilizado para efeitos comparativos

Os novos métodos testados foram comparados com o método de extração desenvolvido por Dalcanton (2006), que utiliza diferentes condições de tempo, temperatura e o solvente clorofórmio. Figura 8.1 apresenta o fluxograma descritivo do método utilizado pelo autor.

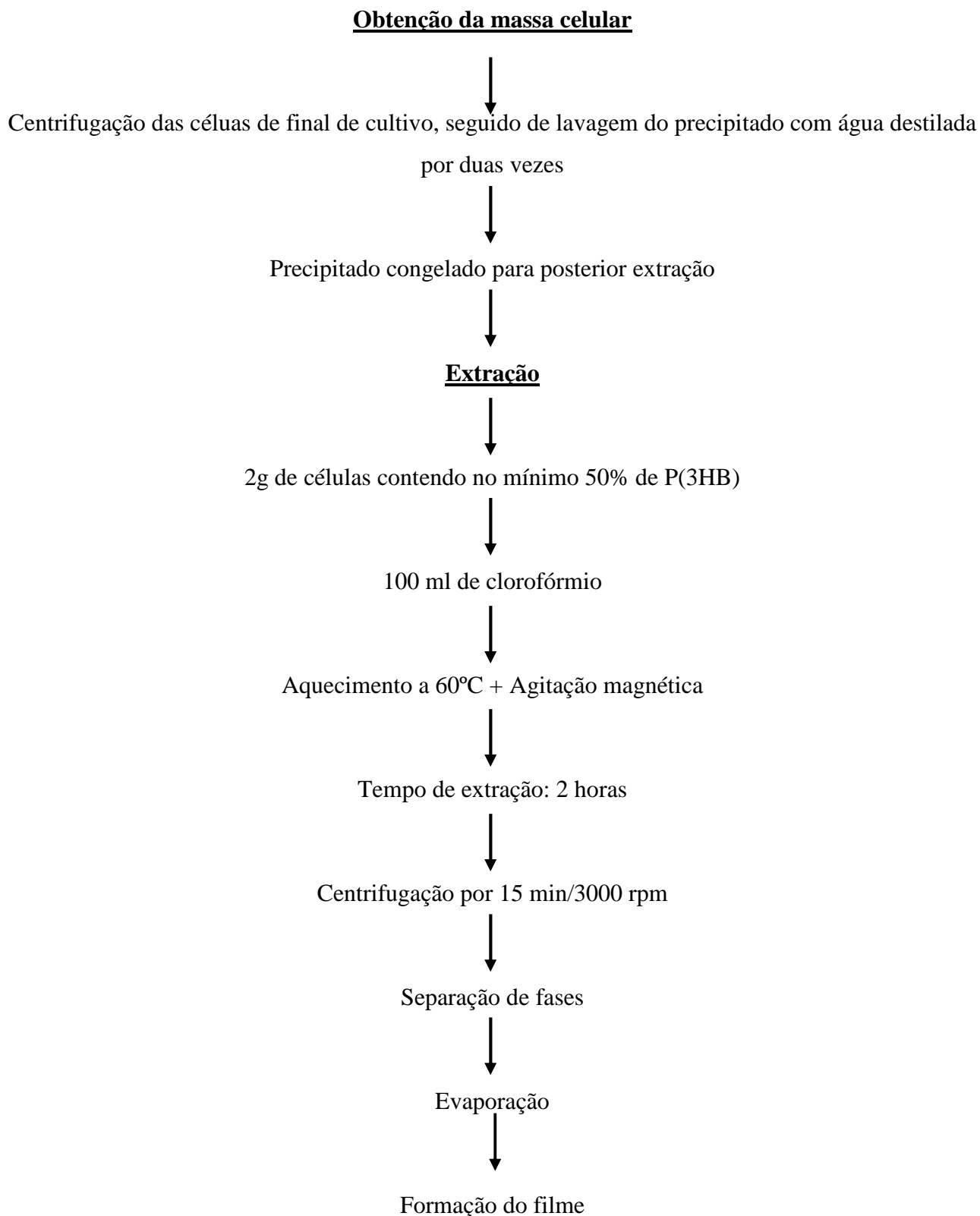


Figura 8.1 – Fluxograma descritivo do processo de extração proposto por Dalcanton (2006).

Os resultados obtidos com os novos métodos testados foram comparados com os resultados da extração pelo método padrão. A comparação foi feita em termos de rendimento de polímero obtido (peso seco), pureza determinada através de análise cromatográfica, peso molecular médio e polidispersão obtidos através da análise por cromatografia líquida de exclusão molecular e por análise calorimétrica diferencial exploratória.

8.2 Testes preliminares

8.2.1 Comparação entre os três métodos novos frente ao método Padrão

Os testes preliminares foram determinados com biomassa celular contendo 42% de P(3HB) no interior das células. A Tabela 8.1 mostra os valores obtidos durante primeiros testes expressos em % de recuperação, % pureza, peso molecular, polidispersividade, segundo aquecimento temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade χ_c (%).

As Curvas de calorimetria diferencial exploratória deste capítulo, assim como as imagens dos polímeros obtidos em algumas das extrações encontram-se no Anexo II (Figuras B1-B19).

Tabela 8.1 - Comparação entre os 3 métodos de extração à temperatura de 130°C/30 min e a extração Padrão, valores expressos em % de recuperação, % pureza, peso molecular e polidispersividade, temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade χ_c (%).

Método de Extração	Recuperação %	Pureza %	Peso Molecular (g/mol)	Polidispersividade	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	χ_c (%)
1	63,2	71,8	2.10^4	1,6	175	83	58,5
2	73	80,8	$6,6.10^5$	3,0	174,5	83,5	59
3	95	83,6	$7,4.10^5$	3,1	175	85	60
Padrão	96,3	94,6	$1,0.10^6$	3,2	173,5	80	56,5

Observando a Tabela 8.1, nota-se que com relação a % de Recuperação e a % de Pureza o método que apresentou os melhores resultados foi o método 3, obtendo-se 95% de recuperação do polímero e após a extração uma % de Pureza de 83,6%. O que apresentou os valores mais baixos foi o método 1, obtendo-se apenas 63,2 % de recuperação com uma % de pureza de 71,8. Isto deve-se ao fato de no método 3 ocorrer uma maior polimerização do polímero, uma vez que, este permanece em repouso por 48h. Como a cadeia de polímero é formada pela adição de uma grande quantidade de monômeros, durante a polimerização, cadeias com diferentes comprimentos são formadas e, portanto, uma distribuição de comprimentos de cadeia será obtida, fator este que aumenta a polidispersividade como pode ser observado na Tabela 8.1, onde no método de extração 1 houve uma polidispersividade menor, com cadeias mais uniformes, o que indica que não houve tempo para ocorrer a precipitação de todas as cadeias poliméricas.

Do ponto de vista termodinâmico, a alta polidispersividade dificulta muitas vezes o entendimento e a discussão do comportamento de polímeros (HASLAM et al., 1981). Os polímeros são substâncias compostas por uma mistura de moléculas com diferentes massas molares. A polidispersividade dos polímeros é oriunda das variações estatísticas presentes nos processos de polimerização. Com isso, o índice de polidispersividade é definido como sendo a razão entre a massa molar média e a massa molar ponderada, quanto maior for esse índice, mais ampla será a distribuição de tamanhos de cadeia (NOGUEIRA et al., 2002).

Este fator também pode ser visualizado quando se analisa a grandeza peso molecular, onde nota-se que os valores obtidos para essa grandeza aumentam conforme aumenta o tempo de repouso e precipitação da massa polimérica extraída (métodos 2 e 3), sendo o método 3 o que apresentou os resultados mais próximos aos obtidos com a extração padrão. Segundo Khanna e Srivastava (2005a), o P(3HB) se apresenta com uma faixa de massa molar relativa de $1 \cdot 10^4$ a $3 \cdot 10^6$ g/mol e com uma polidispersividade por volta de 2.

Dalcanton (2006), em seus ensaios, obteve, para o método padrão aqui empregado, um polímero com as seguintes características, recuperação 94% , pureza 98%, peso molecular de $2,4 \cdot 10^6$ g/mol, polidispersividade de 1,38, temperatura de fusão 176,3°C e um grau de cristalinidade de 55,5 %, valores este próximos ao encontrados neste estudo.

Com relação aos valores obtidos através das análises por calorimetria diferencial exploratória observa-se que os métodos novos testados utilizando como solvente o carbonato de propileno levaram a um aumento da temperatura de fusão de 173,5 °C para o método padrão para, aproximadamente, 175°C nos novos métodos testados. Os valores obtidos para as temperaturas de fusão estão dentro do intervalo encontrado na literatura que é de 174°C – 180°C (ANDERSON e DAWES, 1990; GOMEZ e BUENO NETO, 1997). A entalpia de fusão aumentou de 80 para 85°C, para o método padrão e método 3 e o grau de cristalinidade ficou em 56,5-60% para o método padrão e para o método 3. Entretanto, esses valores não expressam alterações significativas. O conhecimento do grau de cristalinidade de um polímero é importante, pois facilita a seleção do material a ser usado em diferentes aplicações.

Segundo Khanna e Srivastava, 2005(a), o P(3HB) é definido como um material rígido e quebradiço, o que limita suas aplicações, pois apresenta um grau de cristalinidade na faixa de 60% a 80 %.

A partir destes testes preliminares passou-se a usar como método de extração o método 3.

8.2.2 *Análise da melhor temperatura e tempo de extração*

Neste item, foi estudada a influência da temperatura e do tempo de extração, em relação aos parâmetros % de recuperação, % pureza, peso molecular, polidispersividade, temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade χ_c (%).

As temperaturas de extração em estudo são 100°C, 115°C, 130°C e 145°C e os tempos de extração 15, 30 e 45 minutos.

A Tabela 8.2 mostra os valores obtidos através das análises de cromatografia gasosa, cromatográfica de permeação em gel, e calorimetria exploratória diferencial de % de recuperação, % pureza, peso molecular e polidispersividade, temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade χ_c (%), para as diferentes condições de extração testadas.

Tabela 8.2 - Comparação entre as diferentes temperatura e tempos de extração comparados a extração Padrão, valores expressos em % de recuperação, % pureza, peso molecular e polidispersividade, temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade χ_c (%).

Temp. (°C)	tempo (min)	Recuperação (%)	Pureza (%)	Peso Molecular (g/mol)	Polidispersividade	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	χ_c (%)
145	45	70,3	72,2	$1,4 \cdot 10^5$	2,3	170,1	77,8	55
145	30	74,8	74	$2,2 \cdot 10^5$	2,1	180,1	85	60
145	15	89,3	81,6	$4,5 \cdot 10^5$	3,3	177,5	88,5	62
130	30	95	83,6	$7,4 \cdot 10^5$	3,1	175	85	60
130	15	66,5	63,2	$6,5 \cdot 10^5$	2,5	173,5	87,8	62
115	45	53,6	47,2	$4,9 \cdot 10^5$	2,3	175,1	87	61
100	45	51,6	43,4	$4,1 \cdot 10^5$	2,4	175,8	84,5	59,5
100	15	45	6,6	$4,1 \cdot 10^5$	2,4	171,7	80,5	57
Padrão	120	96,3	94,6	$1,0 \cdot 10^6$	3,2	173,5	80	56,5

Com relação à temperatura de 145°C, observa-se que, com o aumento do tempo de extração, ocorreu a diminuição dos valores em todos os parâmetros analisados. Acredita-se que isso deve-se ao fato desta temperatura ficar próxima à temperatura de degradação do polímero, podendo este ter sido degradado durante a extração a tempos mais elevados, sendo isto uma característica muito importante, pois, quanto mais brando for o método de extração, menores perdas serão obtidas durante a mesma.

Segundo Luzier (1992), o tratamento brando com hidróxido de amônia testado para extrair P(3HB) de *A. vinelandii* levou a um polímero com uma alta massa molar da ordem de $1,7 \cdot 10^6$ a $2,0 \cdot 10^6$ g/mol, e baixa polidispersividade. A empresa ZENECA considera que uma massa molar de aproximadamente $6 \cdot 10^5$ g/mol é aceitável para aplicações de seu termoplástico BIOPOL® (LIGGAT et al., 1996).

Na temperatura de 130°C, observa-se que ocorre o processo inverso ao observado à temperatura de 145°C, onde o aumento do tempo de contato de 15 para 30 minutos entre o solvente e a massa celular, aumentou os índices de recuperação (de 66,5 para 95%), pureza (de 63,2 para 83,6%), peso molecular (de $6,4 \cdot 10^5$ para $7,4 \cdot 10^5$ g/mol) e polidispersividade (de 2,5 para 3,1), ocorrendo pouca variação com relação aos demais índices estudados.

Com relação às temperaturas mais baixas 100°C e 115°C observa-se que com, o aumento da temperatura e do tempo, obtém-se valores melhores para os índices % de pureza e recuperação, e grau de cristalinidade (%), ocorrendo pouco ou nenhuma variação nos índices peso molecular e polidispersividade. Segundo a Patente 4140741, valores de temperatura variando entre 100-120°C e tempos curtos de extração, promovem uma extração incompleta de P(3HB) obtendo-se valores baixos para o parâmetro peso molecular.

Chen et al., (1999) utilizaram *A. vinelandii* para produzir P(3HB) com uma massa molar da ordem de $4 \cdot 10^6$ g/mol, sendo muito provavelmente o maior valor reportado na literatura até o momento. Os melhores resultados encontrados por Lafferty e Heinzle, 1979 para o peso molecular do P(3HB) com carbonato de propileno, foram para as extrações realizadas a temperaturas entre 120-140°C, durante o tempo de contato da biomassa celular e o solvente de 1 a 10 minutos. Entretanto, na temperatura de 140°C, os autores observaram que, com o aumento do tempo, ocorre a diminuição do peso molecular passando de $2,6 \cdot 10^5$ em 1 minuto para $1,1 \cdot 10^5$ em 30 minutos.

Segundo Janigová (2002), Chan et al., (2004) e Nascimento (2001), o peso molecular do P(3HB) é bastante influenciado pela temperatura e tempo de tratamento térmico empregados para a sua obtenção.

Analisando a Tabela 8.2, observa-se que, de maneira geral, a condição de temperatura/tempo que apresentou os melhores resultados foi 130°C/30 min. Acredita-se que este resultado deve-se ao fato do carbonato de propileno apresentar seu ponto de ebulição em torno 140-150°C, o que ocasionaria a quebra das cadeias poliméricas, ou até mesmo a degradação do polímero à temperaturas em torno deste valor, sendo mais eficiente extrações abaixo desta temperatura. Entretanto, como constatado acima, temperaturas abaixo de 130°C promoveram menores índices de recuperação e pureza do polímero, assim como menor peso molecular e polidispersividade. Optou-se assim por utilizar nos próximos testes a condição de temperatura e tempo de 130°C/30 min.

É sabido que o P(3HB) é ligeiramente instável a temperaturas próximas de sua temperatura de fusão (170°C); e que o polímero pode sofrer redução em seu peso molecular, quando mantido a temperaturas de 10 °C abaixo de seu ponto de fusão, o que limita bastante sua processabilidade.

A massa molecular de P(3HB) pode diminuir significativamente devido à degradação durante o processo de recuperação a elevada temperatura (RAMSAY et al., 1990). Mudanças na massa molecular ocorrem em torno de 170° C. Cerca da metade do valor da massa original é perdida quando o P(3HB) é aquecido a 190° por uma hora segundo Barham et al., (1984), e a completa perda da massa molecular é observada entre 225 e 300° C, sendo convertido em ácido crotônico. A maioria dos processos utilizados na extração do P(3HB) celular são por solvente à quente e outras operações unitárias são necessárias para a obtenção do produto puro.

8.2.3 Extração com diferentes pré-tratamentos para a obtenção da biomassa celular ao final do cultivo

Após a definição das condições de extração, decidiu-se testar diferentes pré-tratamentos para a obtenção da biomassa celular ao término do cultivo, com o intuito de promover a desestabilização da parede celular, e com isto melhorar a extração do polímero. Segundo Andrews et al., (1990), quando o produto é intracelular como o P(3HB), é preciso romper a célula para sua liberação. Dentre os métodos sugeridos por estes autores está a via enzimática, vantajosa por ser branda e seletiva.

