

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Recuperação enzimática de P(3HB)
produzido por *Bacillus megaterium***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ethiane Poerschke Bissacot

Porto Alegre

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**RECUPERAÇÃO ENZIMÁTICA DE P(3HB)
PRODUZIDO POR *BACILLUS MEGATERIUM***

Ethiane Poerschke Bissacot

Dissertação de Mestrado apresentada
como requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Engenharia

Área de concentração: Pesquisa e
Desenvolvimento de Polímeros

Linha de Pesquisa: Polímeros
biodegradáveis.

Orientador(es):

Prof. Dr. Nilo Sérgio Medeiros Cardozo

Prof^a. Dr^a. Débora Jung Luvizetto Faccin

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação *Recuperação enzimática de P(3HB) produzido por Bacillus megaterium*, elaborado por Ethiane Poerschke Bissacot, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Prof. Dr. Marcio Schwaab

Prof^a. Dr^a. Adriana Seixas

“Imagine seu cérebro formando novas conexões quando enfrenta um desafio e aprende. Vá em frente.”

Carol S. Dweck

“Uma criança, um professor, uma caneta e um livro podem mudar o mundo. A educação é a única solução.”

Malala Yousafzai

Agradecimentos

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Departamento de Engenharia Química e ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química por proporcionar condições para a realização desta pesquisa. À CAPES pelo suporte financeiro.

Aos meu orientadores, Nilo e Débora, por todo apoio, incentivo, compreensão, parceria e incansável dedicação durante todas as etapas deste trabalho. Aos professores Marco Antônio Ayub e Marcio Schwaab pela suas colaborações e disponibilização de material e equipamentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos da Central Analítica do DEQUI que me ajudaram muito no decorrer destes dois anos em diversas situações e análises. À todos os laboratórios e seus colaboradores que me ajudaram de alguma forma no desenvolver deste projeto.

Aos meus queridos colegas mestrandos e doutorandos que além da linda amizade que formamos, muito me apoiaram e auxiliaram com trocas de conhecimento que sem dúvidas ajudaram a tornar este trabalho melhor.

Aos meus queridos amigos e familiares que sempre me apoiaram, incentivaram e nas horas mais difíceis me deram forças para continuar. A vocês, que souberam compreender a minha ausência e ouvir sobre minha paixão pela pesquisa mesmo sem entender nada sobre as técnicas que eu muito falei, muito obrigada.

À minha mãe, Magda, e meu amor, Felipe, que sem vocês essa jornada não teria sido possível, obrigada por todos os momentos de apoio, ajuda, força e amor.

Resumo

Polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres biodegradáveis com potencial para competir com plásticos derivados de fonte fóssil, possuindo características térmicas e mecânicas semelhantes a estes polímeros. O poli(3-hidroxiбутirato) (P(3HB)) é um dos PHAs mais estudados, sendo este sintetizado em corpos de inclusão e acumulado como reserva de carbono e energia por uma variedade de microrganismos. A separação do polímero de dentro da célula é uma etapa fundamental deste processo com grande impacto no custo do produto final, que tem como principal aplicação à área médica e biotecnológica. Existem diferentes métodos de recuperação do biopolímero, entre eles estão os métodos químicos, destacando-se a extração com uso de solventes halogenados, mecânicos, como exemplo o moinho de esferas, e os bioquímicos, em especial utilizando enzimas. Estes métodos podem ser utilizados de forma combinada. Este trabalho visou avaliar o potencial de algumas enzimas na recuperação de P(3HB) produzido pela bactéria *Bacillus megaterium*. Inicialmente, foram realizados cultivos da *B. megaterium* e a biomassa obtida foi liofilizada e homogeneizada. Após, foi realizada a etapa de recuperação enzimática do biopolímero, seguida da quantificação do P(3HB) por método analítico. Foram realizados ensaios de triagem para avaliar a eficiência destas enzimas na recuperação do biopolímero e, com isso, selecionaram-se cinco enzimas para estudos mais detalhados: Alcalase, Neutrase, Papaína, Bromelina e Pancreatina. Para cada uma das enzimas foi realizado um conjunto de experimentos seguindo planejamento do tipo Box Behnken para avaliar os efeitos dos parâmetros estudados na recuperação (pH, temperatura e concentração de enzima em relação à biomassa). A pancreatina proporcionou a maior recuperação e melhor custo-benefício (preço do kg enzima, concentração enzimática e percentual de pureza do P(3HB) recuperado), obtendo-se P(3HB) com 85 % de pureza.

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biodegradable polyesters with the potential to compete with plastics derived from fossil sources, having similar thermal and mechanical characteristics to these polymers. Poly(3-hydroxybutyrate) (P(3HB)) is one of the most studied PHAs, which is synthesized as inclusion bodies and accumulated as carbon and energy reserves by a variety of microorganisms. The separation of the polymer from the cell is a fundamental step of this process, possessing great impact on the final cost of the product, which has, as its main applications, the medical and biotechnology areas. There are different methods for recovering this biopolymer, among them the chemical methods, mainly by using halogenated solvents, mechanical methods such as ball mills, and biochemicals, using enzymes. These methods can be used in combination. This work aimed at evaluating the potential of some enzymes in the recovery process of P(3HB) from Gram-positive bacterium *Bacillus megaterium*. Initially, *B. megaterium* was cultivated and the biomass obtained was lyophilized and homogenized. After that, the enzymatic recovery step was performed, followed by P(3HB) quantification by analytical method. Screening tests were performed to evaluate the efficiency of enzymes in the biopolymer recovery and five enzymes were selected for more detailed studies: Alcalase, Neutrase, Papain, Bromelain, and Pancreatin. For each of the enzymes, a set of experiments was performed following *Box Behnken Design* to evaluate the effects of the studied parameters on the recovery (pH, temperature, and enzyme concentration per biomass). Pancreatin provided the highest recovery and the most cost-effective (price of kg, enzyme concentration and purity of recovered P(3HB)), obtaining P(3HB) with 85 % of purity.

Sumário

Capítulo 1.....	1
Introdução	1
Capítulo 2.....	5
Revisão Bibliográfica	5
2.1. Biopolímeros e biodegradação	5
2.2. Estrutura molecular e características físico-químicas do PHA.....	6
2.3. Aplicações dos polihidroxialcanoatos	9
2.4. Microrganismos e meios de cultivos usados para a produção de P(3HB)	10
2.5. Estrutura da parede celular bacteriana	14
2.6. Recuperação do biopolímero.....	19
2.6.1. <i>Técnicas de pré-tratamento da biomassa</i>	<i>20</i>
2.6.2. <i>Métodos químicos de recuperação</i>	<i>21</i>
2.6.3. <i>Métodos bioquímicos de recuperação</i>	<i>24</i>
2.6.4. <i>Métodos mecânicos de recuperação.....</i>	<i>26</i>
2.6.5. <i>Outros métodos encontrados na literatura</i>	<i>27</i>
2.7. Considerações finais	28
Capítulo 3.....	30
Materiais e Métodos	30
3.1. Microrganismo	30
3.2. Meio de cultura e condições de cultivo	30
3.2.1. <i>Biomassa utilizada no conjunto inicial de testes preliminares.....</i>	<i>30</i>
3.2.2. <i>Biomassa utilizada na complementação dos ensaios preliminares e nos testes realizados de acordo ao planejamento experimental.....</i>	<i>31</i>
3.3. Quantificação de biopolímero na biomassa	33
3.4. Enzimas e preparações.....	34
3.5. Experimentos de recuperação enzimática de P(3HB)	36
3.5.1. <i>Testes preliminares.....</i>	<i>36</i>

3.5.2. Protocolo de testes realizados para o planejamento experimental.....	38
3.5.3. Testes para avaliação das condições ótimas de recuperação.....	39
3.6. Teste de pré-tratamento da biomassa com sonicador	41
3.7. Protocolo de experimentos de extração com clorofórmio	42
Capítulo 4.....	45
Resultados e Discussão.....	45
4.1. Microrganismo e cultivos	45
4.2. Testes preliminares.....	47
4.3. Planejamento experimental de recuperação enzimática de P(3HB)	53
4.4. Testes de pré-tratamento celular com ultrassom	64
4.5. Custo-benefício das enzimas utilizadas nos experimentos definidos de acordo ao planejamento experimental	65
4.6. Testes de extração com clorofórmio	67
Capítulo 5.....	70
Conclusões	70
5.1. Considerações Finais	70
5.2. Trabalhos Futuros	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
Apêndice 1	78
Apêndice 2	80
Anexo 1.....	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Classificação dos polímeros de acordo com a origem da matéria-prima e com a biodegradabilidade.	6
Figura 2.2: Estrutura geral dos polihidroxialcanoatos. Adaptado de (Lee, 1996).....	7
Figura 2.3: Estruturas moleculares dos polímeros P(3HB), P(3HB-co-3HV) e P(3HB-co-3HHx). Adaptado: (Peña, 2014).....	7
Figura 2.4: Grânulos de P(3HB) intracelular em (A) <i>Escherichia coli</i> e (B) <i>Bacillus megaterium</i> - microscopia eletrônica (x 30.000). Fonte: (A) Lee, 1995 e (B) Gouda, 2001.....	11
Figura 2.5: Estrutura do grânulo de PHA encontrada no <i>Bacillus megaterium</i>	13
Figura 2.6: N-acetilglicosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM) unidos como na peptidoglicana. Fonte: Tortora <i>et al.</i> , (2012).....	15
Figura 2.7: Constituição da parede celular de bactérias Gram-positivas.....	16
Figura 2.8: Distribuição dos ácidos teicoicos na parede celular de bactérias Gram-positivas. Adaptado de: Brown et al., 2013.....	17
Figura 2.9: Constituição da parede celular de bactérias Gram-negativas.	17
Figura 2.10: Resumo esquemático de métodos de recuperação para os polihidroxialcanoatos.....	19
Figura 3.1: Resumo esquemático dos cultivos realizados em estufa incubadora rotatória.	32
Figura 3.2: Imagem de um experimento preliminar em chapa de aquecimento.	37
Figura 3.3: Imagem de um experimento em banho rotativo.....	38
Figura 3.4: Imagem do experimento de pré-tratamento da biomassa por sonicação. .	42
Figura 3.5: Etapas de extração de P(3HB) com clorofórmio a partir da biomassa.	43
Figura 3.6: Experimento de extração com clorofórmio realizado à 60 °C por 180 e 360 minutos.	44
Figura 4.1: Imagens de placas com inóculo de 5 h (A) e após cultivo de 20 h (B) com coloração de Gram.	45
Figura 4.2: Curva de calibração para determinação da quantidade de polímero.	46

Figura 4.3: Gráfico do percentual de pureza de P(3HB) recuperado após reação enzimática de 3, 6, 9 e 12 horas das enzimas líquidas: Alcalase (●), Neutrase (▲), Pectinex (◆), Viscozyme (o) e Saczyme Yield (■).....	50
Figura 4.4: Gráfico do percentual de pureza de P(3HB) recuperado após reação enzimática de 3, 6 e 9 horas das enzimas líquidas: Alcalase (●), Neutrase (▲), Pancreatina (◆), Papaína (o) e Bromelina (■).	52
Figura 4.5: Gráfico de probabilidade normal dos resíduos para a variável de resposta recuperação de P(3HB) para Pancreatina.	56
Figura 4.6: Gráfico dos resíduos versus valores preditos para a variável de resposta recuperação de P(3HB) para Pancreatina.	56
Figura 4.7: Superfície de resposta gerada para x_1 , x_2 e Y para a Pancreatina.	60
Figura 4.8: Superfície de resposta gerada para x_1 , x_3 e Y para a enzima Pancreatina. ..	60
Figura 4.9: Superfície de resposta gerada para x_2 , x_3 e Y para a enzima Pancreatina. ..	61
Figura 4.10: Filme de biopolímero após contato enzimático após processo de secagem, em (a) contato com Pancreatina e em (b) com Papaína.	62
Figura 4.11: Percentual de recuperação (■) e de pureza (o) do P(3HB) extraído a partir da biomassa de <i>B. megaterium</i> com clorofórmio (Chl) para os tempos de 180 e 360 min.....	67
Figura 4.12 – Filme de biopolímero após extração com clorofórmio durante o processo de secagem.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Tabela comparativa das propriedades de alguns polihidroxicanoatos e alguns polímeros de origem petroquímica. Adaptado de: (Lee, 1996; Sudesh, Abe e Doi, 2000).	8
Tabela 2.2: Exemplos de aplicações dos polihidroxicanoatos em áreas médicas. Adaptada de Zinn <i>et al.</i> , (2001).	10
Tabela 2.3: Classificação de bactérias produtoras de PHA.	15
Tabela 2.4: Comparação das principais diferenças observadas entre a composição da parede celular das bactérias. Adaptada de Tortora <i>et al.</i> (2012).	18
Tabela 3.1: Meio mineral utilizado nos cultivos.....	31
Tabela 3.2: Solução de micronutrientes.	31
Tabela 3.3: Informações encontradas no banco de dados online <i>Brenda-enzymes</i> referentes às enzimas testadas.....	34
Tabela 3.4: Enzimas e suas respectivas faixas de pH e temperatura, avaliadas nos testes preliminares de eficiência na digestão enzimática em diferentes condições.....	37
Tabela 3.5: Fatores do planejamento Box Behnken para cada enzima com os 3 níveis avaliados para cada fator.	39
Tabela 3.6: Conjunto de experimentos definidos usando um planejamento <i>Box Behnken</i> , onde x_1 , x_2 e x_3 são os valores de pH, temperatura e a concentração enzimática, respectivamente.	40
Tabela 4.1: Experimentos preliminares com as enzimas em preparações líquidas avaliando a eficiência da digestão enzimática no percentual de pureza do biopolímero para diferentes condições de pH e temperatura.....	48
Tabela 4.2: Experimentos preliminares com as enzimas Pectinex, Viscozyme e Saczyme avaliando a eficiência da digestão enzimática no percentual de pureza do biopolímero com concentração enzimática de 20 %.	48

Tabela 4.3: Experimentos preliminares com as enzimas avaliando a eficiência da digestão enzimática no percentual de pureza do biopolímero para diferentes condições de pH e temperatura.....	49
Tabela 4.4: Enzimas e suas respectivas condições de pH e temperatura, avaliadas nos testes de tempo de contato enzimático.	50
Tabela 4.5: Enzimas e suas respectivas condições de pH e temperatura, avaliadas nos testes de até 9 horas de contato enzimático.	51
Tabela 4.6: Valores de Y e S _N obtidos para cada enzima nos experimentos definidos na Tabela 3.6. Os subíndices “pc”, “alc”, “neu”, “pap” e “bro” indicam resultados referentes, respectivamente a pancreatina, alcalase, neutrase, papaína e bromelina.	54
Tabela 4.7: Coeficientes dos modelos matemáticos estimados pelo software Statistica 10, para as 5 enzimas utilizadas no planejamento fatorial BBD.	55
Tabela 4.8: Coeficientes da regressão linear, desvio padrão destes, valores de t e probabilidade estatística p dos coeficientes do modelo e seus intervalos de confiança referente à Y – percentual de pureza de P(3HB) recuperado via Pancreatina.	57
Tabela 4.9: Condições ótimas de acordo com o modelo estatístico para cada enzima gerado a partir dos experimentos <i>Box Behnken Design</i>	61
Tabela 4.10: Experimentos de digestão enzimática para a enzima Pancreatina em diferentes concentrações, nas mesmas condições de pH (7,3) e de temperatura (37 °C).	63
Tabela 4.11: Percentual de pureza e percentual de massa celular solubilizada (S _N) do biopolímero a partir dos testes com ultrassom.	65
Tabela 4.12: Fatores considerados no cálculo do custo-benefício para cada enzima e o custo para a produção de P(3HB).....	66

LISTA DE ABREVIATÖES

[(P(3HB))	Concentraçãõ de biopolímero
2-Hp	2-Heptanona
BBD	Box Behnken Design
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
Chl	Clorofórmio
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EtOH	Etanol
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
LPS	Lipopolissacarídeos
LTA	<i>Lipoteichoic acids</i>
m _f	Massa total (biomassa e polímero)
m _{P(3HB)f}	Massa de biopolímero final
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
NaCl	Cloreto de sódio
NaClO	Hipoclorito de sódio
NAG	N-acetilglicosamina
NAM	N-acetilmurânico
NaOH	Hidróxido de sódio
NNDA	N,N-dimetilacetamida
P(3HB)	Poli(3-hidroxi butirato)
P(3HB-co-3HHx)	Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato)
P(3HB-co-3HV)	Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato)
PA	Poliamidas
PBAT	Poli (butileno adipato co-tereftalato)

PBS	Polibutileno succinato
PCL	Policaprolactona
PE	Polietileno
PE	Polietileno
PET	Politereftalato de etileno
PHA	Polihidroxialcanoato
PLA	Ácido Polilático
PP	Polipropileno
PTT	Politereftalato de trimetileno
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
S_N	Massa de material celular solubilizado
T_g	Temperatura de transição vítrea
T_m	Temperatura de fusão ou amolecimento
WTA	<i>Wall teichoic acids</i>
X	Concentração celular total
X_r	Concentração celular residual
X_{r0}	Concentração celular residual inicial
X_{rct}	Concentração celular residual final
Y	Percentual de pureza de P(3HB)

Capítulo 1

Introdução

A produção de plásticos vem crescendo com o tempo. Além do aumento do consumo em função do crescimento da população, os plásticos vêm ganhando novas aplicações e substituindo outros materiais (como vidro e metais). Em 2017 foram produzidos quase 350 milhões de toneladas destes materiais poliméricos. Desta quantidade, apenas 9 % do lixo plástico é reciclado, o que resulta em acúmulo de plásticos pós-consumo no meio ambiente e causa grande impacto ambiental, principalmente pela difícil degradação destes materiais. Uma quantidade significativa desse lixo plástico encontra-se nos oceanos. Atualmente 80 % do lixo marinho é composto de materiais plásticos (Jambeck *et al.*, 2015; Lebreton *et al.*, 2017; Nkwachukwu *et al.*, 2013).

Quando em processo de degradação, os materiais poliméricos podem começar a se desintegrar, formando materiais particulados que podem ser separados em duas categorias: macroplásticos (≥ 5 mm) e microplásticos (< 5 mm) (Löhr *et al.*, 2017). Os microplásticos, por sua vez, podem ser categorizados em primários e secundários (Dauvergne, 2018). Microplásticos primários são aqueles que foram produzidos neste formato para aplicações específicas (como pellets ou microesferas), enquanto os secundários são gerados por processos de fragmentação/degradação de objetos plásticos de maiores dimensões (Löhr *et al.*, 2017). Apesar de que já há registros de microplásticos

secundários encontrados em alimentos e bebidas, ainda não se conhece a sua gravidade de impacto na saúde humana (Ribeiro *et al.*, 2018).

Pensando na redução do lixo plástico no meio ambiente, além de políticas mais fortes na reciclagem destes materiais, o uso de biopolímeros biodegradáveis é uma alternativa para substituir os materiais derivados de fonte fóssil. Os polihidroxialcanoatos (PHAs) estão entre os biopolímeros que despertam interesse industrial devido à sua biodegradabilidade, sendo que o poli-3-hidroxi-butirato - P(3HB) é o PHA mais estudado. O P(3HB) apresenta algumas propriedades térmicas e mecânicas que se assemelham às de polímeros de fonte fóssil, como o polipropileno e o polietileno (Sudesh, Abe e Doi, 2000), possuindo grande gama de aplicações, desde descartáveis e embalagens até na área médica, farmacêutica e biotecnológica, devido a sua biocompatibilidade com o organismo humano (Albuquerque e Malafaia, 2018). Para se aumentar o uso destes biopolímeros ainda é necessário reduzir custos na sua produção. Embora o custo final destes biopolímeros possa nunca se comparar com os derivados de fonte fóssil, o seu uso em maior escala e na substituição de polímeros que não se degradam com facilidade na natureza poderia representar uma diminuição significativa do impacto ambiental relacionado ao acúmulo de resíduos plásticos no meio ambiente.