Entre as camadas que compõem o invólucro celular de bactérias Gram-negativas, como a *Ralstonia eutropha*, empregada neste estudo, a camada de peptidoglicano constitui a mais resistente (KAPRICHKOFF et al., 2000, NEIDHART et al., 1990). Desta forma, Kaprichkoff et al., (2000), visando definir uma estratégia adequada de rompimento da parede celular de *Ralstonia eutropha* para a liberação do P(3HB), realizaram estudos sobre o uso de tratamento térmico nas células ao final do cultivo fermentativo, visando desestabilização da membrana externa e a consequente exposição da peptidoglicana ao ataque enzimático. Neste método empregado por Kaprichkoff et al., (2000), a temperatura foi elevada, ao final da fermentação, para 95°C permanecendo assim por 45 min, sob agitação de 460 rpm. Segundo os autores, a finalidade deste pré-tratamento térmico foi a desnaturação do material genético, que origina problemas reológicos ao ser liberado com o rompimento das células, ficando mais suscetíveis ao ataque enzimático e à desestabilização da membrana externa.

Quando culturas de *A. vinelandii* UWD foram suplementadas com peptona, as células tornaram-se frágeis, e com um simples tratamento com sulfato de amônia 1M por 10 minutos foi suficiente para obter 94% de pureza na extração (PAGE E COMISH, 1993).

Choi e Lee, 1998 desenvolveram o método de digestão alcalina para células recombinantes de *E. coli*, onde células contendo 77% de P(3HB) em conteúdo foram submetidas ao tratamento com NaOH 0,2M por uma hora, sendo o polímero recuperado com uma pureza de 98,5%.

Quatro diferentes pré-tratamentos foram testados. O pré-tratamento Normal (Normal), centrifugação das células ao término do cultivo a 21.000 rpm/15 min, sendo o precipitado lavado duas vezes com água destilada e congelado. O segundo pré-tratamento chamado de (T) envolveu a elevação da temperatura do meio de cultivo para 60°C/ 5 min. Após o término deste tempo, o meio de cultivo foi centrifugado a 21.000 rpm/15 min, sendo o precipitado e lavado duas vezes com água destilada e congelado. O terceiro pré-tratamento, chamado de (pH), envolveu a elevação do pH do meio de cultivo para 9 com a adição de sulfato de amônio 1M, deixando o meio de cultivo sob agitação mecânica durante 5 minutos, seguido de abaixamento do pH para 4, com a adição de ácido clorídrico 1M. O meio de cultivo foi, então, centrifugado a 21.000 rpm/15 min, sendo o precipitado lavado duas vezes com água destilada e congelado. O quarto pré-tratamento chamado de (pH+T) envolveu variações no pH e na temperatura. O pH do meio foi elevado para 9, com a adição de sulfato de amônio 1M, o meio de cultivo foi, então, aquecido até 60°C, deixando-se o meio de cultivo a esta temperatura por 5 minutos. Decorrido este tempo, o pH do meio foi diminuído para 4 com a adição de ácido clorídrico 1M, sendo a solução deixada em repouso, para a decantação das células, duas fases distintas foram formadas, a fase líquida, límpida de material celular foi retirada com o auxílio de uma pipeta e descartada, a outra fase contendo certa quantidade de líquido e material celular foi centrifugada a 21.000 rpm/15 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e congelado.

Os resultados obtidos nesse estudo são apresentados na Tabela 8.3.

Tabela 8.3 - Comparação entre os diferentes pré-tratamentos aplicados à massa celular antes da extração, temperatura e tempo de extração 130°C/30 min, valores expressos em % de recuperação,

% pureza, peso molecular e polidispersividade, temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade χ_c (%).

Pré Tratamentos	Recuperação %	Pureza %	Peso Molecular (g/mol)	Polidisp. ^a	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	χ_c (%)
Normal	95	83,6	$7,4 \cdot 10^5$	3,1	175	85	60
T	93,6	83	$8 \cdot 10^5$	3,2	177	88	62
pH	93,5	86	$9,5 \cdot 10^5$	3,4	177	84	59
(pH+T)	95	88	$1,3 \cdot 10^6$	3,5	175	82	58
Extração Padrão	96,3	94,6	$1,0 \cdot 10^6$	3,2	173,5	80	56,5

a = polidispersividade

Observando os resultados obtidos na Tabela 8.3, nota-se que o pré-tratamento (pH+T) foi o que apresentou os melhores valores em relação aos índices de % recuperação e pureza (95-88%) frente aos demais pré-tratamentos testados. Com relação ao peso molecular e à polidispersividade, observa-se que com a introdução dos fatores pH e temperatura frente ao cultivo normal houve um aumento nos valores deste índices, sendo mais elevado quanto utiliza-se a junção de pH e temperatura, chegando a valores acima dos obtidos na extração padrão onde utiliza-se o clorofórmio como solvente. Uma possível explicação para este fato seria o aumento do número de cadeias formadas durante o processo de extração, indicativo este, de que, o pré-tratamento pH+T provoca uma desestabilização da parede celular da bactéria, possibilitando assim a obtenção de uma maior quantidade de polímero extraído. Segundo Sim et al (1997), a massa molecular e a distribuição das massas moleculares são talvez as duas das mais importantes propriedades para a comercialização de um dado polímero.

Pesos moleculares diferentes podem mudar completamente as propriedades do polímero (propriedades físicas, mecânicas, térmicas) e, por esta razão, os polímeros são caracterizados principalmente por seu peso molecular. Tanto o peso molecular quanto a distribuição de pesos moleculares são determinadas pelas condições operacionais de reação durante a sua obtenção, sendo que diferentes condições operacionais produzirão polímeros com pesos moleculares médio diferentes (VOGEL et al.,2007). Do ponto de vista de processo industrial, é de fundamental importância o conhecimento da quantidade e da qualidade do polímero produzido.

Os valores obtidos para temperatura de fusão estiveram próximos em todos os pré-tratamentos testados (175-177°C). Segundo Sudesh et al, 2000, os polihidroxicanoatos se comportam como materiais termoplásticos com T_m variando entre 50°C e 180°C. O grau de cristalinidade diminui quando aplicados os pré-tratamentos envolvendo o pH. Sendo mais baixo no pré-tratamento que envolve pH e temperatura, ficando próximo ao padrão e dentro dos valores normais encontrados na literatura.

8.2.4 Considerações Finais

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

Após analisados os resultados obtidos é possível afirmar que, dentre os métodos de extração testados, frente ao padrão, o método envolvendo maior tempo de repouso, proporcionou uma maior precipitação das cadeias poliméricas, obtendo-se assim maior rendimento e pureza do polímero extraído.

Com a condição de temperatura/tempo de 130°C/30 min, obteve-se as melhores condições de extração com o solvente carbonato de propileno. Esta condição proporcionou os melhores valores em todos os índices analisados frente às demais condições estudadas.

O pré-tratamento envolvendo variação no pH e na temperatura proporcionou um aumento no peso molecular do polímero.

A utilização do carbonato de propileno como solvente na extração do polímero mostrou-se eficiente frente à extração padrão, que utiliza o clorofórmio como solvente. Sabe-se que o carbonato de propileno tem um custo mais elevado que o clorofórmio, entretanto, este solvente possui uma toxicidade extremamente reduzida quando comparada ao clorofórmio. Sua principal vantagem é seu alto ponto de ebulição em torno de 140-150°C, o que proporciona uma baixa taxa de evaporação, podendo assim, ser reutilizado inúmeras vezes em futuras extrações, ainda possui a vantagem de ter seu ponto de ebulição acima da temperatura de extração obtida como sendo a melhor 130°C. A sua recuperação pode ser feita de maneira simples, filtrando-se a solução, evitando assim elevados gastos energéticos ou até o envolvimento de operações complexas para a sua recuperação como é o caso do clorofórmio, e demais solventes comumente utilizados para a extração de P(3HB).

A utilização de solventes tóxicos e altamente voláteis para a extração de polihidroxialcanoatos é contraditório ao fato de que estes polímeros vêm sendo amplamente estudados, para minimizar as agressões ambientais causadas pelos polímeros de origem petroquímica.

CAPÍTULO V - CONCLUSÃO

CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo geral melhorar as condições de cultivo de *Ralstonia eutropha* para aumentar a produção de polihidroxibutirato, utilizando como principal estratégia o uso de diferentes temperaturas de cultivo além de estudar um método de extração e recuperação menos agressivo ao meio ambiente do que os normalmente descritos na literatura.

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- O modelo de Gompertz Modificado foi o que apresentou os melhores ajustes para descrever o crescimento do microrganismo, permitindo o cálculo dos parâmetros: velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}), tempo de fase lag (λ) e aumento logarítmico da população (A) de *Ralstonia eutropha* em todas as condições de estudo testadas.
- *Ralstonia eutropha* cresce muito bem nas temperaturas de 30°C, 32,5°C, 35°C e 37,5°C. Os resultados apresentados mostram que a elevação da temperatura, de 30°C para 37,5°C, favorece o crescimento. Entretanto, a temperaturas mais altas pode ocorrer inibição do crescimento, como observado a 40°C.
- A temperatura de 32,5°C e a temperatura de 37,5°C foram as que apresentaram os melhores resultados para o crescimento.
- Embora 37,5°C tenha sido a melhor temperatura para o crescimento, não foi a melhor para a produção. Foi observado que a elevação da temperatura acima de 32,5°C promove um declínio na produção de P(3HB).
- Os estudos mostraram que a melhor temperatura para o crescimento e produção de P(3HB) foi 32,5°C.
- A análise do crescimento e produção de P(3HB) através do emprego da técnica de respirometria mostrou-se excelente ferramenta para prever a limitação e exaustão de nutrientes no meio, uma vez que, quando estes fatos ocorrem a velocidade específica de respiração sofre uma desaceleração (limitação) e posteriormente uma queda (exaustão), mostrando exatamente como se encontra-se a condição fisiológica da célula.

- Atráves dessa técnica, foi possível estipular o valor mínimo exigido pela célula para manter suas funções fisiológicas normais “para a concentração de substrato” no meio visando a posterior produção de P(3HB).
- É possível visualizar, através da evolução da velocidade específica de respiração (QO_2), o momento em que começa a ocorrer a limitação de nitrogênio e, conseqüentemente, o início da produção de P(3HB). Isto é indicado pelo início da desaceleração da QO_2 , o que passa a ser mais acentuado a partir do momento em que ocorre a exaustão do nitrogênio no meio e, conseqüente, maior produção de P(3HB). Por se tratar de uma técnica de análise em tempo real pode ser utilizada em processos industriais envolvendo sistemas biológicos como é o caso do nosso estudo, sabe-se que o estudo da respirometria em processos envolvendo a produção de P(3HB) não tem sido reportado na literatura.
- Com relação ao estudo realizado em culturas de alta densidade celular, pode-se concluir que, levando-se em consideração os resultados obtidos, seria importante se fazer uso da técnica de reciclo de células para que ocorra o aumento e a continuidade da produção de P(3HB) sem interferentes tóxicos no meio de cultivo, visando assim uma maior produtividade e, conseqüentemente, uma diminuição nos custos de produção do processo, além de uma alimentação contínua da fonte de nitrogênio.
- Após analisados os resultados obtidos, é possível afirmar que, dentre os métodos de extração testados, frente ao padrão, o método envolvendo maior tempo de repouso, proporcionou uma maior precipitação das cadeias poliméricas, obtendo-se assim maior rendimento e pureza do polímero extraído.
- Com a condição de temperatura/tempo 130°C/30 min obteve-se as melhores condições de extração com o solvente carbonato de propileno. Esta condição proporcionou os melhores valores em todos os índices analisados frente as demais condições estudadas. O pré-tratamento envolvendo pH e temperatura proporcionou um aumento no peso molecular do polímero após a extração.

- A utilização do carbonato de propileno como solvente na extração do polímero mostrou-se eficiente, comparado à extração padrão que utiliza o clorofórmio como solvente. Sabe-se que o carbonato de propileno tem um custo mais elevado que o clorofórmio, entretanto este solvente menos tóxico quando comparado ao clorofórmio, além de possuir alto ponto de ebulição 140-150°C, podendo ser reutilizado inúmeras vezes em futuras extrações, além de apresentar baixa taxa de evaporação.

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

- Sugere-se a continuidade do estudo sobre alta densidade realizando-se experimentos com reciclo de células mais detalhados.
- Estudar detalhadamente a técnica de respirometria, para extrair melhor as informações que esta técnica pode trazer durante os cultivos.
- Refinar as condições de extração com o solvente carbonato de propileno chegando a uma condição ótima e reprodutível e aplicável.
- Estudar a biodegradabilidade dos filmes obtidos pelo novo método de extração de P(3HB).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN W.S.; PARK S.J.; LEE S.Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, Volume 23, Number 3, February 2001 , pp. 235-240(6).
- AIBA S., HUANG,S. Y. Oxygen permeability and diffusivity in polymer membranes immersed in liquids.**Chem. Eng. Sci.**, 24, 1149, 1969.
- ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Reviews**, 54, 450-472.
- ARAGÃO, G. M. F. **Production de polyhydroxyalcanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre des cultures**. These (Doctorat spécialité: Biologie et genetique Moleculaires et Cellulaires - Biotechnologie) - L'institut National des Sciences appliquees de Toulouse, Toulouse. 1996.
- ASENJO, J.A.; SCHMIDT, A.S.; ANDERSON, P.R.; ANDREWS, B.A. Effect of single nutrient limitation on Poly- -Hydroxybutyrate molecular weight distribution in *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnol. and Bioeng.** 46: 497-502, 1995.
- ASRAR, J., HILL, J. C. Biosynthetic processes for linear polymers. **Journal of Applied Polymer Science**. Volume 83, Issue 3 , Pages 457 - 483.
- BADER H. J., MELLE, I., NICK, S., **Nachwachsende Rohstoffe - Die Natur als chemische Fabrik, Lehrmaterialien für den naturwissenschaftlichen Unterricht der Sekundarstufe I, Lehrerheft, Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V, Gülzow 1997.**
- BAPTIST, J. N. **Process for preparing poly-3-hydroxybutyric acid**. US Patent Application 30.366.959, 1962a.
- BARANYI, J. e ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, 23, 277-294, 1994.

- BARHAM, P. J.; KELLER, A.; OTUN, E. L. & HOLMES, P. A., (1984), *J. Mater. Sci.*, 19, 2781-2794.
- BRANDL, H., GROSS, R. A., LENZ, R. W., et al., 1990, "Plastics from bacteria and for bacteria: poly(3-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters", *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, v. 41, pp. 77-93.
- BRASIL Pack Trends 2005. **Embalagem, distribuição e consumo**. Campinas: CETEA/ITAL, 2000.
- BRAUNEGG, G., LEFEBVRE, G., GENSER, K. F., 1998, "Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects", *Journal of Biotechnology*, v. 65, pp. 127-161.
- BRAUNEGG, G., SONNLEITNER, B. E LAFFERTY, R. M. (1978); A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β - hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 6, 29-37.
- BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R.M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 6, p. 29-37, 1978.
- BUCHANAN, R. L.; WHITING, R. C.; DAMERT, W. C. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiology*, v. 14, p. 313-326, 1997.
- BYROM, D. Industrial production of copolymers from *Alcaligenes eutrophus*. In: Dawes, E. A (ed.). **Novel Biodegradable Microbial Polymers**, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, Netherlands. p. 113-117, 1990.
- BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *TIBTECH*, v. 5, p. 246-250, 1987.
- CALLISTER JR. W. D. **Ciência e Engenharia de Materiais: uma Introdução**, 5ª ed., Rio de Janeiro, RJ, LTC, 2002;
- CANEVAROLO, S. V . **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. 1. ed. São Paulo: ARTLIBER, 2003. v. 1. 444 p.

- CHAN, C. H.; KUMMERLÖWE, C.; KAMMER, H. Crystallization and Melting Behavior of Poly(3-hydroxybutyrate) - Based Blends. **Macromolecular Chemistry and Physics**, Weinheim, Germany, v. 205, n. 5, p.664–675, 2004
- CHANDRA, R; RUSTIGI, R. **Biodegradable Polymers**. Program, Polymer Science, Grã Bretanha, n.23, p. 1273-1335, 1998.
- CHEMICAL MARKET REPORTER, <http://chemicalmarketreporter.com>, acessado em 09/06/2006.
- 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 Microbiol. Biotechnol.**, v. 51, p. 13-21, 1999.
- CHOI, J.; LEE, S. Y.; HAN, K.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 4897.
- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L. e BONATO, P.S. Introdução a Métodos Cromatográficos. 4ª ed., Editora da Unicamp, Campinas, 1990.
- COMEAU Y., HALL, K.J. E OLDHAM, W.K. (1998) Determination of poly-β-hydroxybutyric in activated sludge by gas-liquid chromatography. *Applied and Environmental Microbiology*, *59*, 2325-2327.
- CRANK, M.; PATEL, M.; MARSCHEIDER-WEIDEMANN, F.; SCHLEICH, J.; HÜSING, B.; ANGERER, G.: Techno-economic Feasibility of Large-scale Production of Bio-based Polymers in Europe (PRO-BIP). Report prepared for the European Commission's Institute for Prospective Technological Studies (IPTS), Sevilla, Spain. Prepared by the Department of Science, Technology and Society/Copernicus Institute at Utrecht University, Utrecht, Netherlands and the Fraunhofer Institute for Systems and Innovation Research, Karlsruhe, Germany, October 2004. Disponível em: <http://www.jrc.es/home/pages/detail.cfm?prs=1343> . Acesso: 21 de julho de 2008.
- CURTE, C. Plástico em embalagens para alimentos: herói ou vilão? **Pack**, São Paulo, v.5, n.57, p. 14-15, maio 2002.