Como o P(3HB) é sintetizado em corpos de inclusão por diversos microrganismos, seu processo de produção é de elevado custo, principalmente devido às etapas de recuperação e purificação do polímero (Jacquel *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 1999). Os métodos para recuperação de P(3HB) podem ser químicos (solventes e digestores químicos), mecânicos (exemplo: moinho de esferas) e bioquímicos (via enzimática), podendo ser aplicados de forma combinada ou em única etapa. Solventes halogenados (em especial o clorofórmio) são os principais solventes empregados. Digestores celulares, como hipoclorito de sódio, hidróxido de sódio e alguns surfactantes, também são utilizados (Berger *et al.*, 1989). Apesar de serem capazes de extrair o P(3HB) intracelular com altas eficiências e purezas, os solventes clorados são nocivos à saúde e apresentam alto potencial poluidor. Assim, esforços visando possibilitar a expansão da utilização comercial do P(3HB) devem incluir o desenvolvimento de alternativas tecnológicas mais adequadas para a etapa de recuperação e purificação do biopolímero, com menor impacto sobre a saúde e o meio ambiente.

Neste sentido, o processo de recuperação enzimática representa uma opção interessante. As enzimas são biocatalisadores biodegradáveis, que não são nocivas ao

meio ambiente, além de serem utilizadas com condições operacionais mais brandas (baixas temperaturas e pH de trabalho próximo do neutro) e causar pouco ou nenhum dano ao produto, comparando com o processo de extração por solvente (Kapritchkoff *et al.*, 2006). Além disso, as enzimas utilizadas são provenientes de frutas – bromelina e papaína – ou produzidas naturalmente por microrganismos ou seres vivos – pancreatina e alcalase. Muitas vezes são empregadas com auxílio de métodos químicos ou com pré-tratamentos (mecânicos ou térmicos) que resultam em maior eficiência do processo (Jacquel *et al.*, 2008).

Outro aspecto importante na etapa de recuperação do biopolímero são as características do microrganismo utilizado para sua produção. Dentre os microrganismos produtores de P(3HB), os mais estudados são as bactérias, tanto Gram-negativas quanto Gram-positivas. A parede celular das Gram-negativas tem apenas alguns nanômetros de espessura de peptidoglicano, enquanto, nas Gram-positivas é composta por várias camadas de peptidoglicano – polímero natural formado por dois monômeros ligados de maneira alternada, N-acetilglicosamina (NAG) e N-acetilmurâmico (NAM) – com uma espessura entre 20 e 80 nanômetros (Reith e Mayer, 2011). Por outro lado, enquanto as Gram-positivas não possuem a camada de lipopolissacarídeos (LPS), as bactérias Gram-negativas, por conter membrana externa, contêm LPS, entre os quais pode estar presente o lipídio A, endotoxina que necessita ser extraída na recuperação via solventes porque pode causar resposta imunológica no organismo humano (Wang *et al.*, 2011). Além das Gram-positivas possuírem uma camada mais espessa de peptidoglicano, elas também possuem ácidos teicóicos na sua estrutura. Essa molécula é formada pela união de um ácido e fosfato, atribuindo uma carga global negativa à parede celular. Os ácidos teicóicos podem estar ligados aos peptidoglicano da parede celular (*wall teichoic acids*, WTA) ou aos lipídeos da membrana celular (*lipoteichoic acids*, LTA). Ambas as estruturas estão presentes simultaneamente em várias espécies de bactérias Gram-positivas (Steen, 2005).

A bactéria *Bacillus megaterium* é Gram-positiva e, portanto, possui uma camada mais espessa de peptidoglicano que a torna um organismo mais resistente e, por isso, mais fácil de trabalhar quando comparada a outras bactérias produtoras de P(3HB) Gram negativas. Além disso, é bastante versátil em relação ao substrato para seu cultivo, o que possibilita produção a partir de substratos de baixo custo (Borges, 2017).

Pouco ainda é conhecido a respeito da técnica de recuperação via enzimática do P(3HB), e menos ainda a partir de bactérias Gram-positivas, o que justifica o

desenvolvimento de estudos acerca da otimização dessa etapa para futura aplicação industrial.

Assim sendo, o objetivo principal desse trabalho foi avaliar o desempenho de um conjunto de enzimas na recuperação do poli(3-hidroxiбутirato) a partir da biomassa de bactéria Gram-positiva *Bacillus megaterium* e otimizar as condições do processo para as proteases a partir de um planejamento experimental Box Behnken.

A fim de atingir o objetivo principal, definiram-se os objetivos específicos descritos a seguir:

1. Selecionar enzimas com capacidade de digerir a parede celular para purificação de P(3HB) a partir de *B. megaterium*.

2. Otimizar as condições pH, temperatura e concentração enzimática das enzimas mais promissoras para a recuperação do biopolímero com a biomassa de *B. megaterium*, realizando planejamento experimental do tipo Box Behnken.

3. Analisar os modelos e as superfícies de resposta obtidos para cada enzima a fim de encontrar as condições ótimas de processo para cada uma.

4. Verificar o melhor custo-benefício entre as enzimas analisadas.

5. Avaliar o uso de ultrassom como pré-tratamento celular na recuperação enzimática.

6. Comparar recuperação enzimática com método convencional de purificação – método de extração por solvente.

A estrutura dessa dissertação conta com mais 5 capítulos além deste capítulo introdutório. O Capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica sobre a composição do polímero e microrganismo de trabalho nesta pesquisa, além de breves explicações a respeito das técnicas de recuperação de polímero mais estudadas. O Capítulo 3 descreve as etapas dos experimentos executados durante a presente pesquisa. O Capítulo 4 apresenta os resultados obtidos e feitas as devidas discussões. O Capítulo 5 traz as considerações finais e sugestões para próximos trabalhos na mesma linha de estudo. Finalmente, o Capítulo 6 lista as referências consultadas ao longo de todo o trabalho.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

Neste capítulo serão abordados primeiramente conceitos e informações gerais que são consideradas fundamentais para a compreensão do presente trabalho, incluindo temas como biopolímeros, características da família de polihidroxialcanoatos (PHAs), aplicações, microrganismos produtores destes polímeros e suas características e diferenças estruturais. Posteriormente, é feita uma revisão detalhada da literatura referente a estratégias de recuperação destes biopolímeros intracelulares.

2.1. Biopolímeros e biodegradação

Segundo a instituição *European Bioplastics*, um bioplástico é um polímero biodegradável, ou um polímero produzido a partir de uma matéria-prima renovável, ou material plástico com as duas características. Os materiais biodegradáveis são aqueles que são degradados pela ação de microrganismos como bactérias, fungos e algas, podendo ser obtidos a partir de fontes fósseis ou de fontes renováveis. Na Figura 2.1 estão apresentados exemplos de polímeros classificados de acordo com a origem da matéria-prima e com a biodegradabilidade (Adaptado de *European Bioplastics*, disponível em: < http://docs.european-bioplastics.org/publications/fs/EuBP_FS_What_are_bioplastics.pdf >).

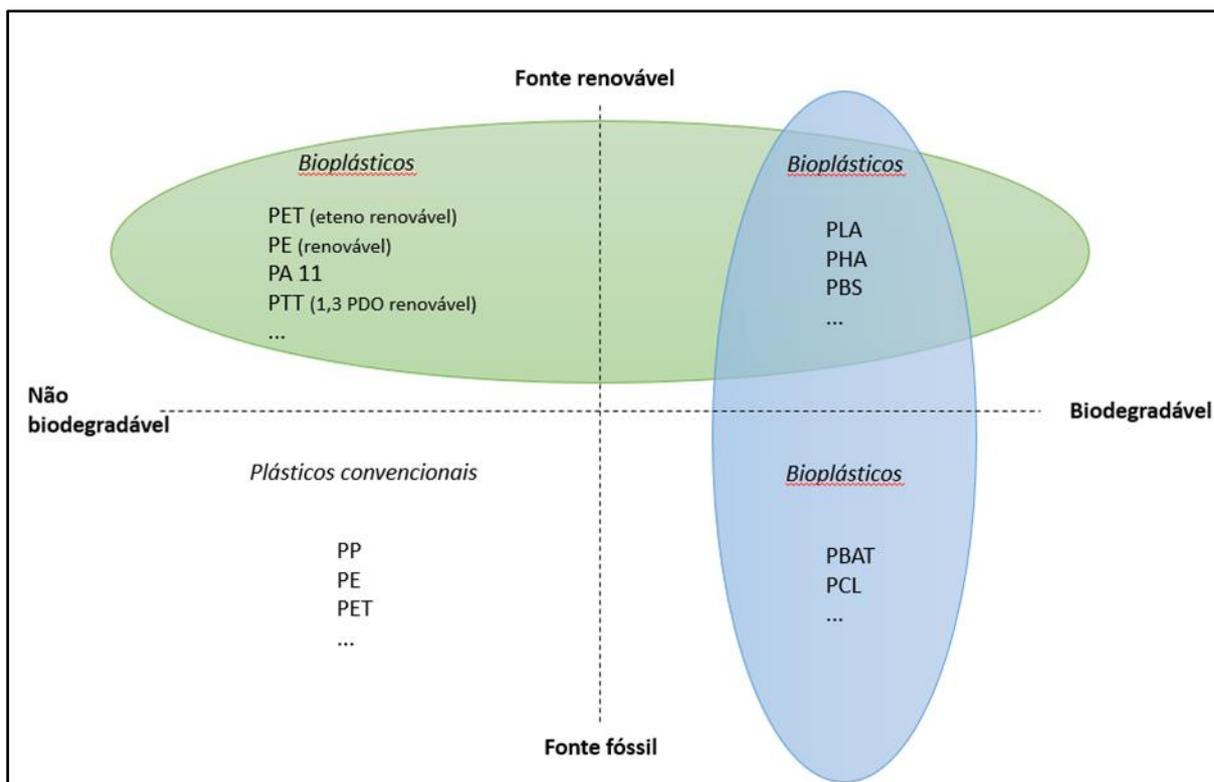


Figura 2.1: Classificação dos polímeros de acordo com a origem da matéria-prima e com a biodegradabilidade.

Entre os materiais citados na Figura 2.1, os PHAs são uma classe de polímeros que se destacam por possuírem as duas características, ou seja, são produzidos a partir de fontes renováveis e são biodegradáveis, constituindo uma alternativa para o problema ambiental causado pelo acúmulo de plásticos no meio ambiente.

2.2. Estrutura molecular e características físico-químicas do PHA

Os PHAs são uma classe de ésteres poliméricos sintetizados e acumulados em grânulos intracelulares por diversos microrganismos em cultivos, geralmente, com restrição de algum nutriente (fósforo ou nitrogênio), ou restrição de oxigênio, em meio rico em carbono e com os sais minerais necessários para a manutenção celular. A principal dificuldade da disseminação do uso dos PHAs é o custo do produto final, bastante superior ao valor de comercialização de polímeros de origem petroquímica. As causas para isto incluem baixos índices de rendimento e produtividade dos microrganismos utilizados, custo da fonte de carbono e nitrogênio, além das características, que serão abordadas nesse capítulo, acerca dos métodos de recuperação e purificação disponíveis (Sudesh, Abe e Doi, 2000).

A estrutura química da unidade monomérica dos PHA está apresentada na Figura 2.2. O tipo de radical R e o valor de n dão origem às diferentes unidades monoméricas que constituem os polímeros e os copolímeros. O radical R pode variar desde um único átomo de hidrogênio até tridecil (C_{13}), podendo conter insaturações, grupos aromáticos ou ainda ligações com halogenados (como flúor e cloro). O grau de polimerização pode variar de 100 a 30.000 vezes. O poli(3-hidroxiбутирато) possui a estrutura representada neste esquema, tendo como substituinte (R) um grupo metil (CH_3) e o valor de n igual a um.

$\left[-O - \underset{\substack{ \\ R}}{CH} - (CH_2)_n - \underset{\substack{ \\ O}}{C} - \right]_{100-30000}$		
n=1	R= hidrogênio R= metil R= etil R= propil R= pentil R= nonil	Poli (3-hidroxiacetato) Poli (3-hidroxiбутирато) Poli (3-hidroxiуалерато) Poli (3-hidroxiгексаноато) Poli (3-hidroxiоктаноато) Poli (3-hidroxiдодеканоато)
n=2	R= hidrogênio R= metil	Poli (4-hidroxiбутирато) Poli (4-hidroxiуалерато)
n=3	R= hidrogênio R= metil	Poli (5-hidroxiуалерато) Poli (5-hidroxiгексаноато)
n=4	R= hexil	Poli (6-hidroxiдодеканоато)

Figura 2.2: Estrutura geral dos polihidroxiálcanoatos. Adaptado de (Lee, 1996).

Entre os diversos PHAs, apenas alguns deles foram incorporados à produção em larga escala: poli(3-hidroxiбутирато) [P(3HB)], poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiуалерато) [P(3HB-co-3HV)] e poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiгексаноато) [P(3HB-co-3HHx)] (Peña *et al.*, 2014). As estruturas destes polímeros estão representadas na Figura 2.3.

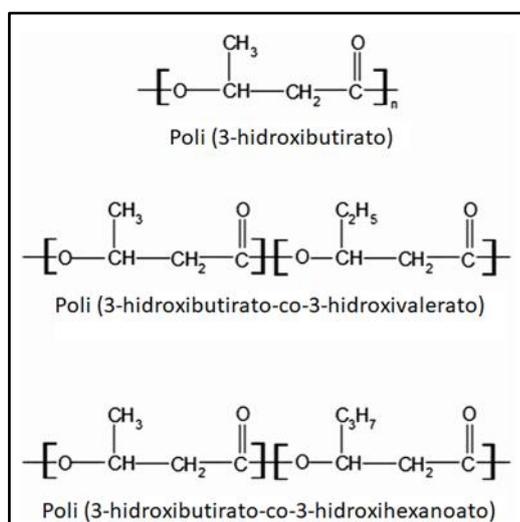


Figura 2.3: Estruturas moleculares dos polímeros P(3HB), P(3HB-co-3HV) e P(3HB-co-3HHx). Adaptado: (Peña, 2014).

Os polihidroxicanoatos mais estudados são o P(3HB) e o P(3HB-co-3HV) (Sudesh, Abe e Doi, 2000), sendo o P(3HB) o polímero mais utilizado dessa família. O P(3HB) destaca-se por apresentar propriedades similares às de alguns polímeros de fonte fóssil que são muito utilizados no cenário industrial (Kulpreecha *et al.*, 2009). Para fins comparativos, algumas propriedades de PHAs e de polímeros de origem petroquímica são apresentadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Tabela comparativa das propriedades de alguns polihidroxicanoatos e alguns polímeros de origem petroquímica. Adaptado de: (Lee, 1996; Sudesh, Abe e Doi, 2000).

Polímero	T _m ¹ (° C)	T _g ² (° C)	Módulo de Young (GPa)	Resistência à tração (MPa)	Alongamento na ruptura (%)	Resistência ao impacto (J·m ⁻¹)
P(3HB)	179-180	4	3,5	40	5	50
P(3HB-co-3HV)						
3 mol % 3HV	170		2,5	38		60
9 mol % 3HV	162		1,9	37		95
14 mol% 3HV	150		1,5	35		120
20 mol% 3HV	145		1,2	32	50	200
25 mol% 3HV	137		0,7	30		400
71 mol% 3HV	83	-13	-			
Polipropileno	170	-10	1,7	34,5	400	45
Poliétileno-tereftalato	262		2,2	56	7300	3400
Poliestireno	110		3,1	50	-	21

¹Temperatura de fusão ou temperatura de amolecimento.

²Temperatura de transição vítrea.

Em relação às características físico-químicas do P(3HB), sua baixa estabilidade térmica é um grande desafio para sua aplicação industrial, pois reduz a sua processabilidade através de operações unitárias convencionais da indústria de polímeros, como extrusão e injeção. Isso ocorre porque a temperatura de fusão do P(3HB), que varia entre 170 e 180 °C, é muito próxima da sua temperatura de degradação, 180 – 190 °C (Hong, Hsu e Ye, 2012; Peña *et al.*, 2014). As temperaturas de fusão e transição vítrea aumentam com o aumento da massa molar para compostos de baixa massa molar e variam pouco para compostos de alta massa molar. A composição monomérica dos copoliésteres é um outro fator que influencia significativamente as temperaturas. Por isso, o estudo do copolímero P(3HB-co-3HV) é bastante relevante, visto

que seu ponto de fusão (T_m) é reduzido na medida que o percentual de hidroxivalerato aumenta na cadeia polimérica. Esse aspecto contribui para a processabilidade do material (Borges, 2017; Holmes, 1985).

O módulo de Young e a resistência à tração do P(3HB) estão na mesma ordem de grandeza que os valores obtidos para polipropileno, porém a capacidade de alongação até a ruptura do P(3HB) é muito inferior à do polipropileno, o que o torna muito frágil. As causas dessa fragilidade podem ser oriundas da cisão das cadeias poliméricas e da propagação das rachaduras ao redor dos esferulitos, dada a elevada cristalinidade dos PHAs (Sudesh, Abe e Doi, 2000).

2.3. Aplicações dos polihidroxicanoatos

As aplicações dos PHAs se estendem desde embalagens descartáveis até uso médico, farmacêutico e biotecnológico. Devido ao alto custo de produção destes polímeros o uso em descartáveis não é competitivo com plásticos derivados de petróleo.

Devidos às características do poli(3-hidroxitirato) e seus copolímeros, eles foram inicialmente utilizados na produção de garrafas, filmes e fibras para embalagens biodegradáveis e sacos de proteção para plantas. As aplicações similares aos produtos plásticos convencionais incluem itens descartáveis tais como recipientes de cosméticos, copos, produtos de higiene feminina, fraldas, e outros utensílios domésticos (Khanna e Srivastava, 2005).

Nas áreas médica e farmacêutica é onde se encontram as suas principais aplicações devido às características de biodegradabilidade e à biocompatibilidade destes polímeros (Bissacot, 2018; Jacquél *et al.*, 2008). Na área farmacêutica são utilizados como matriz de materiais para a liberação lenta de fármacos e hormônios. Outros exemplos de aplicação destes biopolímeros incluem o uso em materiais como suturas, próteses ósseas, válvulas cardíacas (como *stents*) e engenharia de tecidos (Peña *et al.*, 2014).

Alguns exemplos de aplicações são apresentados na Tabela 2.2.

O baixo volume de biopolímeros utilizado para produção desses artigos e seu alto valor agregado viabilizam sua produção. No organismo, esse biopolímero apresenta baixos níveis de rejeição, pois, quando metabolizado, o principal produto é o ácido 3-hidroxitirico, composto químico já presente no sangue humano (Zinn *et al.*, 2001).

Tabela 2.2: Exemplos de aplicações dos polihidroxicanoatos em áreas médicas. Adaptada de Zinn *et al.*, (2001).