- DALCANTON, F. **Produção, extração e caracterização de poli(3-hidroxi-butirato) por *Rashtonia eutropha* em diferentes substratos**. Florianópolis. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
- DALGAARD, P. e KOUTSOUMANIS, K. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. **Journal of Microbiology Methods**, 43, 183-196, 2001
- DAVEY, K. R. e DAUGHTRY, B. J. Validation of a model for predicting the combined effect of three environmental factors on both exponential and lag phases of bacterial growth: temperature, salt concentration and pH. **Food Research International**, 28, 233-237, 1995
- DAWES E. A., SENIOR P. J., The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. **Adv. Microb. Physiol.**, v.10, p.135-266 (1973).
- DOI, Y., KAWAGUCHI, Y., NAKUMURA, Y., KUNIOK, M., 1989. Nuclear magnetic resonance studies metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. **Appl. Envir. Microbiol.**, 55(11): 2932-2938.
- DUFRESNE, A., DUPEYRE, D., PAILLET, M., LIGNOCELLULOSIC Flour-Reinforced Poly(hydroxybutyrate-co-valerate) Composites. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 87 (8): p.1302-1315 (2003).
- ERKMEN, O. & ALBEN, E. Mathematical modeling of citric acid production and biomass formation by *Aspergillus niger* in undersized semolina. **Journal of Food Engineering**, v.52, p.161-166, 2002.
- ERKMEN, O. Predictive modelling of *Listeria monocytogenes* inactivation under high pressure carbon dioxide. **LWT - Food Science and Technology**, v. 33, p. 514-519, 2000.

- FERREIRA B.S., VAN KEULEN, F., FONSECA M.M.R. da . Caracterização, monitorização e controlo de fermentações através da análise de correntes gasosas. Instituto Superior Técnico, Centro de Engenharia Biológica e Química, **Monitorização em Biotecnologia**, Dezembro 1998 - Boletim de Biotecnologia nº 61, pg 1-11.
- FERREIRA, B.S., VAN KEULEN, F., DA FONSECA, M.M.R., Novel calibration method for mass spectrometers for online gas analysis. Set-up for the monitoring of a bacterial fermentation. **Bioprocess Engineering**, 19, 289-296 (1998).
- 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.
- FINDLAY, R. H., WHITE D. C. Polymeric beta-hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.45, p.71-78, 1983.
- FRANCHETTI, S. M. M., e MARCONATO, J C. Polímeros biodegradáveis - uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 4, 811-816, 2006
- GIANNUZZI, L., PINOTTI, A., ZARITZKY, N. Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v.39,p.101-110, 1998.
- GIBSON, A. M.; BRATCHELL, N. & ROBERTS, T.A. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. **Journal of Applied Bacteriology**, v.62, p.479-490, 1987.
- 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.

- GOMES, J. G. C., BUENO NETO, C.L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. **Revista Brasileira de Engenharia Química**. V.17, p. 24-29, 1997.
- GOMES, J. G. C., RODRIGUES, M.F.A., FONTOLAN. Detecção de clones bacterianos produtores de polihidroxialcanoatos (PHAs) através da coloração de Sudan. **Congresso Brasileiro de Microbiologia** 17. p. 1993.
- GOMEZ, J. G. C., FONTOLAN, V., ALLI, R. C. P., RODRIGUES, M. F. A.,BUENO NETTO, C. L., SILVA, L. F. & SIMÕES, D. A. Production of P3HB-co-3HV by soil isolated bacteria able to use sucrose. **Rev Microbiol** 28 (Suppl. 1), 43-48 (1997).
- GOMEZ, J. G. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 1994.
- GRASSIE, N.; MURRAY, E. J. & HOLMES, P. A. - Polymers. Degradability. *Stab.* 47 - 61., 95- 103 (1984)
- GROTHE, E.; MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. (1999) Fermentation optimization for the production of poly(b-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. **Enzyme and Microbial Technology**, 25, 132-141.
- HAHN, S. K.; CHANG, Y. K.; KIM, B. S.; CHANG, H. N. Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 256-261, 1994.
- HÄNGGI, U.J. (1995) Requirements on bacterial polyesters as future substitute for conventional plastics for consumer goods. **FEMS Microbiol. Reviews**. 16, 213-220.
- HASLAM, J.; WILLIS, H. A.; SQUIRREL, D.C.M., "Identification and Analysis of Plastics", Heyden, Londres, (1981).
- 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., 1990, "Separation process", U. S. Patent, nº 4.910.145.
- HRABAK, O. Industrial production of poly- -hydroxybutyrate. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 103 p. 251-256, 1992.

- HUMPHREY, A.E.; TAGUCHI, H. Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. **J. Ferm. Technol.**, 44:881-889, 1966.
- IBGE: Disponível em
: http://www.ibge.net/home/estatística/populacao/condicaoedevida/pnsb/lixo_coletado/lixo_coletado109.shtm.> Acesso em 10. junho. 2006.
- IENCZAK, Jaciane Lutz. **Valorização do resíduo industrial com a produção de Poli (3-hidroxibutirato) por cupriavidus necator**. Florianópolis, 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos.
- JANIGOVA, I.; LACIK, I.; CHODAK, I. Thermal degradation of plasticized poly (3-hydroxybutyrate) investigated by DSC. **Polymer Degradation and Stability**, Oxford, England, v.77, n.1, p. 35-41, 2002.
- JENDROSSEK, D.; SCHIRMER, A.; SCHLEGEL, H. G. Biodegradation of polyhydroxyaldanoic acids. Mini-review. **Appl Microbial Biotechnol.**, 46,p451-456, 1996.
- JENKINS, d. The use of manometric methods in the study of sewage and trade wastes. In: Issac, P.C.G. (ed) **Wastewater Treatment**. Pergamon Press, pp. 99-125. 1960.
- JIN, B.; YU, Q.; YAN, X.Q.; VAN LEEUWEN, J.H. Characterization and improvement of oxygen transfer in pilot plant external air-lift bioreactor for mycelial biomass production. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, 17: 265-272, 2001.
- KAPRITCHKOFF, F. M. ; BONOMI, A. ; MIRANDA, E. A. ; PRADELLA, J. G. C. ; MAIORANO, A. E. ; ZUCCOLO, M. ; SCHMIDELL, W. . Seleção de enzimas visando a lise da parede celular de *Ralstonia eutropha*. In: XIII- SINAFERM - Simpósio Nacional de Fermentações, 2000, Teresópolis. ANAIS DO XIII- SINAFERM (CD-ROM), 2000.

- KAPRITCHKOFF, F. M.; VIOTTI, A. P.; ALLI, R. C. P.; ZUCCOLO, M.; PRADELLA, J. G. C.; MAIORANO, A. E.; MIRANDA, E. A.; BONOMI, A. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. **Journal of Biotechnology**, 2005.
- KARGI, F.; MOO-YOUNG, M. (1985). Transport phenomena in bioprocess. In. *Comprehensive Biotechnology*, 1a edição, Pergamon Press, v.2, p.5-56.
- KARNIOL, T.R. **Pioneirismo brasileiro na produção de plástico biodegradável**. Disponível em >: http://www.neoambiental.com.br/html/noticias_reportagem/html/reportagem/>Acesso em: 07 junho. 2006.
- KHANNA, S., SRIVASTAVA, A. K. "Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates", **Process Biochemistry**, v. 40, pp. 607-619, 2004.
- KIM, B. S. Production of poly (3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 27, p. 774-777, 2000.
- KIM, B. S., LEE, S. Y., CHANG, H. N., , "Production of poly-beta-hydroxybutyrate by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*", **Biotechnology Letters**, v. 14, pp. 811-816, 1992.
- KIM, B. S.; LEE, S. C; LEE, S.Y.; CHANG, H. N.; CHANG, Y.K.; WOO S. I. Production of polyhydroxybutyrate by fed batch with glucose concentration control in *Ralstonia eutropha*. **Biotechnol Bioeng**, v. 43, p. 892-8, 1994.
- KIM, B.S.; LEE, S.C.; LEE, S.Y.; CHANG, H.N.; CHANG, Y.K.; WOO, S.I. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. **Biotechnol. Bioeng.** 43: 892-898, 1994.
- KIM, M. et al. Biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate), Sky-Green_ and Mater-Bi_ by fungi isolated from soils. **European Polymer Journal**, South Korea, n.36, p. 1677-1685, 2000.
- KIM, Y. B., LENZ, R. W., "Polyesters from microorganisms". In: *Biopolyesters*, v. 71, **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, Springer-Verlag, pp. 51-79, 2001.

- KONSTANTINOV, K.B., Monitoring and control of the physiological state of cell cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, 52, 271-289 (1996).
- KRUPP, L. R., W. J JEWELL. Biodegradability of modified plastic filmes in controlled biological environments. **Environ. Sci. Technol.**, v.26, p. 193-198, 1992.
- KURATA, M., AND T. TSUNASHIMA. In **Polymer Handbook**, 3d ed., edited by J. Brandrup and E. H. Immergut. John Wiley and Sons, New York, 1989, p. VII/46.
- L. F. SILVA; J. G. C. GOMEZ; R. C. S. ROCHA; M. K. TACIRO; J. G. C. PRADELLA. Produção biotecnológica de poli-hidroxiálcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil Quím. Nova vol.30 no.7 São Paulo 2007.
- LABUZA, T. P & FU, B. Growth Kinetics for shelf-life prediction: theory and practice. **Journal of Industrial Microbiology**, v.12, p. 309-323, 1993.
- LAFFERTY , R. M., KORSATKO,B. ,W. KORSATKO. Microbial production of poly-&-hydroxybutyric acid. In **Biotechnology**, v. 6b (66), p. 135-176, 1988.
- LAFFORGUE-DELORME, C.; DELORME, C.; GOMA, G.; Continuous Alcoholic Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* Recycle by Tangential Filtration: Key Points fo Process Modelling; **Biotechnology Letters**, v.16(7), p.741-746, 1994.
- LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 1-14, 1996 a.
- 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., WONG, H. H., 1999, "Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review", **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, pp. 31-36.
- LEE, S. Y., KIM, G.I., CHOI, D.K. et al. Improvement of hydroxyvalerate fraction in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by a mutant strain of *Alcaligenes eutrophus*. **J.Ferm. Bioeng.**, v. 81, p. 255-258, 1996.
- LEMOIGNE, M. Products of dehydration and of polymerization of hidroxybutyric acid. Bull.Soc. **Chem. Biol.**, v. 8, p. 770-782, 1926.

- LI, K. Y & TORRES, J. A. Microbial growth estimation in liquid media exposed to temperature fluctuations. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 644-648, 1993.
- LIGGAT, J. J; BRIEN, G.O. Melt processing of BIOPOL® polymers –recent advances. *Internacional Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates* p. 151-160 (1996) impress.
- LIU, F., LI, W., RIDGWAY, D., et al., "Production of poly-beta-hydroxybutyrate on molasses by recombinant *Escherichia coli*", **Biotechnology Letters**, v. 20, pp. 345-348, 1998.
- LÓPEZ, S., PRIETO, M., DIJKSTRA, J., DHANOA, M. S. E FRANCE, J. Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, p. 289-300, (2004).
- LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de Polímeros**. Editora: e-papers, Rio de Janeiro, 2001.
- LUENGO, J.; GARCIA,.; SANDOVAL, A.; NAHARRO, G; OLIVEIRA, E. Bioplastics from microorganisms. **Current Opinion in Microbiol.**, v.6, p.251-260, 2003.
- LUZIER, W. D. **Materials derived from biomass biodegradable materials**. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 89, p. 839-842, 1992.
- MACRAE, R.M., WILKINSON, J.R. Poly-3-hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. **J. Gen. Microbiol.**, v.19, p.210-222 (1958).
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. BROCK. **Biology of Microorganisms**, Prentice-Hall International Editions, Upper Saddle River 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.
- MAKKAR, N. S., CASIDA, L. E. *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 37, 323-326, 1987.
- MANO, E.B. **Introdução aos Polímeros**. Editora Edgard Blücher Ltda., São Paulo, 1985.

- MARANGONI, C. **Estudo de Estratégias de Produção de Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por Ralstonia eutropha Utilizando Substratos de Baixo Custo e Ácido Propiônico**. 2000. 191p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- MASSON, Y., AINSWORTH, P., FULLER, D., BOZKURT, H., IBANOGLU, S. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Candida sake* in homogenized mushrooms under modified atmosphere. **Journal of Food Engineering**, v.54, p.125-131, 2002.
- McMEEKIN, T. A. & ROSS, T. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p. 133-153, 2002.
- METABOLIX, I. Apresenta informações sobre a companhia, seus produtos e pesquisas. Disponível em: < <http://www.metabolix.com>>. Acesso em: 11 de outubro de 2005.
- MILLER, G. L. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MONTGOMERY, H.A.C. The determination of biochemical oxygen demand by respirometric methods. **Wat. Res.** 1, pp 631-662. 1967.
- MOTHE, C. G. e AZEVEDO, A. D., *Análise Térmica de Materiais*, 2002, I Editora/SP, pg 300.
- NASCIMENTO, J. F. **Estudo da processabilidade e da caracterização do Poli(ácido 3-hidroxi-butírico) – PHB obtido a partir da cana-de-açúcar**. 2001, 62p. Dissertação (mestrado em Engenharia Química na área de Concentração, Ciência e Tecnologia de materiais). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, Campinas, São Paulo.
- NEIDHART, F.C., INGRAHAM, J., L., SCHAECHTER, M. Structure and Function of Bacterial Cell Parts. In: **Physiology of the Bacterial Cell – A Molecular Approach**. p. 30-61, ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland, 1990.
- NETTO, C. L. B. *PHB – Plástico biodegradável*. Galeria de Inventores Brasileiros. Disponível em: <<http://inventabrasilnet.t5.com.br/plastico.htm>>. Acesso em: 12/09/2007.

- NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. (1994) **Bioreaction engineering principles**. Plenum Press, New York.
- NOGUEIRA, C. L. ; BOTELHO, E. C. ; REZENDE, M. C. . Monitoring of Nylon 6,6/Carbon Fiber Composites by X-Ray Diffraction and Thermal Analysis. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 86, p. 3114-3119, 2002.
- NONATO, R. V., MANTELATTO, P. E., ROSSELL, C. E. V., 2001, "Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol", **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, pp. 1-5.
- OEDING, V.; SCHLEGEL, H.G. -Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism. **Biochem. J.** 134: 239-248, 1973.
- OLIVEIRA, M. J. – **Microscopia Óptica de Polímeros**. In CANEVAROLO, S. (ed.) – *Técnicas de Caracterização de Polímeros*, Artliber Editora, S. Paulo, 2004.
- 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 p.106. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina.
- OLSSON, L. and NIELSEN, J. On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. **TIBTECH** december 1997 (volume 15).
- OMAR, S., RAYES, A., EQAAB, A, et al., 2001, "Optimization of cell growth and poly(3-beta-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by *Bacillus megaterium* strain", **Biotechnology Letters**, v. 23, pp. 1119-1123.
- PAGE WJ, COMISH A (1993) Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- β -hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol* 59: 4236±4244.
- PELCZAR, Jr. M.J.; CHAN, E.C.S., KRIEG, N. R. **Microbiologia - conceitos e aplicações**. Vol I e II. Ed. Makron Books. 1996.
- PICCOLI, R. A. M.; BUENO NETTO, C. L.; TACIRO, M. K.; URENHA, L. C.; PRADELLA, J. G. C.; PEREIRA, R. P. M.; SIMÕES, D. A.; *Anais do IV Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas*, Maringá, Brasil, 1994.