Tipo de aplicação	Produtos
Tratamento de feridas	Suturas, malhas cirúrgicas, eletrodos neurais (<i>nerve cuffs</i>), pele sintética (<i>skin substitutes</i>), grampos (<i>staples</i>);
Sistema vascular	Válvulas cardíacas, tecidos cardiovasculares, remendo de pericárdio, enxertos vasculares;
Área Ortopédica	Estruturas para cartilagem, gaiolas espinhais (<i>spinal cages</i>), enxerto ósseo, regeneração de menisco, dispositivos de fixação interna (parafusos);
Área farmacêutica	Micro e nanoesferas utilizadas em terapias anticâncer;
Área Urológica	<i>Stents</i> urológicos;
Área odontológica	Materiais de barreira para regeneração tecidual guiada de periodontite;
Tomografia computadorizada e ultrassonografia	Agentes de contraste;

2.4. Microrganismos e meios de cultivos usados para a produção de P(3HB)

A capacidade de sintetizar e acumular P(3HB) e outros PHAs como reserva de carbono e energia é generalizada entre os procariontes. Foram relatadas mais de 300 espécies, principalmente de bactérias que produzem esses polímeros. No entanto, nem todos esses microrganismos armazenam uma quantidade suficiente de P(3HB) para aplicação em larga escala (Chanprateep, 2010). Além disso, outro aspecto importante é o tipo de substrato requerido pela bactéria para a produção do biopolímero. Enquanto alguns microrganismos requerem substratos de grande pureza, outros permitem cultivo com substratos de menor custo, o que é de grande relevância para reduzir o custo de produção. Dentre esses substratos de menor custo, destacam-se aqueles que são subprodutos de processos industriais, tais como, soro de leite (Borges, 2017), melão de cana de açúcar (Kulpreecha *et al.*, 2009) e glicerol – proveniente da síntese de biodiesel (Naranjo *et al.*, 2013).

A produção de PHAs vem sendo estudada por muitos pesquisadores, e na maior parte dos casos se utiliza culturas contendo uma única espécie de bactéria. A possibilidade de culturas microbianas mistas parece promissora pois esta não requer manutenção de condições estéreis e facilita o uso de matérias-primas de baixo custo, como resíduos agroindustriais. Este processo

de produção teria como vantagem a redução da carga poluidora de resíduos (Villano *et al.*, 2014).

Dentre as bactérias capazes de acumular grandes quantidades de PHA estão *Cupriavidus necator* (*Ralstonia eutropha*, reclassificada), *Azohydromonas lata* (*Alcaligenes latus*, reclassificada), *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida*, *Aeromonas hydrophila*, *Paracoccus denitrificans*, *Methylobacter. extorquens*, *Bacillus spp.*, *Azotobacter vinelandii* e *Escherichia. coli* recombinante, expressando os genes biossintéticos de P(3HB) de *C. necator*, *A. lata* ou *A. vinelandii* (Lee, 1996; Peña *et al.*, 2014).

A síntese do poliéster acontece quando há limitação de um nutriente, como nitrogênio, fósforo, oxigênio, mas há disponibilidade de carbono no meio de cultivo. Nessas condições o P(3HB) é produzido e armazenado no meio intracelular na forma de grânulos, que podem ser observados por microscopia eletrônica de varredura, como mostra a Figura 2.4. Em caso do nutriente faltante ser restabelecido, enzimas despolimerases degradam e metabolizam o polímero como fonte de energia (Merrick e Doudoroff, 1964).

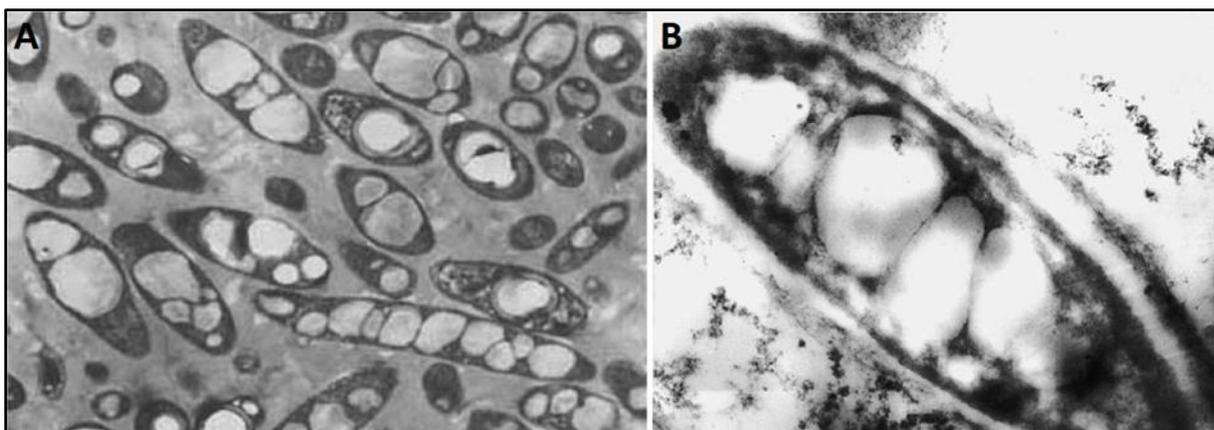


Figura 2.4: Grânulos de P(3HB) intracelular em (A) *Escherichia coli* e (B) *Bacillus megaterium* - microscopia eletrônica (x 30.000). Fonte: (A) Lee, 1995 e (B) Gouda, 2001.

Uma das espécies mais citadas na literatura para a produção de P(3HB) é a *C. necator*, isto porque esta bactéria é capaz de acumular até 80 % da massa de células secas deste biopolímero (Povolo *et al.*, 2010). Este microrganismo pode ser utilizado na sua forma selvagem ou com algumas modificações genéticas, que possibilitam o uso de um meio de cultivo a partir de substratos de menor custo. O principal substrato utilizado é a glicose, mas as linhagens recombinantes podem utilizar como fonte de carbono o glicerol, subproduto da produção de biodiesel. Por exemplo, Cavalheiro (2009) produziu P(3HB) utilizando *C. necator* recombinante e glicerol como fonte de carbono obtendo 62 % de acúmulo, enquanto Povolo e

colaboradores (2010) utilizaram subprodutos ricos em lactose como meio de cultivo para a linhagem geneticamente modificada e alcançaram bons resultados de produção de polímero.

O acúmulo de P(3HB) em *E. coli* recombinante pode variar entre 30 até 95 % em peso seco de células (Kusaka *et al.*, 1997). Lee e Chang (1993) avaliaram a densidade celular possível para *E. coli* pSYL104 em sacarose, que seria uma fonte de carbono de valor inferior a glicose, concluindo que esta linhagem apresenta alta produtividade de P(3HB). Park *et al* (2002) estudaram a produção do biopolímero a partir de soro de leite em cultura descontínua de *E. coli* CGSC 4401 – modificada com um plasmídeo contendo os genes da biossíntese de polihidroxialcanoatos de *Alcaligenes latus*, concluindo que o acúmulo de polímero está vinculada à concentração de lactose utilizada no cultivo do biorreator, obtendo entre 60 e 70 % ($p \cdot p^{-1}$) nos testes realizados.

A *R. eutropha* pode utilizar vários compostos orgânicos como fonte de carbono, entre eles: frutose, glicose, lactato e succinato. Algumas espécies de *R. eutropha* recombinantes conseguem utilizar sacarose. Este microrganismo pode acumular em torno de 80 % de sua massa seca celular em polímero (Dalcanton, 2006; Lee, 1996).

Outra bactéria muito estudada é *Azohydromonas lata* (*Alcaligenes latus*), principalmente por utilizar sacarose como meio de cultivo, obtendo 87 % de P(3HB) em relação à massa de células bacterianas secas (Wang, F. and Lee, 1997). Além disso, é um microrganismo que começa a acumular o biopolímero ainda na fase de crescimento exponencial, com uma alta taxa de crescimento (Lee, 1996).

O gênero de bactérias *Methylobacterium* se destaca pela sua capacidade de crescer e acumular P(3HB) utilizando metanol como fonte de carbono, substrato de baixo custo como mencionado por Mokhtari (2009). Embora utilize um substrato mais barato, no estudo, o microrganismo atingiu apenas 35 % de polímero.

Duas bactérias do gênero *Bacillus* se destacam na literatura como produtoras de PHAs, o *Bacillus cereus* e o *Bacillus megaterium*, sendo que esta última é a bactéria na qual o P(3HB) foi encontrado pela primeira vez em 1962 (Poirier, Nawrath e Somerville, 1995). Tratam-se de bactérias Gram-positivas, característica cujas implicações no processo de extração do polímero serão abordadas na Seção 2.4.

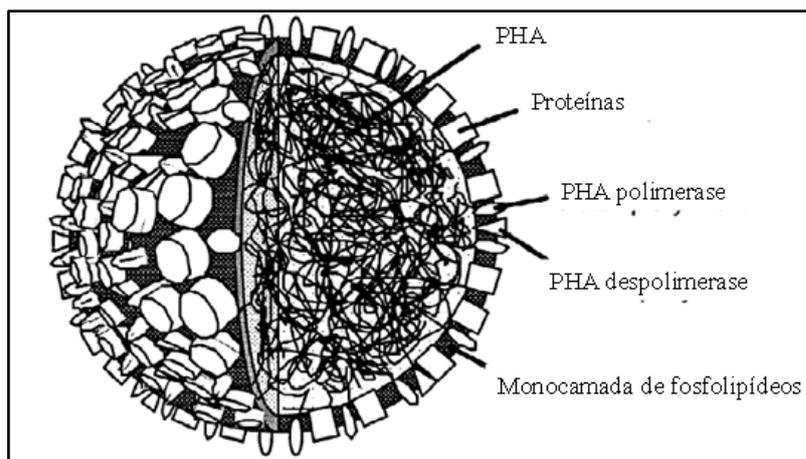


Figura 2.5: Estrutura do grânulo de PHA encontrada no *Bacillus megaterium*.

Adaptado de: Zinn *et al.*, (2001).

Uma das características positivas da bactéria *B. megaterium* é o fato de que, sem necessitar de modificações genéticas, é capaz de se desenvolver e acumular P(3HB) utilizando diferentes fontes de carbono como frutose, glicose, xilose, lactose, sacarose, maltose, entre outras (Faccin, 2012; Gouda *et al.*, 2001). Também é possível utilizar como fonte de carbono resíduos agroindustriais (Sathiyarayanan *et al.*, 2013) e soro de leite (Borges, 2017; Hassemer, 2016), considerados substratos de baixo valor agregado. O armazenamento do poliéster ocorre em grânulos, como o modelo representado na Figura 2.5. O *B. megaterium* recobre sua reserva de P(3HB) por uma monocamada de lipídeos (0,5 % em base mássica) e proteínas (2 %) (Zinn *et al.*, 2001).

Naranjo *et al.*, (2013) avaliaram os rendimentos de acúmulo de P(3HB) para *B. megaterium* a partir de glicerol e glicose como substratos. Rendimentos semelhantes (próximos de 60 % de massa de biopolímero) foram obtidos e os custos totais foram estimados para escala industrial, sendo que o glicerol apresentou redução de custos de até 20 % comparado a glicose. As condições de cultivo utilizadas foram pH de 7,0, saturação de oxigênio de 80 % e temperatura de 33 °C.

Kulprecha *et al.*, (2009) obtiveram resultados promissores para produção de P(3HB) através de *B. megaterium* BA-019 utilizando-se fonte de carbono e nitrogênios de baixo custo. Foram comparados dois substratos ricos em carbono, sacarose pura e melaço, que é um produto intermediário do processo de fabricação de açúcar, rico em sacarose e minerais tais como manganês, magnésio, fósforo, potássio, zinco, sódio e cálcio. A fonte de nitrogênio também foi avaliada, comparou-se sulfato de amônia e ureia em quantidades equivalentes de oferta de nitrogênio. Uma densidade celular mais alta e um maior nível de produção de P(3HB) foram obtidos usando melaço de cana e ureia como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente,

chegando próximo de 55 % de massa seca de biopolímero. As condições de cultivo utilizadas foram pH de 7,0, temperatura de 33 °C e saturação de oxigênio de 60 %, sendo esta saturação baixa quando comparada com outros trabalhos, podendo com saturações maiores, aumentar a produtividade deste sistema.

Kulpreecha *et al.*, (2009) ressaltam que fontes de carbono não purificadas, ou seja, que não sejam formados por um determinado carboidrato isolado, são melhores substratos para crescimento bacteriano. Além do melão, com extrato de malte e xarope de milho os autores também obtiveram melhoria na produção de P(3HB) em comparação com açúcares purificados (glicose, frutose e sacarose). Esse efeito ocorre, provavelmente, porque estes meios contêm, além de carboidratos, outros nutrientes necessários para crescimento celular, tais como ácidos orgânicos, minerais e vitaminas. Tais resultados são especialmente animadores quando se avalia seu impacto no custo de produção do P(3HB), devido ao menor custo dos substratos não purificados que passaram pelo processo de obtenção de um ou mais sacarídeos específicos.

Zhang *et al.*, (2013) utilizaram como substrato um meio de cultura rico em glicose e xilose obtido pela hidrólise do bagaço proveniente da extração de óleo de dendê, que é rico em celulose e hemicelulose. Com este substrato, a linhagem de *B. megaterium* R11 foi capaz de produzir P(3HB), sendo que a maior produção foi obtida quando utilizada triptona como fonte de nitrogênio. O percentual de P(3HB) acumulado evidenciado foi $43 \pm 3,8$ %.

Métodos de cultivo em estado sólido, como alternativa de otimização do processo produtivo, também vêm sendo estudados. Sathiyarayanan *et al.*, (2013) mostraram que existe potencial para este método por meio de um conjunto de experimentos realizados com a linhagem marinha *B. megaterium* MSBN04, utilizando um subproduto da indústria da tapioca como substrato.

Dessa forma, um dos motivos que sustenta a escolha pelo *B. megaterium* como microrganismo produtor de PHA nessa pesquisa é a sua capacidade de crescimento e síntese de P(3HB) a partir de diversos substratos de baixo custo agregado e substratos provenientes de resíduos agroindustriais.

2.5. Estrutura da parede celular bacteriana

As bactérias podem ser classificadas em Gram-positivas e Gram-negativas, onde a principal diferença se encontra na composição de sua parede celular. Grande parte dos microrganismos produtores de P(3HB) são Gram-negativas, sendo apenas as bactérias do

gênero *Bacillus* os exemplos de Gram-positivas encontradas na literatura, conforme mostra a Tabela 2.3 (Tortora *et al.*, 2012; Valappil *et al.*, 2006).

Tabela 2.3: Classificação de bactérias produtoras de PHA.
Adaptado de: Valappil *et al.*, (2006).

Microrganismo	Classificação
<i>Cupriviadus necator</i> ^a selvagem	Gram-negativa
<i>Methylobacterium</i> sp.	Gram-negativa
<i>Azohydromonas lata</i>	Gram-negativa
<i>Pseudomonas olearans</i>	Gram-negativa
<i>Cupriviadus necator</i> recombinante	Gram-negativa
<i>Escherichiacoli</i> recombinante	Gram-negativa
<i>Bacillus megaterium</i>	Gram-positiva
<i>Bacillus cereus</i>	Gram-positiva

^a A *C. necator* anteriormente era nomeada como *Alcaligenes eutropus* e *Ralstonia eutropha*

Um dos componentes da parede celular bacteriana é uma rede macromolecular conhecida como peptidoglicano – também conhecido por mureína. A camada peptidoglicana consiste em um polímero natural formado por dois monômeros ligados de forma cruzada, N-acetilglicosamina (NAG) e N-acetilmurâmico (NAM) (de *murus*, significando parede), representadas na Figura 2.6 (Tortora *et al.*, 2012).

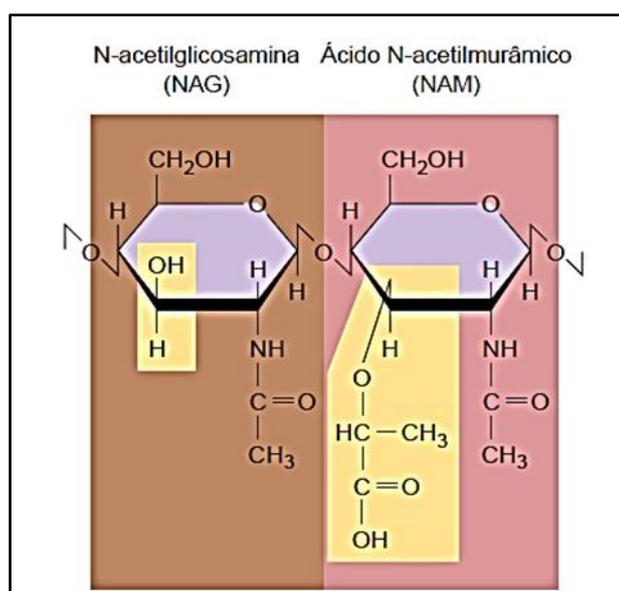


Figura 2.6: N-acetilglicosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM) unidos como na peptidoglicana. Fonte: Tortora *et al.*, (2012).

A parede celular das bactérias Gram-positivas consiste em várias camadas de peptidoglicano, formando uma parede mais robusta, com uma espessura entre 20 e 80 nanômetros (Reith e Mayer, 2011), podendo representar entre 30 a 70 % de massa celular seca (Hogg, 2005). Além disso, a estrutura celular, conforme a Figura 2.7, contém ácidos teicóicos, que são moléculas formadas pela união de um álcool (como glicerol ou ribitol) e fosfato.

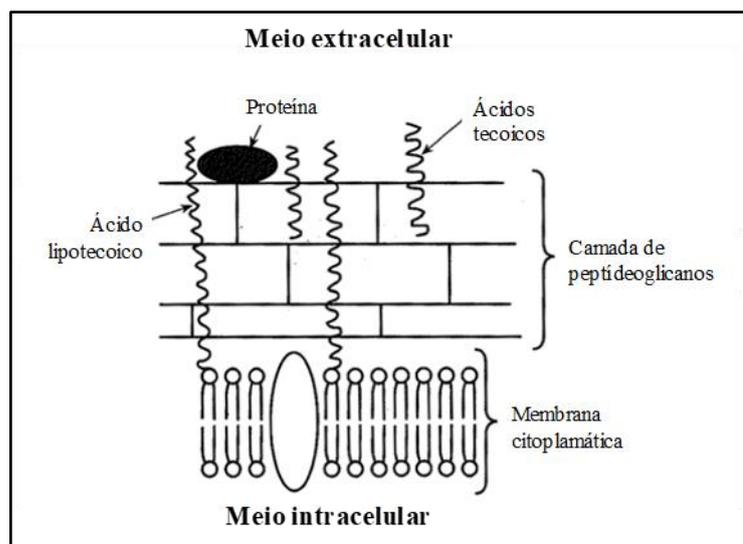


Figura 2.7: Constituição da parede celular de bactérias Gram-positivas.
Adaptada de Hogg (2005).

Existem duas classes de ácidos teicóicos: lipoteicoico (*lipoteichoic acids*, LTA), que atravessam a camada peptidoglicana e estão ligados à membrana plasmática, e os teicóicos da parede (*wall teichoic acids*, WTA) que estão ligados à camada peptidoglicana. Estes ácidos atribuem uma carga negativa (proveniente dos grupos fosfato) podendo se ligar e regular o movimento de cátions para dentro e fora da célula, conforme observado na Figura 2.8 (Brown *et al.*, 2013). Eles também podem influenciar no crescimento celular, impedindo a ruptura da parede e a possível lise celular. Estes ácidos também fornecem boa parte da especificidade antigênica da parede, e portanto, tornam possível fazer a identificação de Gram-positivas (Tortora *et al.*, 2012).