- PIEMOLINI, L. T. **Modelagem estrutural da PHA sintase de *Chromobacterium violaceum* para estudos de mutação sítio-dirigida**. Florianópolis, 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Universidade Federal de Santa Catarina.
- 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.
- PRADELLA, J. G. C. Biopolímeros e Intermediários Químicos. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, março de 2006. Disponível em: http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr06_biopolimeros.pdf . Acesso em 14 de setembro de 2007.
- **Processo de extração de biopolímeros**, Patente publicada em 04/30/2002 . PI – 9302312 Inventores: Celso Lellis Bueno Netto; Rosane Aparecida Moniz Piccoli (Discente) Imprensa
- RAMSAY, B. A., LOMALIZA, K., CHAVARIE, C., DUBE, B., BATAILLE, P., RAMSAY, J. A. Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric) acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2093-2098, 1990.
- RAMSAY, B. A. **Physiological factor affecting PHA production. Physiology, kinetics, production and use of biopolymers (Proceedings)** p. 9-17, Austria, 1994.
- RAMSAY, J. A., HASSAN, M. C. A., RAMSAY, B. A., 1995, "Hemicellulose as a potential substrate for production of poly(beta-hydroxyalkanoates)", **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, pp. 262-266.
- RAMSAY, J. A.; BERGER, E.; VOYER, R.; CHAVARIE, C.; RAMSAY, B. A. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. **Biotechnol. Tech**, v. 8, p. 589-594, 1994a.
- RATKOWSKY, D. A.; LOWRY, R. K.; McMEEKIN, T. A.; STOKES, A. N & CHANDLER, R. E. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. **Journal of Bacteriology**, v. 154, p. 1222-1226, 1983.
- REDDY, C. S. K., GHAI, R., KALIA, V. C., 2003, "Polyhydroxyalkanoates: an overview", **Bioresource Technology**, v. 87, pp. 137-146.

- REHM, B. H. A., STEINBUCHER, A. Biochemical and generic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 25, p. 3-19, 1999.
- REICH; STIVA, S.S. **Elements of polymer degradation**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1971.p.361.
- REPASKE, R. Nutritional requirements for *Hydrogemonas eutropha*. **J. Bacteriol**, v. 83, p. 418-422, 1962.
- REPASKE, R.; REPASKE, A.C. Quantitative requirements for exponential growth of *Alcaligenes eutrophus*. **Appl. Environ. Microbiol.**32 (4): 585-591, 1976.
- REUSCH, R. N., SADOFF, H.L. D-(-)-poly-3-hydroxybutyrate in membranes genetically competent bacteria. **J. Bacteriol**, v. 156, p. 778-788, 1983.
- RODRIGUES, ALEXANDRE DANTAS. **Estudo da produção de polihidroxibutirato por *Cupriavidus necator* em fermentação no estado sólido**. [Rio de Janeiro] 2005 XI, 86 p. (COPPE/UFRJ, M.Sc., Engenharia Química, 2005) Tese - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE.
- ROOS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **J. Appl. Bacteriol.** v. 81, p. 501-508, 1996.
- ROSEN, S.L., **Fundamental Principles of Polymeric Materials**, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1993.
- ROSS, T. & McMEEKIN, T. A.Review Paper. Predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p.241-264, 1994.
- RYU HW, CHO KS, KIM BS, CHANG YK, CHANG HN, SHIM HJ (1999) Mass production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch cultures of *Ralstonia eutropha* with nitrogen and phosphate limitation. **J. Microbiol. Biotechnol.** **9**: 751–756.
- Ryu, H. W.; Hahn, S. K.; Chang, Y. K.; Chang, H. N.; **Biotechnol. Bioeng.** 1997, 55, 28.
- SALEHIZADEH, H., VAN LOOSDRECHT, M. C. M., 2004, "Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance", **Biotechnology Advances**, v. 22, pp. 261-279.

- SATOH, H. (1991) Biochemical mechanisms of the anaerobic substrate uptake by enhanced biological phosphorous removal activated sludges. Master Thesis, Departement of urban and Environmental Engineering, University of Tokyo.
- SAVENKOVA, L. et al. Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based films. **Process Biochemistry**, Letônia, n.35, p. 573-579, 2000.
- SCHAFFNER, D. W. & LABUZA, T. P. Predictive Microbiology: where ar we and where ar we going? In: Overview-Outstanding symposia in food science & technology). **Food Technology**, v.51, n.4, p.95-99, 1997.
- SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores. In: **Biotecnologia Industrial Vol II: Engenharia Bioquímica**. (Schmidell W., Lima U.A., Aquarone E., Borzani W., eds.), São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., p. 277-331, 2001.
- SCHNEIDER, A. L. S. **Síntese, caracterização e biodegradação de poli-3-hidroxibutirato obtido por Ralstonia eutropha**. Florianópolis, 2006. Tese de doutorado em Engenharia Química – 220p. Universidade Federal de Santa Catarina.
- SCOOT, G. e GILEAD, D. **Degradable Polymers**. London: CHAPMAN & HALL, 1995.
- **Separation process for a 3-hydroxybutyrate polymer**. Patente publicada em 29 Maio de 2003. EP 0145233 MONSANTO COMPANY Impressa.
- SERAFIM L. S., LEMOS, P. C., REIS, M. A. M. Change in Metabolism of PHA Accumulation by Activated Sludge Modifying Operating Conditions. **Water Science and Technology**, (2002). 46 (1-2), 353-356.
- SHIMÃO, M. **Biodegradation of plastics**. Current Opinion in Biotechnology, Japão, n.12, p. 242-247, 2001.
- SILVA, G.A., **Compatibilização de Blendas de acetato de celulose e poliestireno com viniltriacetoxissilano: comportamento morfológico e biodegradação**. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, (2002)
- SILVA, L. F. ; TACIRO, M. K. ; PRADELLA, J. G. C. ; GOMEZ, José Gregório Cabrera . Fábrica viva de plástico biodegradável. **Ciência Hoje**, RJ, v. 29, n. 174, p. 69-71, 2001.

- SILVA, L. F., GOMEZ, J. G. C., OLIVEIRA, M. S. & TORRES, B. B. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) production by *Burkholderia* sp. **J Biotechnol** 76, 165-174 (2000).
- SIM, S. J., SNELL, K.D., HOGAN, S.A., et al. PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo. **Nature Biotechnol.**, v. 15, p. 63-67, 1997.
- SIM, S. J.; SNELL, K. D.; HOGAN, S. A.; STUBBE, J.; RHA, C. & SINSKEY, A. J., (1997), *Nature Biotechnology*, 15, 63-67.
- SOTERO, A.P. Plásticos biodegradáveis trazem melhoria ambiental. **Jornal de Plásticos**, v.43. ago. 2000 Disponível em: < <http://www.jorplast.com.br/jpago00/agoindex.html> > Acesso em: 13 junho. 2006.
- SQUIO, C. R. **Estratégias de Alimentação e Utilização de Suplementos Nutricionais na Produção de Poli (3-Hidroxibutirato-co-3-Hidroxivalerato) por *Rastonia eutropha***. 2003. 161p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- STANBURY, P.F., WHITAKER, A., HALL, S.J., Principles of fermentation technology. Elsevier/Pergamon, Oxford, 1995.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1989). 17th Ed., American Public Health Association, Washington, D.C.
- STAPP, C. Über die reserveinhaltsstoffe und den schleim von *Azotobacter chroococcum*. **Zentbl Bakteriol II**, v.61, p.276-292 (1924).
- STEINBÜCHEL, A., 1996, "P (3HB) and other polyhydroxyalkanoic acids". In: Products of primary metabolism, v. 6, **Biotechnology**, VCH, pp. 403-464.
- STEINBÜCHEL, A., VALENTIN, H.E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiol. Letter**, v. 128, p. 219-228, 1995.
- STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH, B. Bacterial and other biological systems for polyester production. **TIBTECH**, v. 16, p. 419-427, 1998.

- STEINBÜCHEL, A.; HUSTEDE, E.; LIEBERGESELL, M.; PIEPER, U.; TIMM, A.; VALENTIN, H. (1992) Molecular-basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, 103, 217-230.
- STICKLAND, L. H. The determination of small quantities of bacteria by means of the Biuret reaction. **J. Gen. Microbiol.** 1951, 5, 689-703.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Prog. Polym. Sci.**, v. 25, p. 1503-1555, 2000.
- SUTHERLAND, J. P.; BAYLISS, A. J. Predictive modelling of *Yersinia enterocolitica*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. **International Journal Food Microbiology**, v. 21, p. 197-215, 1995..
- TAIDI, B., MANSFIELD, D.A., ANDERSON, A.J. Turnover of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) and its influence on the molecular mass of the polymer accumulation by *Alcaligenes eutrophus* during batch culture. **FEMS Microbiol. Letter**, v. 129, p. 201-206, 1995.
- TANAKA, K., ISHIZAKI, A., KANAMARU, T., KAWANO, T. Production of poly-(D-3-hydroxybutyrate) from CO₂, H₂ and O₂ by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 1512-1515, 1994.
- TAVARES, L. Z. ; SILVA, e S ; PRADELLA, J. G. C. ; BONOMI, A . Comparação Da Produtividade de PHB em Biorreator Airlift e Tanques Agitados. In: XIII Simposio Nacional de Fermentações, 2000. ANAIS, 2000. v. 1. p. 2pp.
- Tecnologia e informação a serviço da sociedade. Plásticos Biodegradáveis. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/noticentro/2007/08/maria_filomena.pdf - Acesso em: 25 de Janeiro de 2008.
- TIAN, J., SINSKEY, A. J, and STUBBE, J. Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy. **Journal of Bacteriology**, 2005, p. 3814-3824.

- TOBAJAS, M. e GARCIA, C. E. Comparison of analysis methods for determination of kinetic parameters in batch culture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 845-851, 2000.
- TORTORA, G, FUNKE, B. R. CASE, L.L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas. 2004.
- TRIBE, A.; BRIENS, C. L.; MARGARITIS, A. (1995) Determination of the volumetric mass transfer coefficient (KLa) using the dynamic "gas out-gas in" method: analysis of errors caused by dissolved oxygen probes. **Biotechnol. Bioeng.** 46:388-392.
- TSUJI, H. AND IKADA, Y. Blends of aliphatic polyesters. 1. Physical properties and morphologies os solution-cast blens from poly(DL-lactide) and poly(ϵ -caprolactone), **J. Applied Polym. Sci.**, v. 60, 2367-2375, 1996
- **Use of cyclic carbonic acid esters as solvents for poly-(β -hydroxybutyric acid)**. Publicada em 20/02/1979. US 4140741. Inventores: Lafferty, Robert M. (Graz, AT) Heinzle, Elmar (Graz, AT). Disponível em: <http://www.freepatentsonline.com/4140741.html>.
- Van der WALLE, G. A. M., DE KONING, G. J. M., WEUSTHIUS, R. A., et al., 2001, "Properties, modifications and applications of biopolyesters". In: Biopolyesters, v. 71, **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, Springer-Verlag, pp. 263-291.
- VERHOOGT, H., RAMSAY, B. A., FAVIS, B. D. Polymer Blends containing poly(3-hydroxybutarate). **Polymer**, v.35, no 24, p 5155-5169 (1994).
- VOGEL C., MORITA S., SATO H., NODA I., OZAKI Y., AND SIESLER H. W., "Thermal Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) in Nitrogen and Oxygen Studied by Thermogravimetric-Fourier Transform Infrared Spectroscopy," *Appl. Spectrosc.* **61**, 755-764 (2007)
- VOGELSAGER N. JR.; FURLAN S. A; SCHNEIDER A. L. S.; A. T. N. PIRES; S.H. PEZZIN; A.P.T. PEZZIN. Filmes de P(3HB) e PCL: Acompanhamento da Biodegradação em Solo por Propriedades Térmicas e Morfológicas. **Revista Matéria**, v. 9, n. 4, pp. 370 - 377, 2004.

- WACHENHEIM, D. E.; PATTERSON, J. A.; LADISCH, M. R. Analysis of the logistic function model: derivation and applications specific to batch cultured microorganisms. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 157-164, 2003.
- WHITING, R. C. Microbial Modeling in Foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, p.467, 494, 1995.
- WONG, H. H.; LEE, S. Y.; **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **1998**, 50, 30.
- YABUUCHI E., K. Y., YANO I.,HOTTA H., NISHIUCHI Y.,. Transfer of two Burkholderia and Alcaligenes species to Ralstonia gen. Nov.: Proposal of Ralstonia pickettii (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., Ralstonia solanacearum (Smith 1896) comb. Nov. and Ralstonia eutropha (Davis 1969_comb. Nov.). **Microbiol. Immunol**, v. 39, p. 897-904, 1995.
- YAMANE, T. Yield of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: A theoretical study. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 41, p. 165-170, 1993.
- YAU, W.W., KIRKLAND, J.J., AND BLY, D.D. eds, (1979). *Modern Size Exclusion Liquid Chromatography*, **J. Wiley and Sons**.
- ZABRISKIE, D.W. E HUMPHREY, D.W. (1978), Real-time estimation of aerobic batch fermentation biomass concentration by component balancing, *AIChE Journal*, v. 24, n. 1, p. 138-146.
- ZHANG, L.L.; GOH, S.H.; LEE, S.Y.; HEE, G.R. **Polymer**, v. 41. p. 1429-1439, 2000.
- ZWIETERING, M. H. ; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M. & VAN'T RIET, K. Modeling of bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.1875-1881, 1990.
- <http://portal.an.com.br:8000/recicle/4rec.htm>. Acesso: setembro de 2007
- http://www.cempre.org.br/cempre_informa.php?lnk=ci_2007-0708_desafios.php. Acesso: Agosto de 2007
- http://www.ima.ufjf.br/linhaspes/recicl_pet_alex.htm. Acesso dezembro de 2007.
- <http://www.biocycle.com.br/site.htm>. Apresentação Biocycle Ciclo da Vida - disponível em: - Acesso em 24 de fevereiro de 2008.

ANEXOS

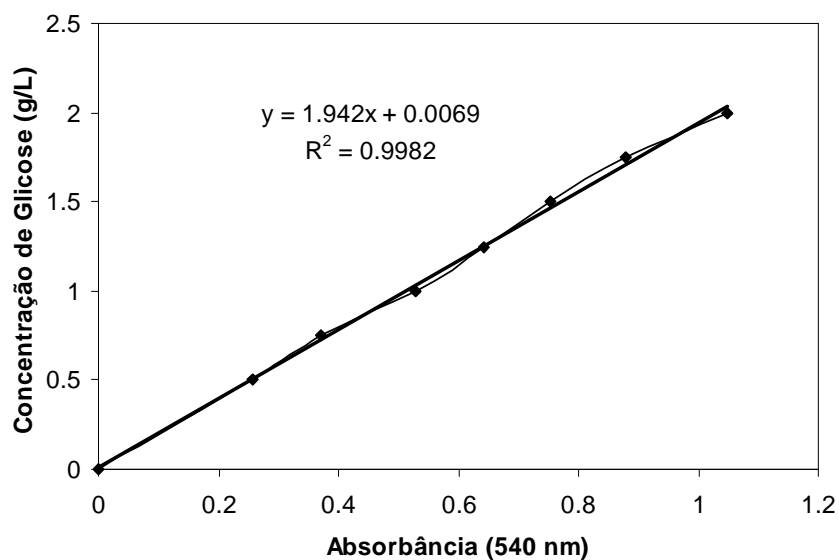
ANEXO A

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

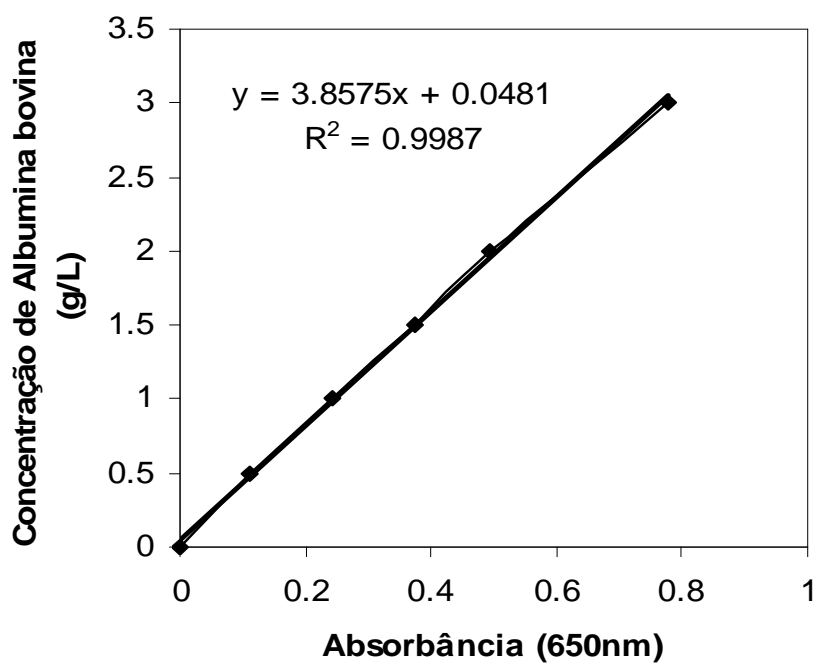


Figura A.2 - Curva de calibração de determinação da concentração de proteínas pelo método de biureto, utilizando-se albumina bovina como padrão.