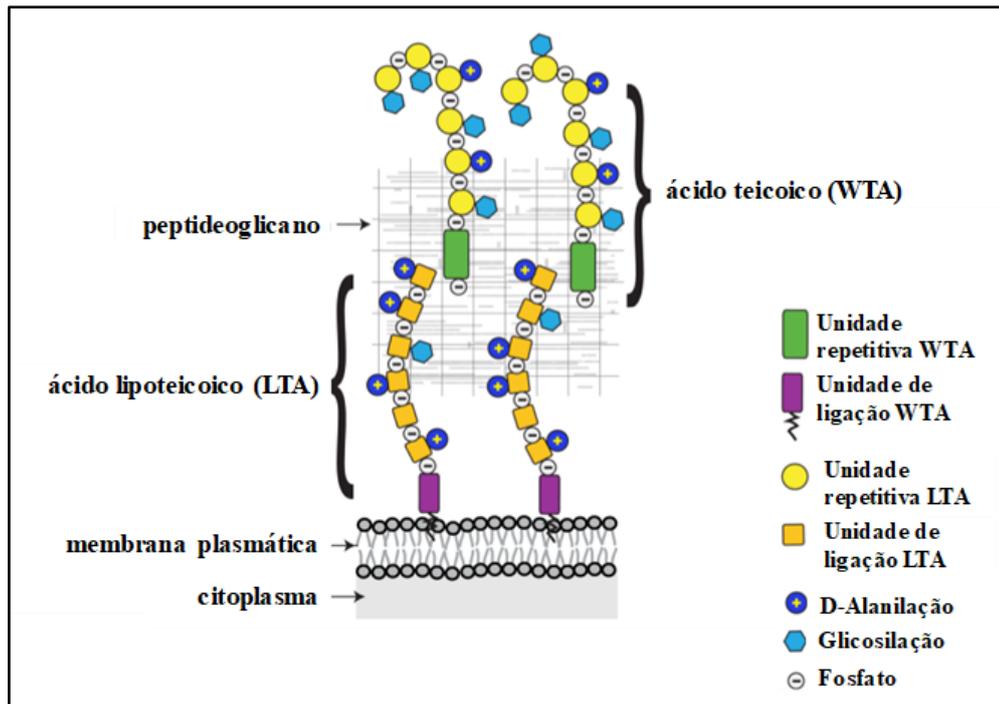


Figura 2.8: Distribuição dos ácidos teicoicos na parede celular de bactérias Gram-positivas.

Adaptado de: Brown et al., 2013.

As células das bactérias Gram-negativas possuem uma camada muito mais fina de peptidoglicano, sendo inferior a 10 % do peso seco da parede celular, tornando-a menos resistente quando comparada com as Gram-positivas. No entanto, esse grupo possui uma membrana externa de lipopolissacarídeos (LPS), estrutura complexa formada por lipoproteína, polissacarídeo e fosfolipídio, conforme a Figura 2.9 (Hogg, 2005; Tortora *et al.*, 2012).

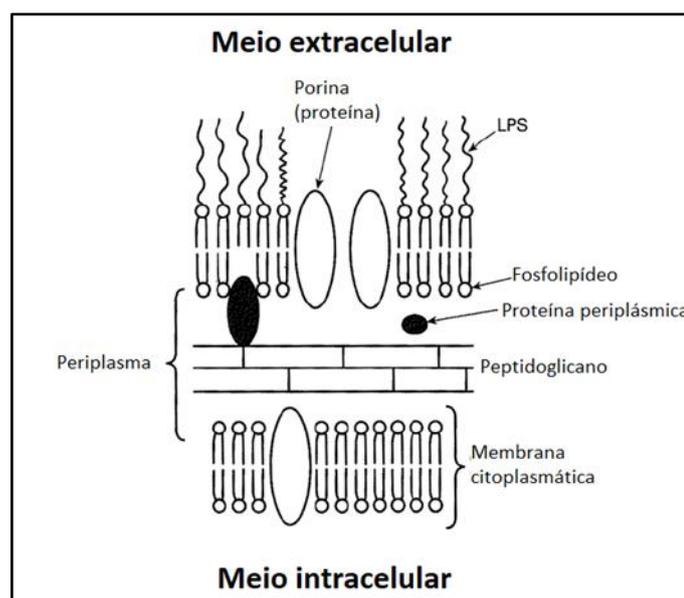


Figura 2.9: Constituição da parede celular de bactérias Gram-negativas.

Adaptada de Hogg, 2005.

A camada de lipopolissacarídeos (LPS), estrutura ausente em bactérias Gram-positivas, pode conter lipídeo A, que é uma endotoxina capaz de causar uma resposta imunológica ao organismo humano (Wang *et al.*, 2011). O lipídeo A é um composto orgânico que pode ser extraído de bactérias Gram-negativas juntamente com o P(3HB) na etapa de recuperação do polímero com solventes, como é o caso, por exemplo da *C. necator* (Lee *et al.*, 1999). Esse fato é um complicador em aplicações medicinais, pois esse lipídeo pode levar a condições graves como febre e choque tóxico, sendo necessária a implementação de uma etapa de separação desta substância no processo industrial. Mesmo com essa dificuldade, os exemplos de produção em escala industrial se restringem a produção de P(3HB) a partir de bactérias Gram-negativas (Valappil *et al.*, 2007).

Por não conter essa endotoxina e por ser uma bactéria mais resistente para cultivos em larga escala, as bactérias do gênero *Bacillus* como microrganismos produtores de P(3HB) são uma alternativa.

O gênero *Bacillus* reúne espécies patogênicas, que é o caso da *B. cereus*, onde algumas linhagens desse microrganismo estão relacionadas a infecções alimentares (Kotiranta *et al.*, 2000). No entanto, o *B. megaterium*, espécie utilizada nesta pesquisa é uma espécie não causadora de doenças (Hanna e Ireland, 1999), o que a torna mais atrativa no caso de futuro escalonamentos de processo.

A Tabela 2.4 apresenta um resumo das principais diferenças entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Tabela 2.4: Comparação das principais diferenças observadas entre a composição da parede celular das bactérias. Adaptada de Tortora *et al.* (2012).

Característica	Bactérias Gram-positivas	Bactérias Gram-negativas
Espessura da camada de peptidoglicano	Espessa (múltiplas camadas)	Fina (única ou poucas camadas)
Ácidos teicoicos	Presentes em muitas	Ausentes
Membrana externa	Ausente	Presente
Conteúdo de lipopolissacarídeos (LPS)	Nenhum	Alto
Resistência a ruptura física	Alta	Baixa

2.6. Recuperação do biopolímero

O processo para a obtenção do biopolímero em questão envolve duas principais etapas: cultivo e a separação entre a biomassa celular e do P(3HB). Alguns estudos indicam que o método de recuperação do meio intracelular pode ser relacionado com 50 % do custo do produto final (López-Abelairas *et al.*, 2015). Na escolha do método também é fundamental manter as propriedades físicas, mecânicas e químicas adequadas do produto além de uma técnica que possua um alto rendimento para tornar viável o processo de produção (Ramsay *et al.*, 1994).

O processo de separação pode ser dividido de maneira geral em três partes: um pré-tratamento da biomassa, a recuperação do biopolímero intracelular e a purificação do produto final. A primeira etapa – pré-tratamento – tem como finalidade fragilizar a parede celular e facilitar o processo de lise celular na etapa de recuperação.

As principais técnicas de recuperação da parcela polimérica podem ser divididas em três grupos, separados por tipo e princípio de ação para obtenção do biopolímero, conforme Figura 2.10. Os métodos químicos podem ser extração com solventes ou digestão química; os métodos bioquímicos pela digestão enzimática; os métodos mecânicos, utilizando equipamentos e técnicas desenvolvidas para causar lise física e além de outras técnicas que vêm sendo testadas. Também é possível utilizar técnicas combinadas a fim de aumentar o rendimento e/ou pureza do produto final.

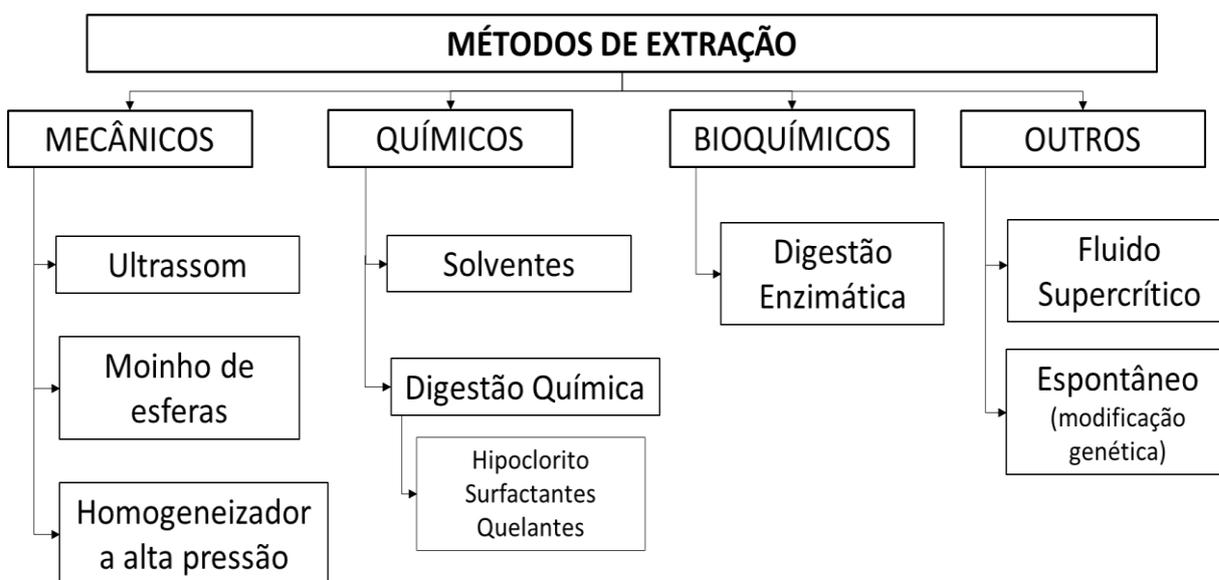


Figura 2.10: Resumo esquemático de métodos de recuperação para os polihidroxialcanoatos.