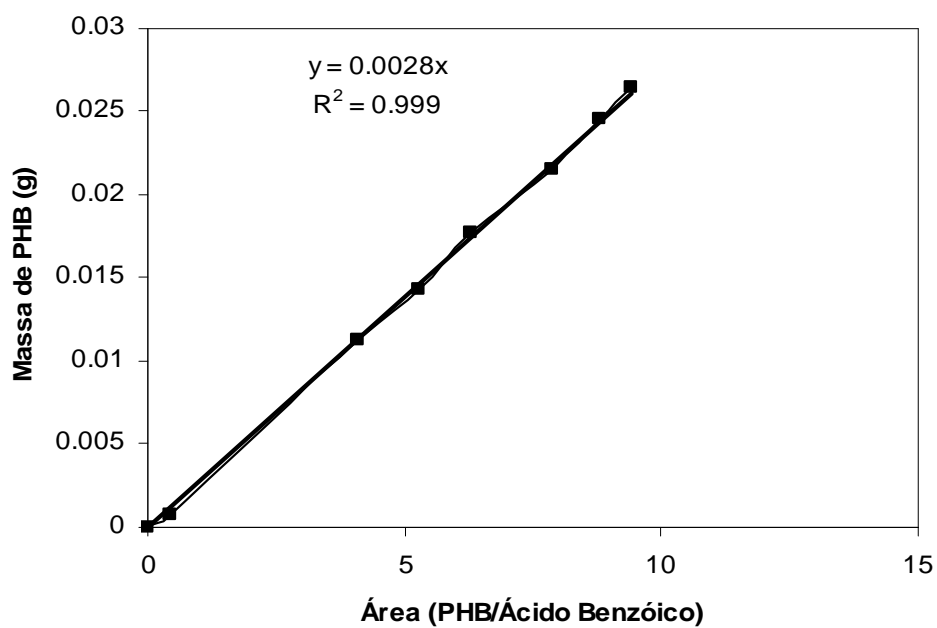


Figura A.3 - Curva típica padrão para a determinação da concentração de P(3HB).

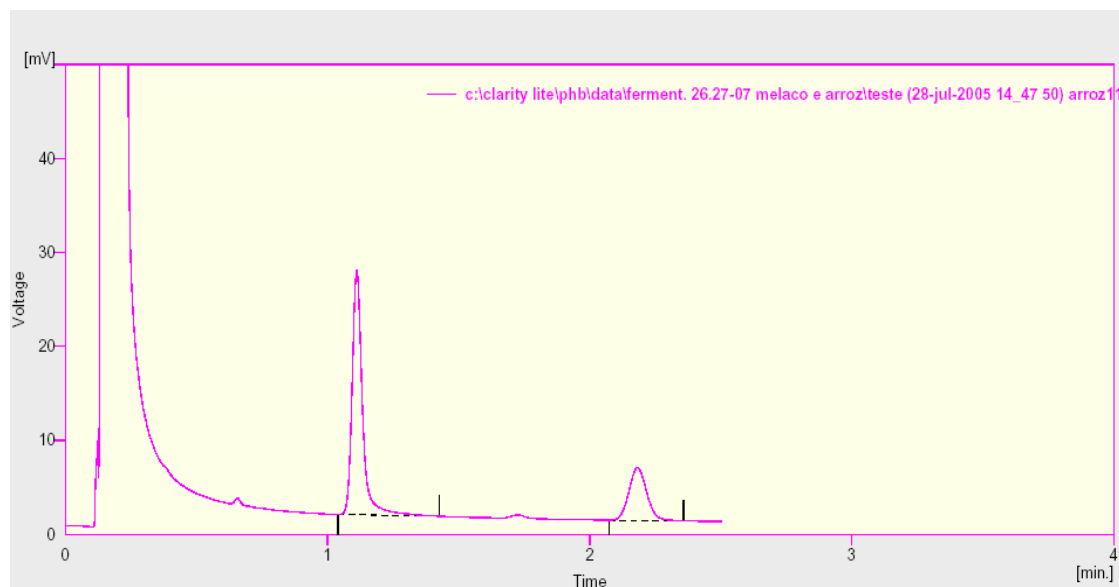


Figura A.4 - Exemplo de um cromatograma de análise de P(3HB).

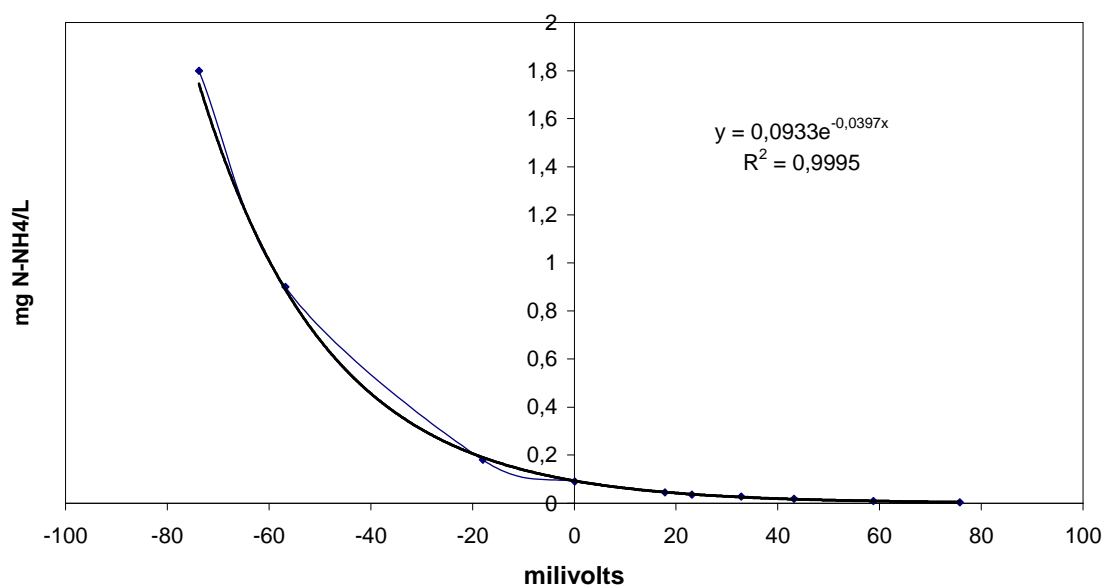


Figura A.5 - Curva Padrão para a determinação da concentração de nitrogênio (Universidade Nova de Lisboa)

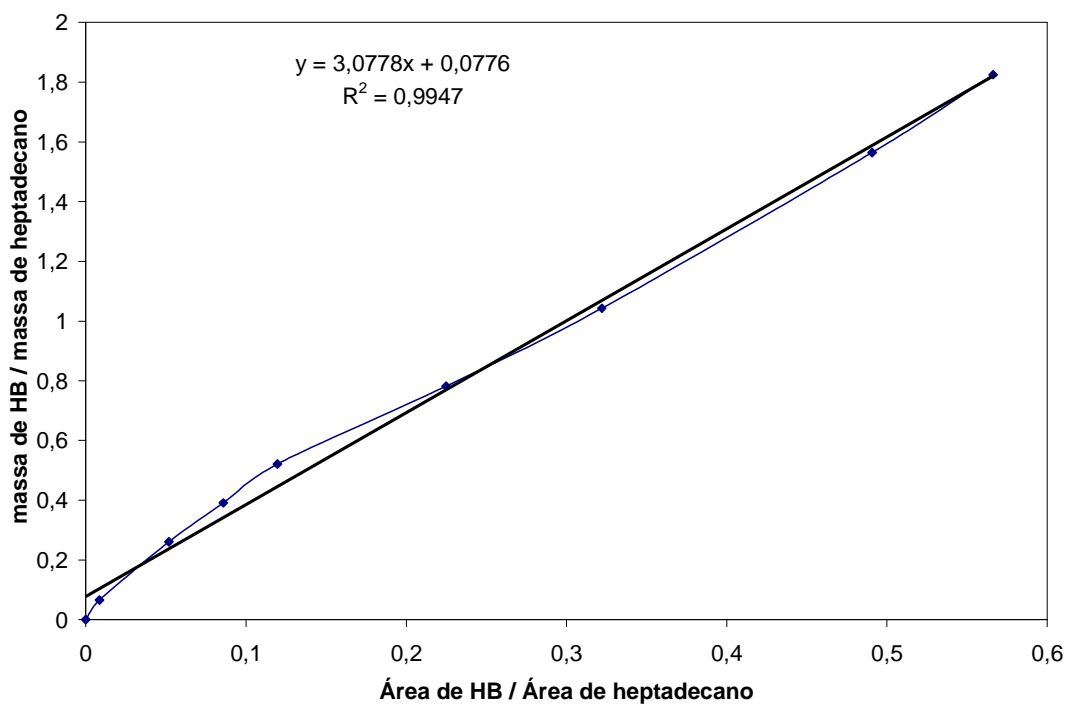


Figura A.6 - Curva padrão para a determinação da concentração de P(3HB) (Universidade Nova de Lisboa) .

ANEXO B

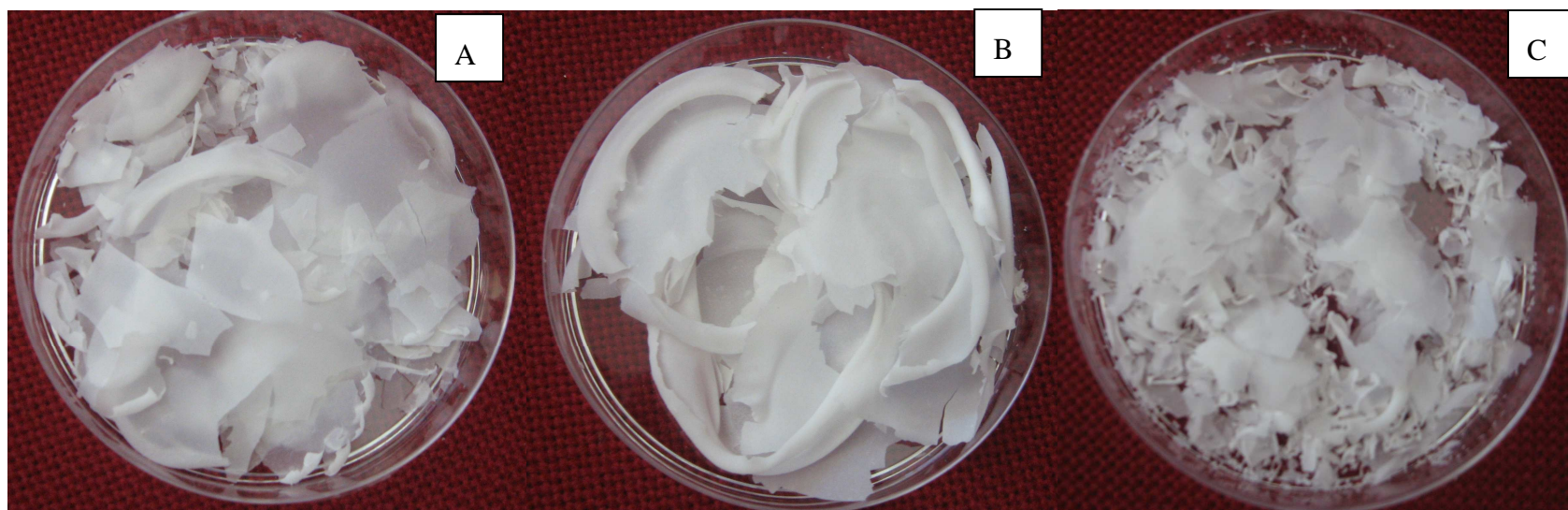


Figura B.1 - Filmes de P(3HB) extraídos 130°C/15min(a), 130°/30min (b) e 145°C/15min (c).

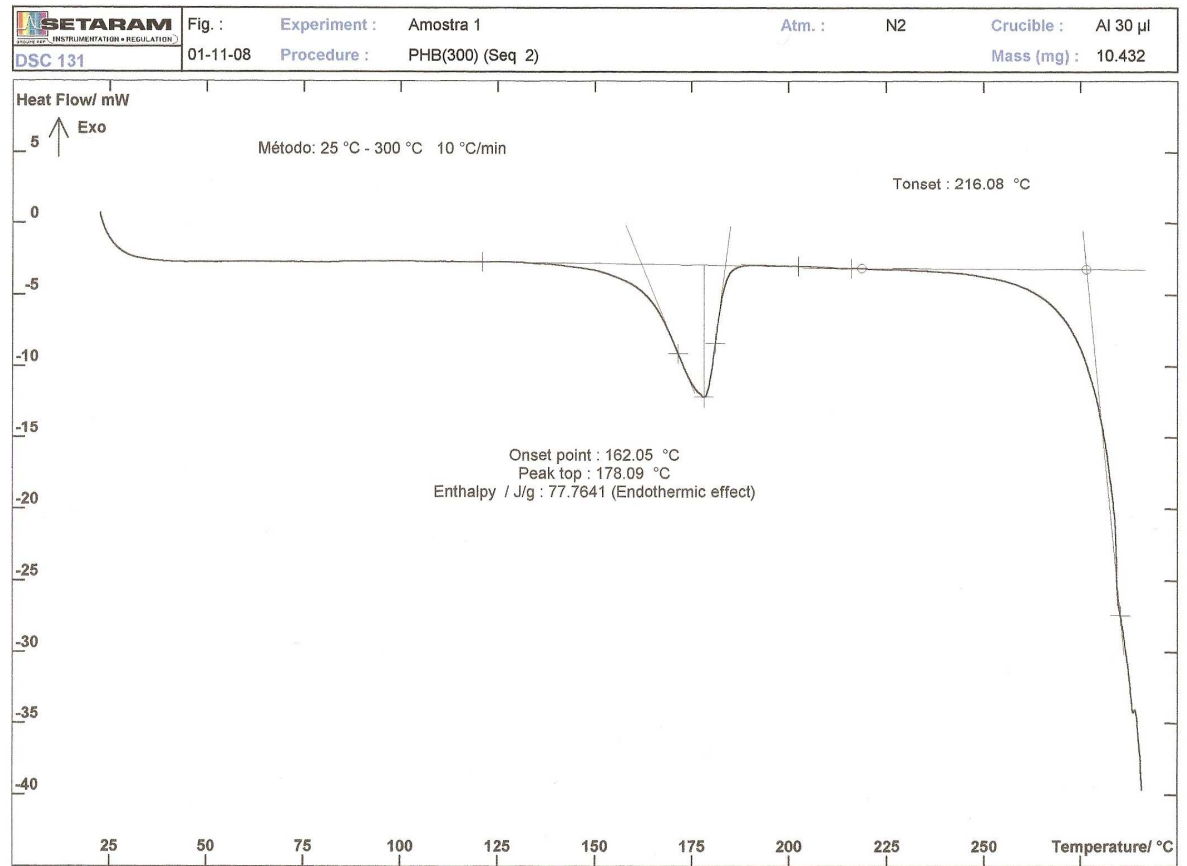


Figura B.2 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 145°C/45min, método 3.

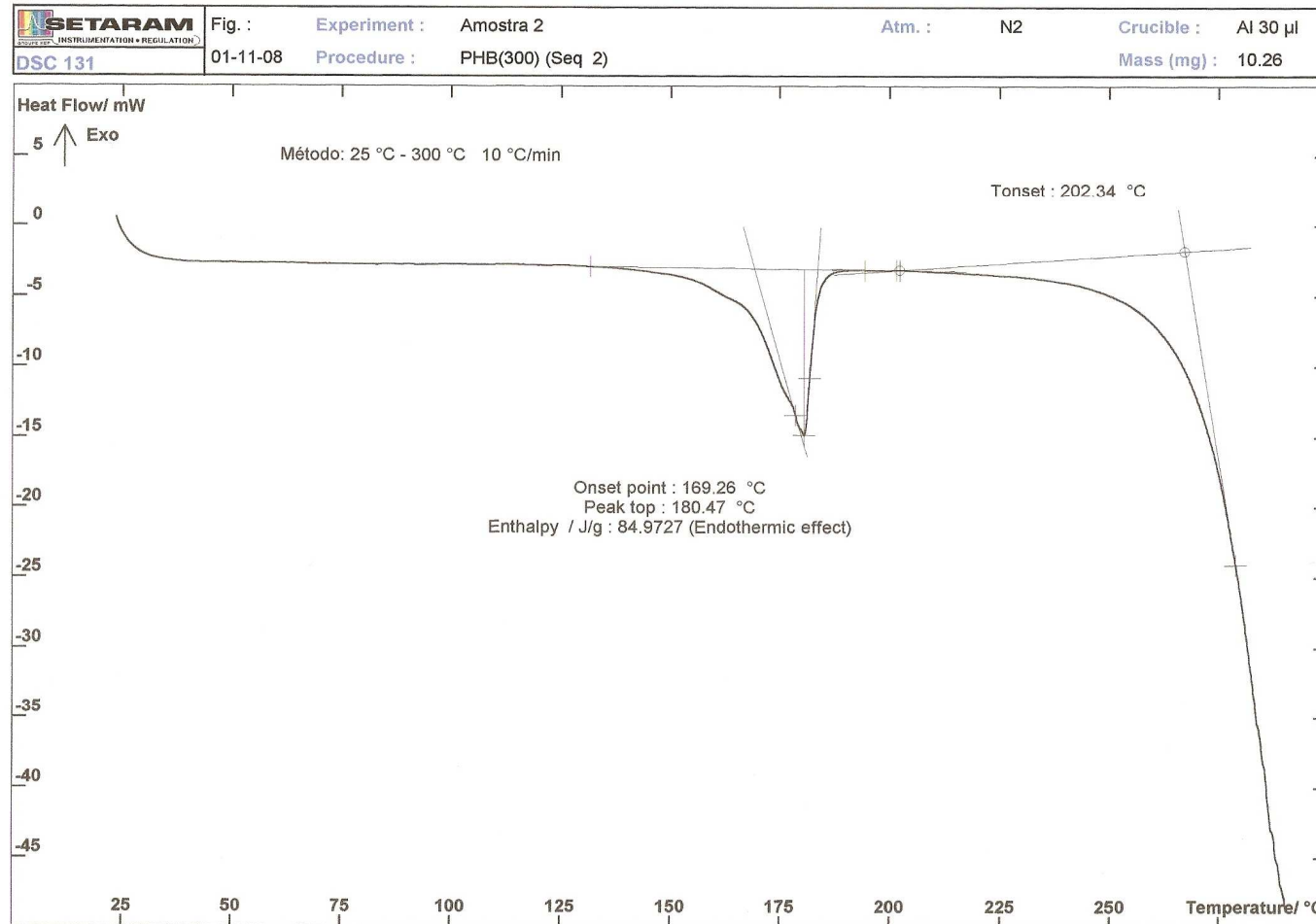


Figura B.3 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 130°C/30min, método 3.

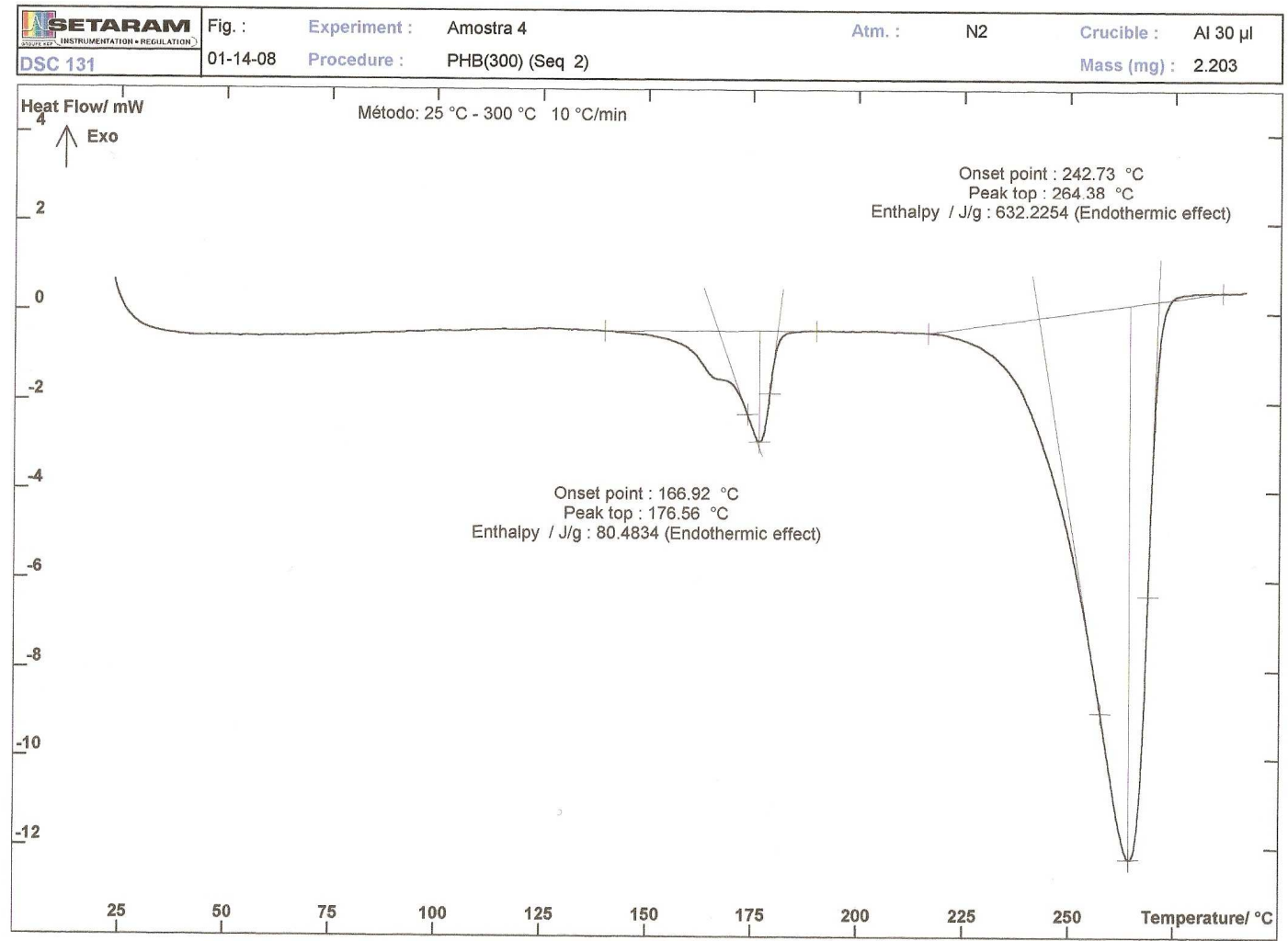


Figura B.4 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 100°C/15min, método 3.

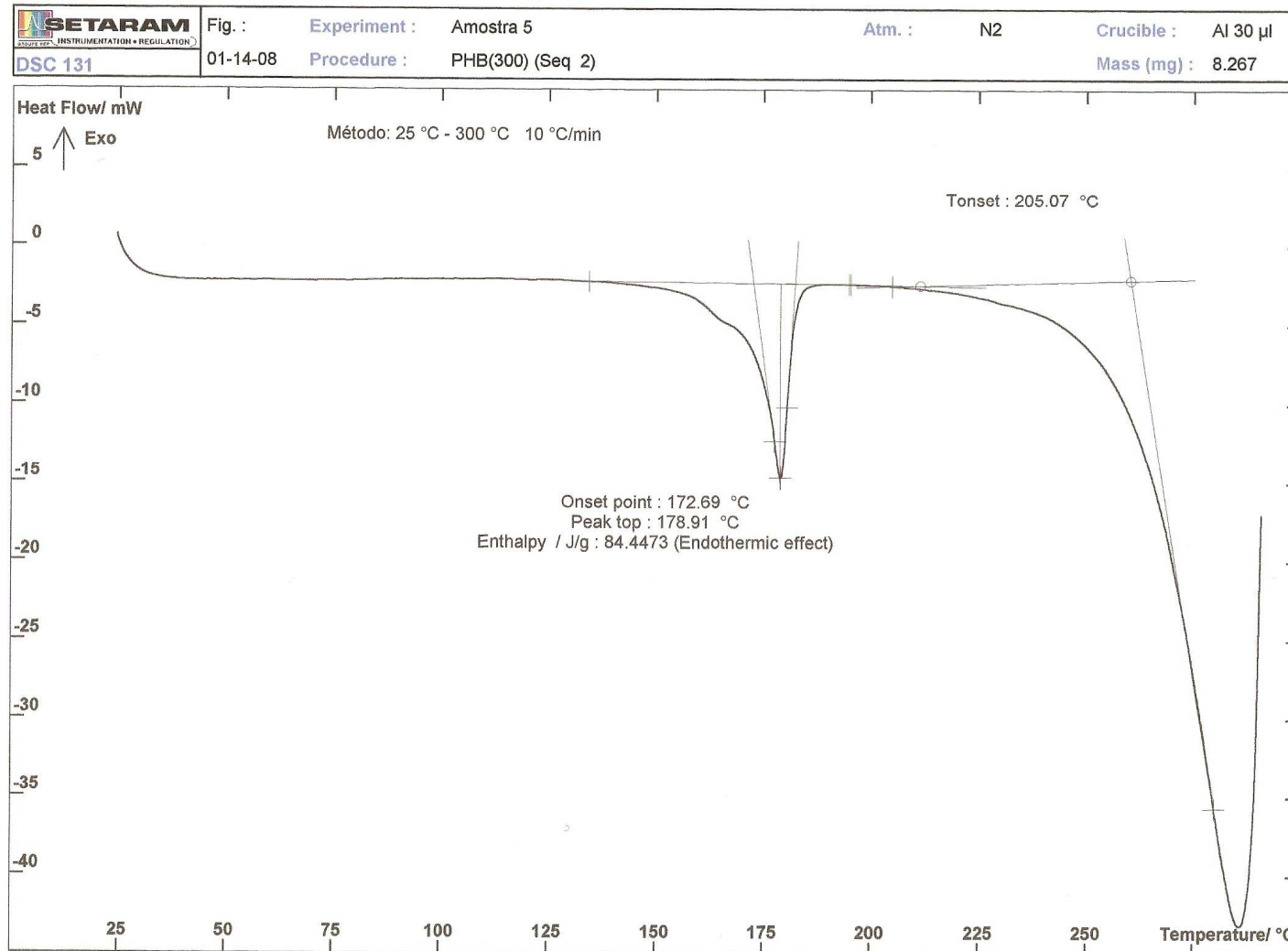


Figura B.5 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 100°C/45min, método 3.

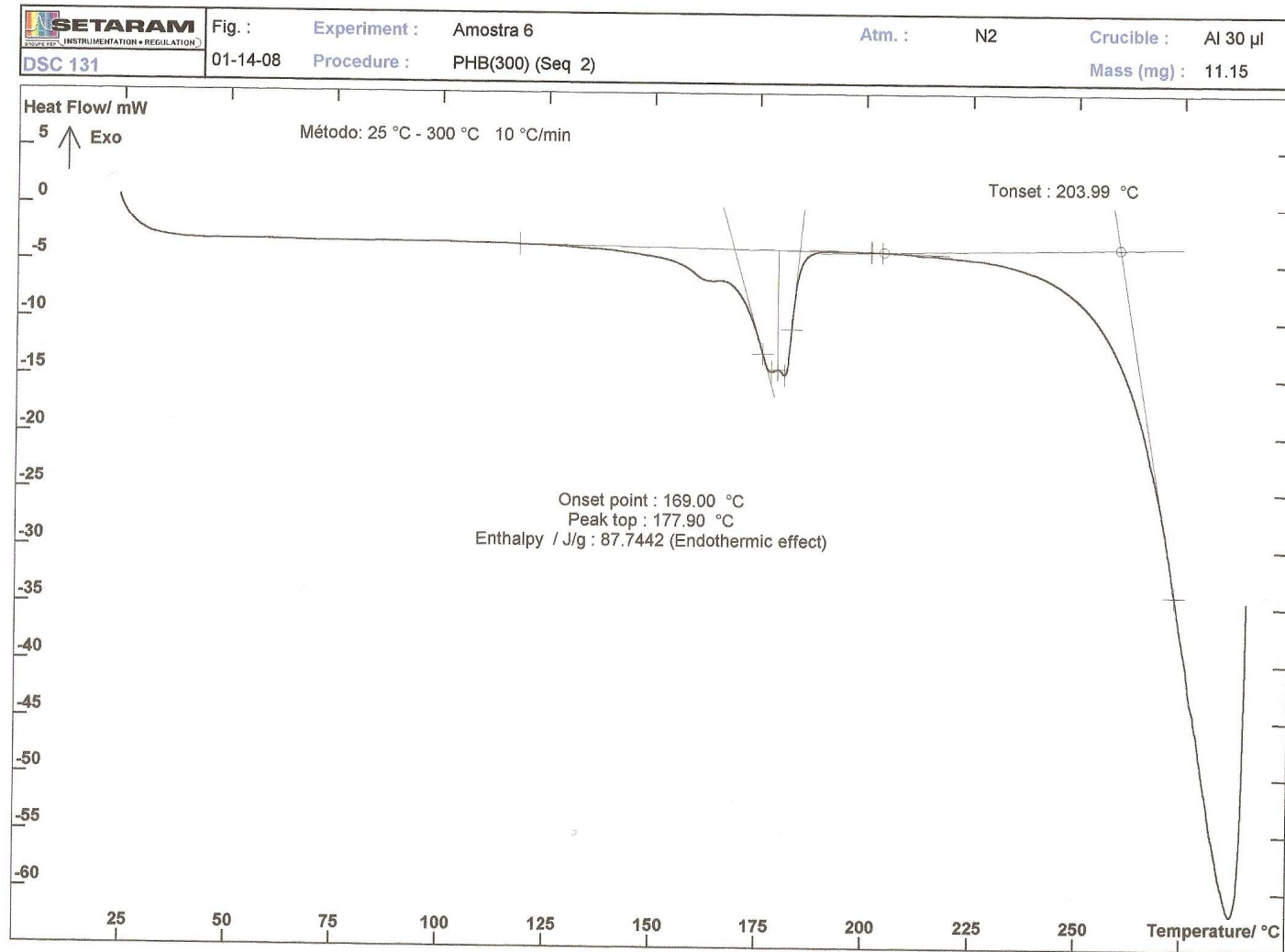


Figura B.6 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 130°C/15min, método 3.

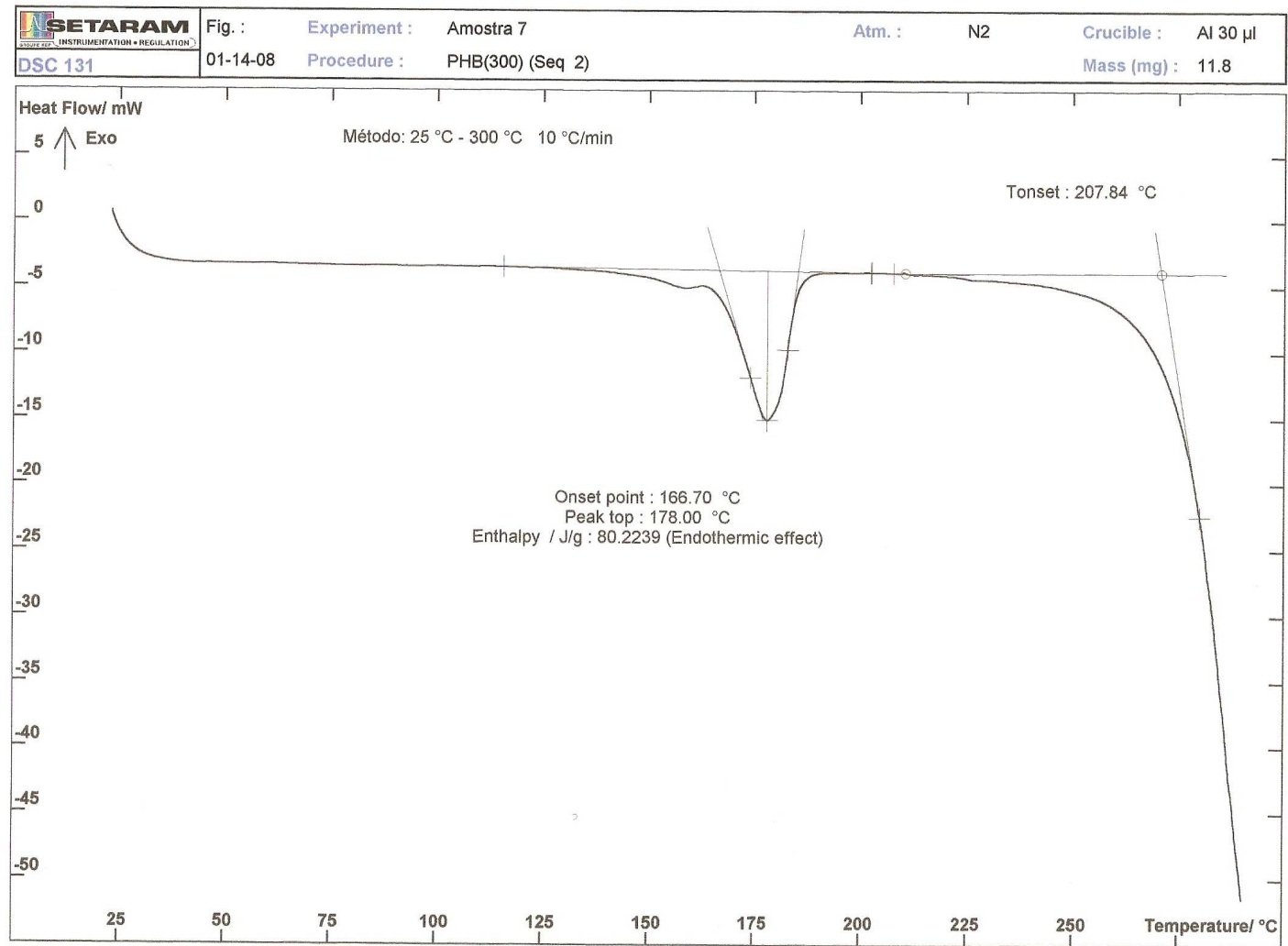


Figura B.7 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído pelo método Padrão (solvente clorofórmio).

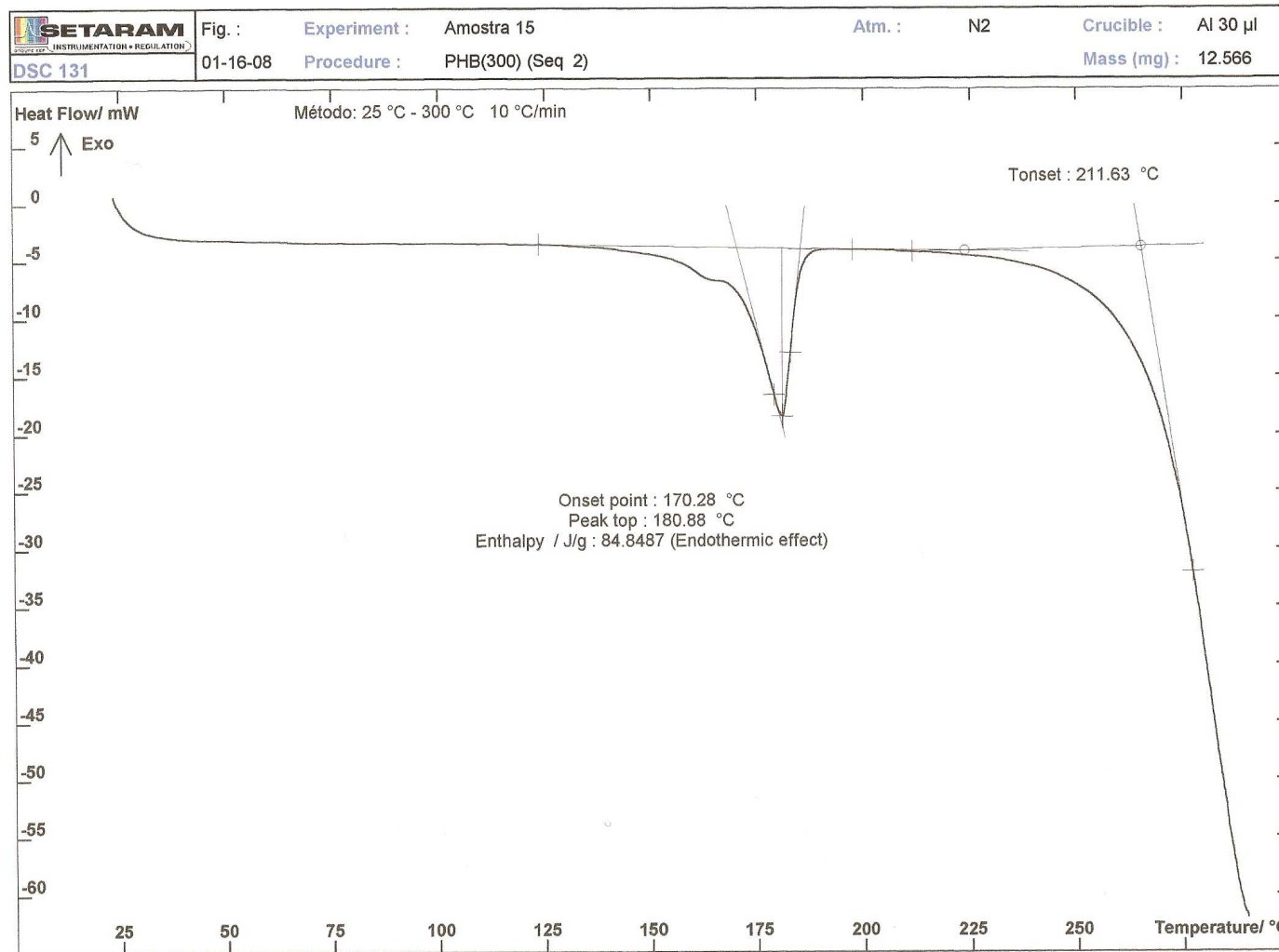


Figura B.8 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 145°C/30min, método 3.

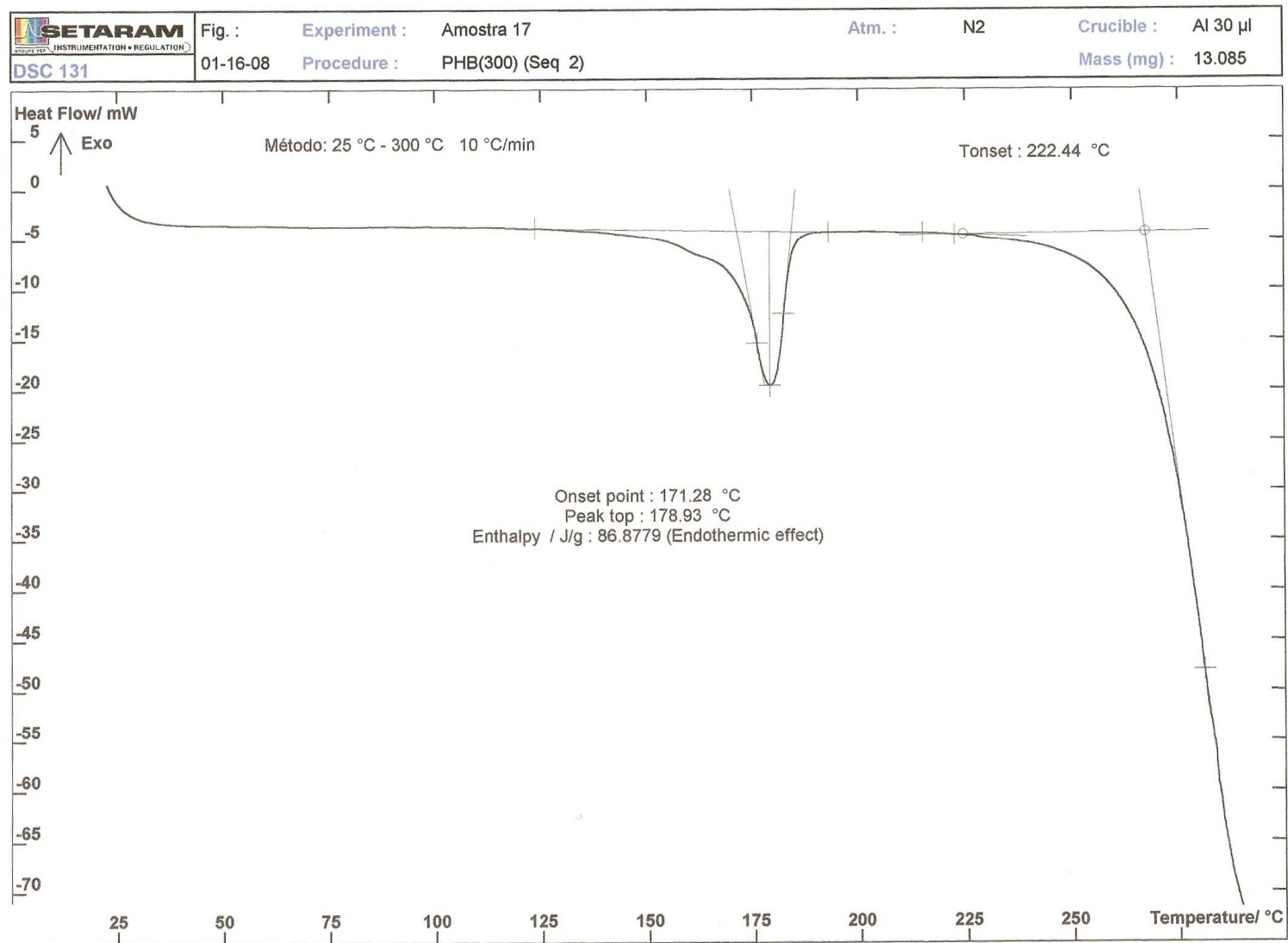


Figura B.9 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 115°C/45 min, método 3.

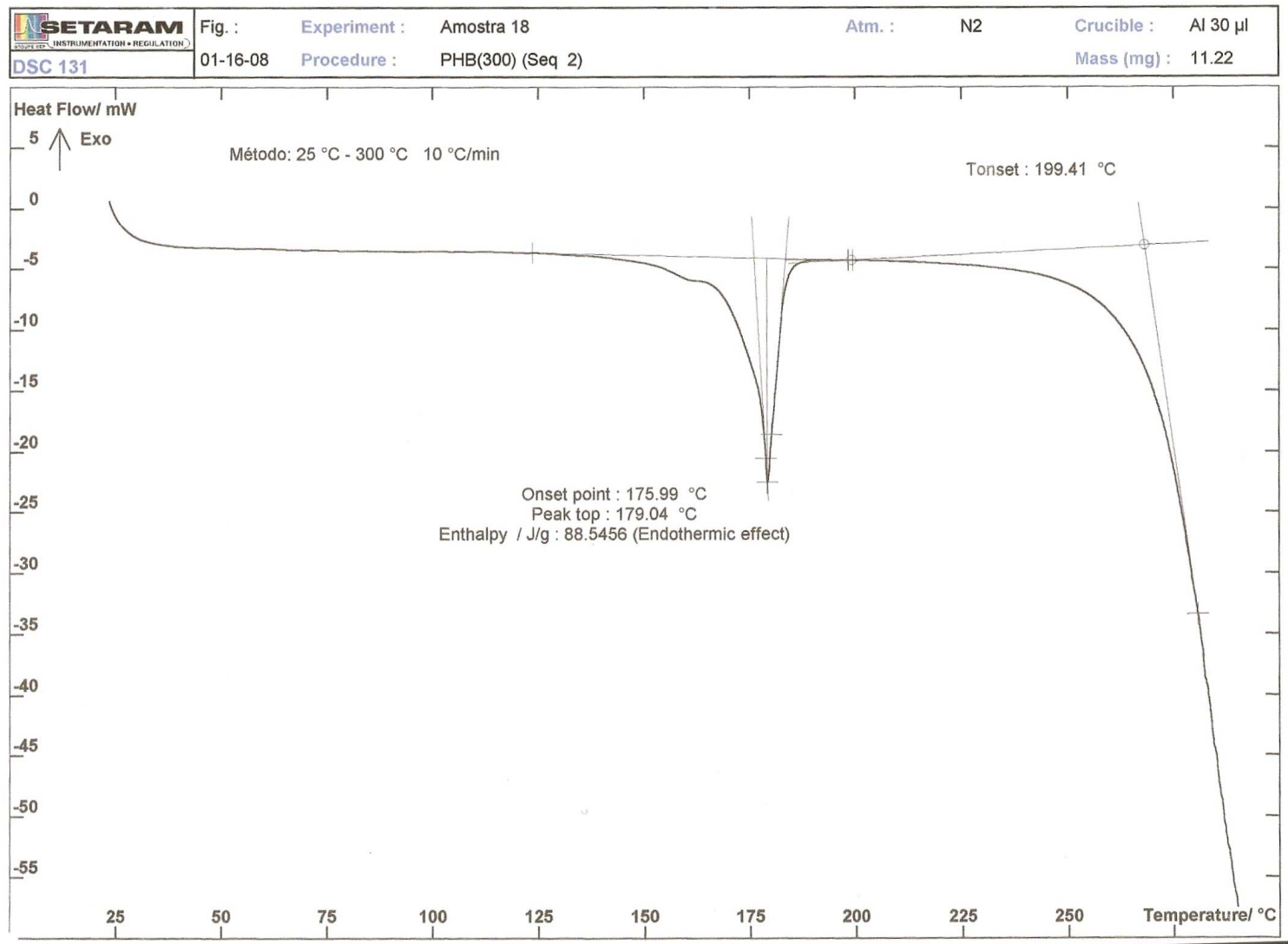


Figura B.10 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 145°C/15 min, método 3.

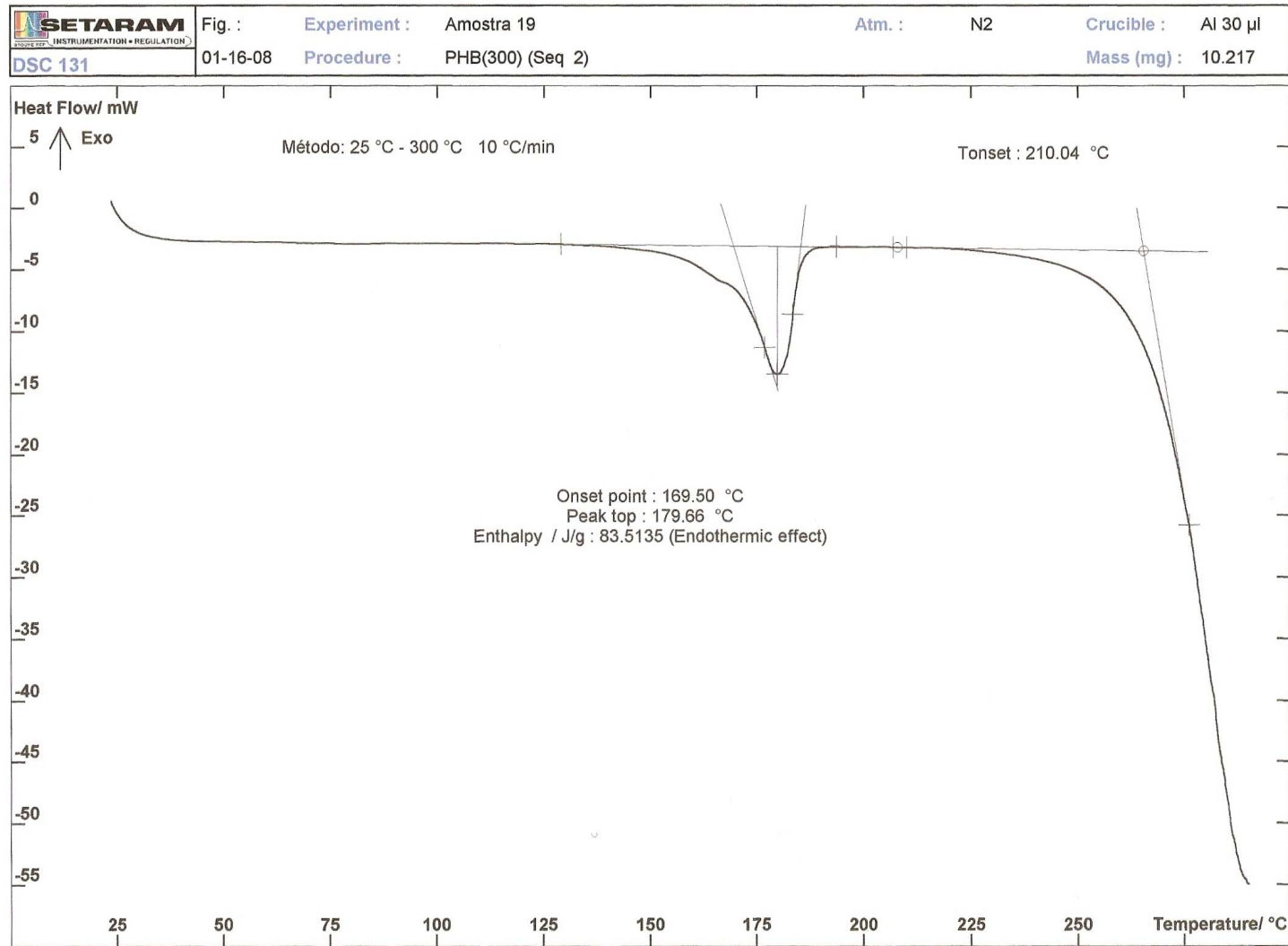


Figura B.11 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 130°C/30min, método 2.

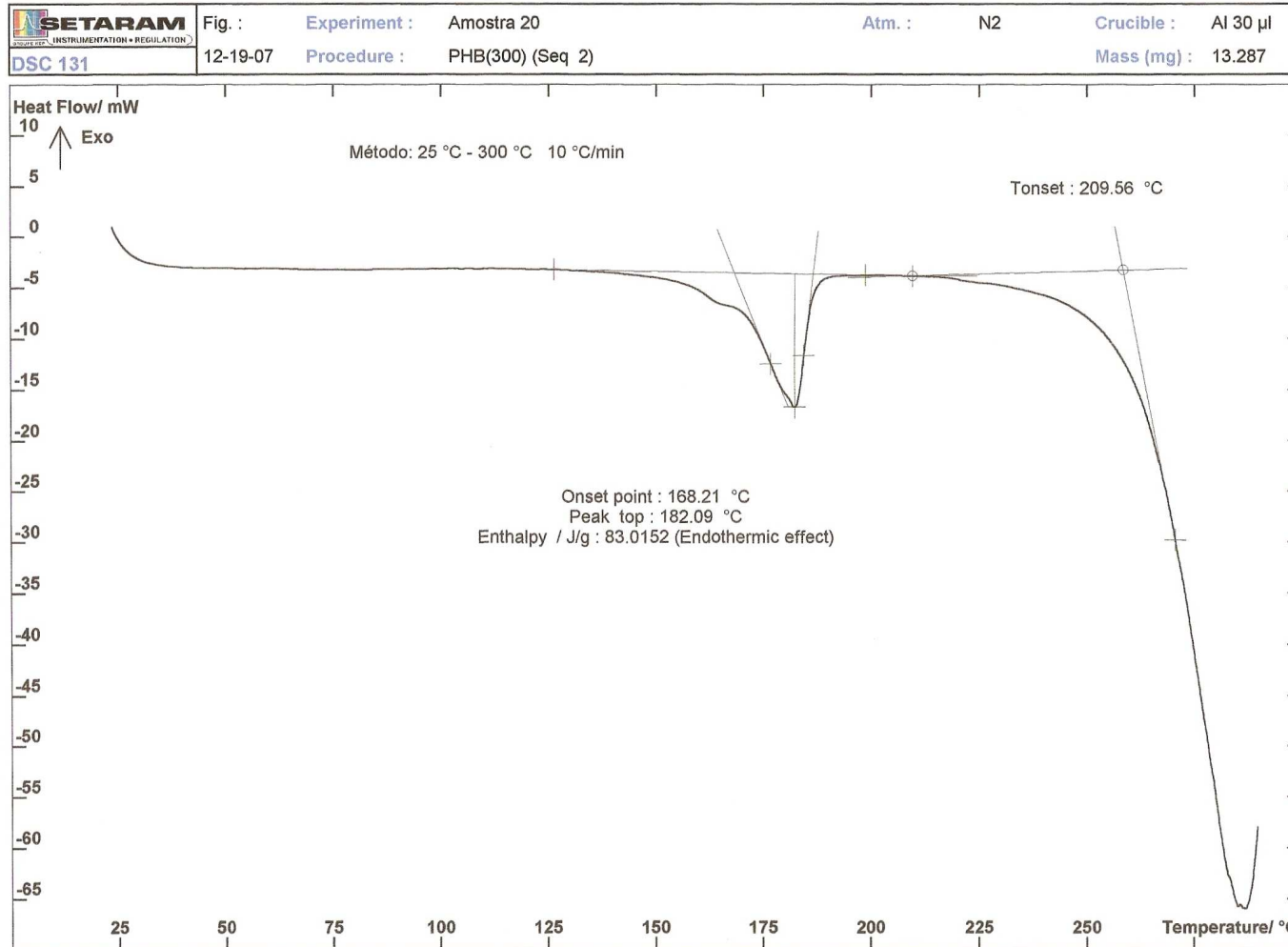


Figura B.12 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 130°C/30 min, método 1.

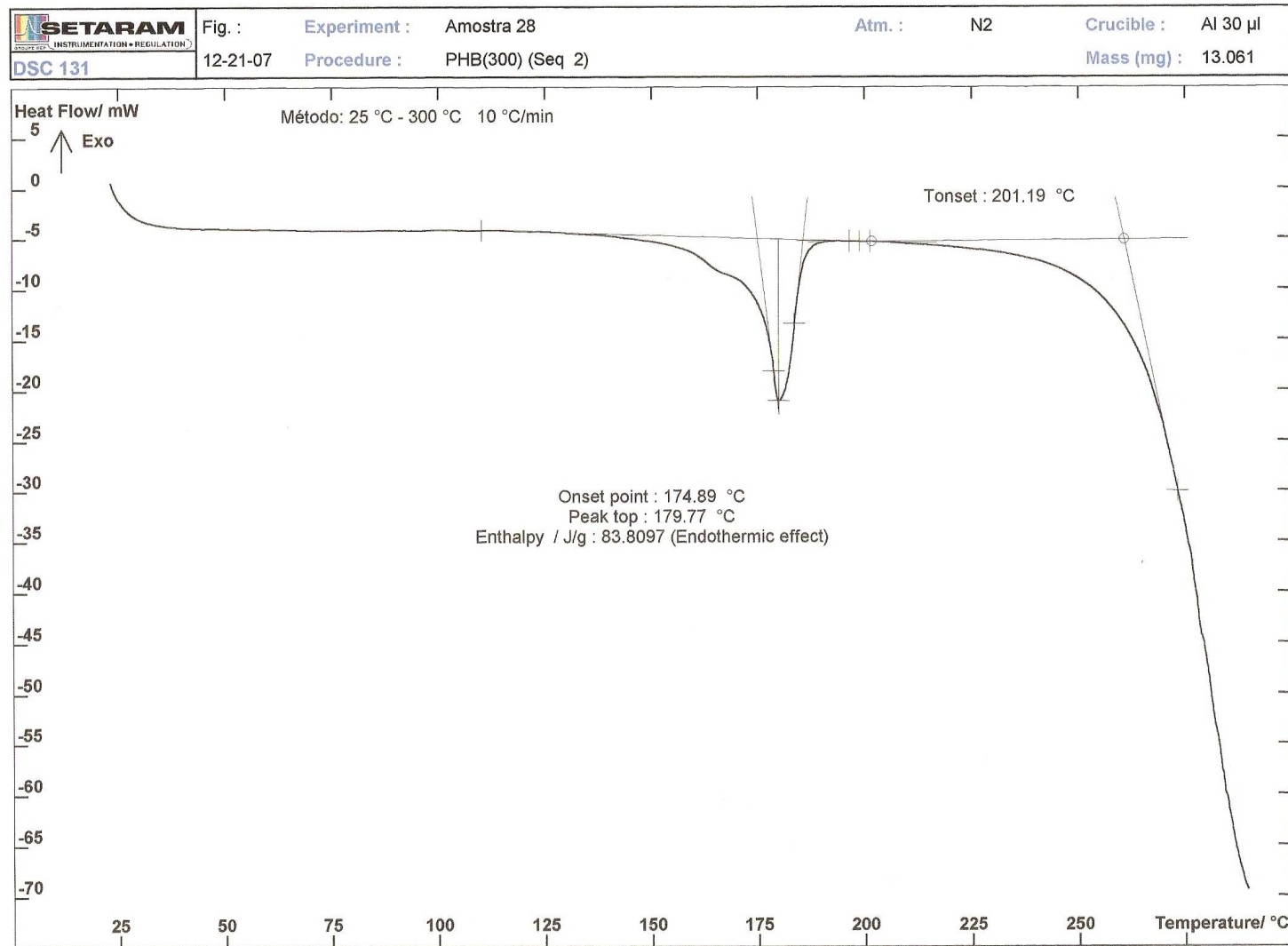


Figura B.13 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 130°C/30 min, com pré-tratamento pH.

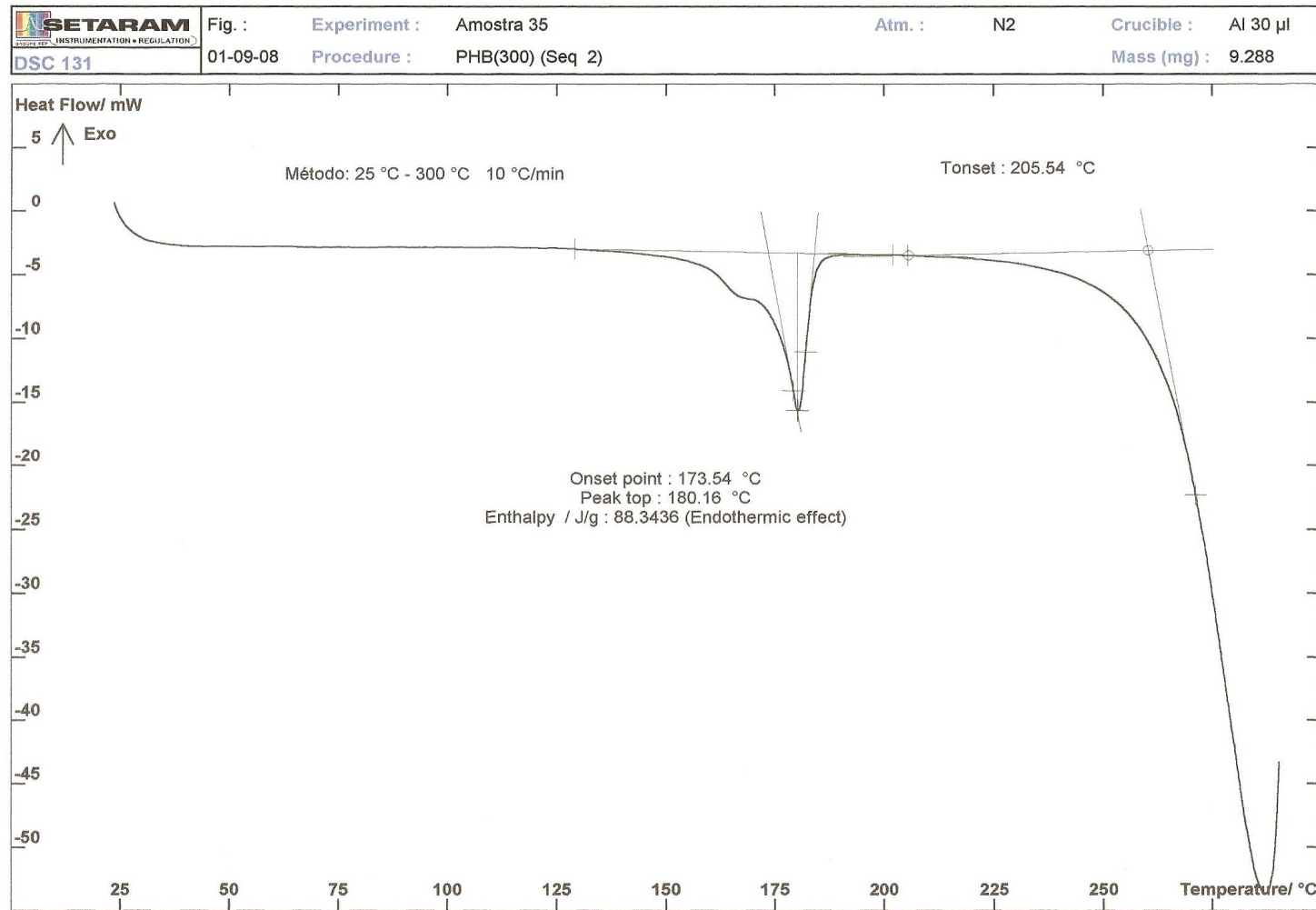


Figura B.14 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 130°C/30 min, com pré-tratamento T.

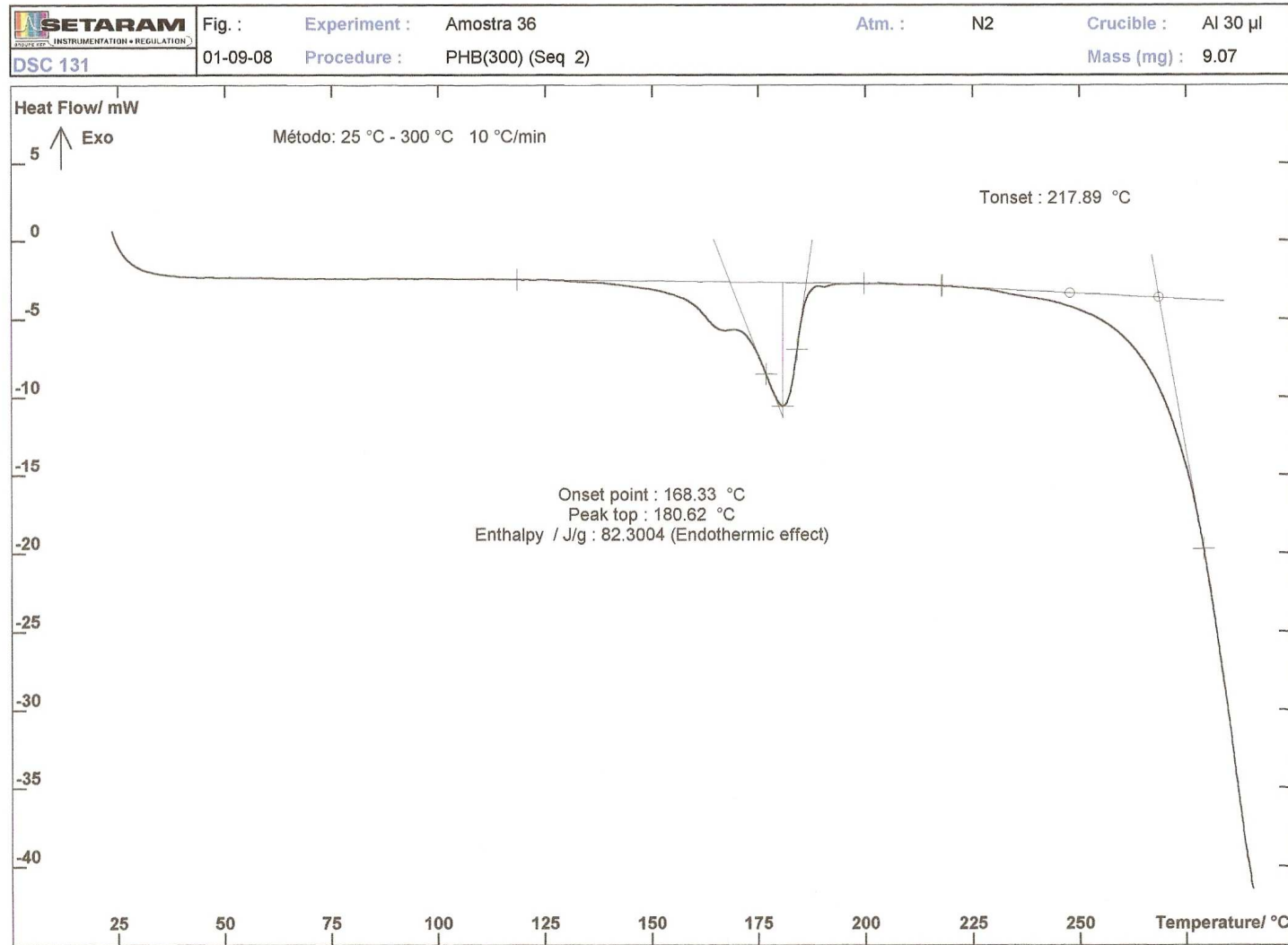


Figura B.15 - Termograma de DSC para o filme de polímero extraído a 130°C/30 min, com pré-tratamento pH+T.