2.6.1. Técnicas de pré-tratamento da biomassa

O tratamento prévio visa romper ou aumentar a permeabilidade da parede celular do microrganismo. A seguir são discutidas as peculiaridades de cada um dos métodos, bem como a influência de tratamentos preliminares da biomassa, a fim de aumentar o rendimento da recuperação polimérica com menor impacto na massa molar e maior pureza. Os principais pré-tratamentos citados na literatura são o térmico (aquecimento e congelamento), alcalino e mecânicos (Jacquel *et al.*, 2008).

De acordo com alguns estudos o tratamento térmico com temperaturas acima de 80 °C e tempos de até 15 minutos, desestabiliza a membrana externa e desnatura material genético. Dependendo da linhagem é necessário avaliar o impacto no biopolímero. Já o tratamento térmico por congelamento, embora fragilize a célula, demanda muita energia para aplicações em larga escala, sendo mais utilizado para armazenagem de culturas (Jacquel *et al.*, 2008).

Tamer *et al.* (1998) utilizaram o pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio no microrganismo *A. latus*, seguido da utilização de moinho de esferas para recuperação do polímero. No mesmo estudo foi testado um tratamento com água com altas concentrações de sal a fim de desidratar as células, porém o tratamento não se mostrou tão eficaz.

A ruptura mecânica de células compreende o rompimento da parede celular com liberação dos produtos citoplasmáticos. Essa técnica é especialmente importante no caso de bactérias Gram-positivas, por apresentarem maior resistência à recuperação do polímero (Harrison, 1991).

O ultrassom é utilizado para fragilizar a parede celular como pré-tratamento (Cooper e Hausman, 2006). Koller *et al.* (2013) afirmam em seu estudo que este tratamento para Gram-negativas alcança médios percentuais de pureza e de recuperação do biopolímero e que após o tratamento não se observa diminuição de massa molar do produto final.

Pulsos de pressão com CO₂ supercrítico (CO₂-SC) são capazes de causar a ruptura celular, reduzindo o tempo de exposição do polímero ao solvente. Hejazi *et al.* (2003), utilizando *R. eutropha* afirmaram que seria possível recuperar 89 % do polímero em 15 min de contato biomassa/clorofórmio a partir das células submetidas ao fluxo de CO₂-SC por 100 min, 200 atm, 40 °C e metanol. A aplicação de fluido supercrítico ainda é uma técnica pouco estudada quando se refere à ruptura celular para recuperação de P(3HB).

2.6.2. Métodos químicos de recuperação

Dentro dos métodos químicos encontram-se duas abordagens que dependerão do tipo de substância química utilizada, que podem ser:

- **Agentes solventes:** substâncias que solubilizam o P(3HB) (definindo-se como solvente a substância capaz de dissolver o soluto, a fim de formar uma solução do soluto com o solvente);

- **Agentes digestores:** substâncias que solubilizam o material não-P(3HB), ou seja, a biomassa residual, ou que solubilizam a parede celular do microrganismo.

a) Extração por solventes

O uso de solventes para a extração do P(3HB) é o método de extração mais utilizado industrialmente, principalmente por atingir altos níveis de pureza (Jacquel *et al.*, 2008). As vantagens desse processo incluem simplicidade da técnica, maior facilidade de escalonamento industrial (visto que faz uso de equipamentos de fácil operação), e a possibilidade de reutilização do solvente.

O solvente mais utilizado nos processos de extração de P(3HB) a partir de bactérias é o clorofórmio, sendo também utilizados: acetona, metil isobutil cetona, cloreto de metileno, carbonato de propileno, acetato de etila e álcool isoamílico. Embora se alcancem purezas acima de 90 %, muitos estudos relataram baixos rendimentos de extração, em torno de 30 % (Quines *et al.*, 2015).

Jacquel *et al.* (2008) sugerem que proporções de polímero solvente superior a 5 % (m·v⁻¹) formaria uma solução de alta viscosidade, o que dificulta a transferência de massa no sistema, complicando o uso para aplicações industriais.

Após a extração do polímero e remoção da biomassa residual do extrato é necessária uma etapa de separação do polímero que se encontra dissolvido. O solvente pode ser evaporado em uma etapa de secagem, o que, para uma escala industrial se torna uma opção com custo mais elevado pelo grande consumo de energia. Uma alternativa é a técnica de precipitação do P(3HB) em solução, sendo mais viável financeiramente. Esta técnica pode ser realizada de duas formas: resfriamento da solução ou por adição de não-solvente. Alguns não-solventes usados na literatura são a água, etanol, metanol, acetona e hexano, sendo este último o eleito como melhor opção. Geralmente utilizados numa proporção entre 1:1 até 4:1 de não-solvente pela solução contendo o polímero (Borges, 2017; Jacquel *et al.*, 2008; Riedel *et al.*, 2013).

A ação do solvente pode ser dividida em duas etapas: inicialmente a membrana bacteriana se modifica permitindo a permeação do solvente no meio intracelular; no interior da célula o solvente solubiliza o grânulo de polímero e o carrega para o meio extracelular. Na sequência, após processo de filtração para separação de fases, o biopolímero é separado via evaporação do solvente ou por precipitação (Jacquel *et al.*, 2008).

Solventes clorados foram os primeiros amplamente utilizados e com resultados satisfatórios para a recuperação de PHA, principalmente no percentual de pureza. Ramsay *et al.* (1994) avaliaram os solventes clorofórmio, diclorometano e 1,2-dicloroetano na solubilidade de P(3HB) de *C. necator*, atingindo 70 % de recuperação e 96 % de pureza para 15 min de contato com um pré-tratamento com acetona. Este pré-tratamento contribuiu para o aumento dos percentuais de recuperação e pureza do produto final indicando que solventes polares auxiliam o processo possivelmente por removerem moléculas de água ligadas à parede celular, que permanecem mesmo após a liofilização. Ao final, os autores quantificaram a degradação do polímero quando posto em contato com o clorofórmio, verificando que há modificação da estrutura molecular na primeira hora, com uma redução de aproximadamente 30 % na massa molar média.

Valappil *et al.* (2007) estudaram a recuperação via solventes para a bactéria Gram-positiva *Bacillus cereus*, verificando que a pureza do P(3HB) extraído foi maior para a extração com clorofórmio via *soxhlet* (99 %), seguida da extração por dispersão clorofórmio-hipoclorito (95 %) e pela extração utilizando apenas clorofórmio (92 %). Isso foi atribuído à lavagem rigorosa com solventes e à separação física do extrato dos detritos celulares no método de extração de *soxhlet*. Para a extração com clorofórmio a recuperação obtida foi de 82 % para o tempo de contato de 48 h, na temperatura de 37 °C. Utilizando as mesmas condições que Valappil *et al.*, Côrrea (2014) aplicou a extração com clorofórmio para a *B. megaterium* e encontrou 100 % de recuperação e de pureza. Côrrea também avaliou a solubilidade do P(3HB) em solventes alcóolicos (isopentanol, n-pentanol, n-butanol e isobutanol), tendo relatado que nenhum dos álcoois anteriores foi capaz de dissolver quantidades significativas do bioplástico.

No entanto, apesar de capazes de extrair o PHA intracelular, solventes clorados são tóxicos e altamente voláteis, sendo nocivos ao meio ambiente e aos seres humanos e apresentando alto potencial poluidor, o que é contraditório à ideia de que estes biopolímeros poderiam ajudar a minimizar os danos causados por polímeros de origem petroquímica. Dessa forma, é de interesse a busca por outras alternativas, que podem incluir solventes orgânicos de baixo impacto ambiental produzidos a partir de recursos renováveis ou técnicas de digestão química ou bioquímica.

Fiorese *et al.* (2009) avaliaram o rendimento utilizando carbonato de propileno como solvente de P(3HB), extraído a partir de *C. necator*. Para o tempo de contato de 30 min e na temperatura de 130 °C, os autores obtiveram rendimento de 95 % e pureza de 84 % de P(3HB). Em comparação com a extração com clorofórmio, o uso de carbonato de propileno levou a um polímero com menor índice de polidispersão, apesar de ter gerado uma diminuição de 26 % na massa média do polímero extraído com relação ao que foi verificado com o clorofórmio. Para o mesmo conjunto solvente/bactéria, Quines *et al.* (2015) avaliou a extração por 45 min a 150 °C e obtiveram 98 % de rendimento e 99 % de pureza. Por outro lado, para a Gram-positiva *B. megaterium*, Borges (2017) obteve um rendimento de 18 % e uma pureza de 96 % na extração com carbonato de propileno com 15 min de contato e 140 °C. A mesma autora ainda testou os solventes 2-heptanona (2-Hp), N,N-dimetilacetamida (NNDA) e o clorofórmio para comparação. Os percentuais mais altos encontrados foram com o NNDA, sendo aproximadamente 93 % de recuperação e de pureza, para 15 min de contato em 140 °C.

Vizcaino-Caston *et al.* (2016) utilizaram dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente para extração de P(3HB) a partir de *C. necator*. Após a extração foi realizada a precipitação com etanol. Embora os autores tenham sugerido que este solvente seria capaz de recuperar grânulos do biopolímero inclusive em bactérias Gram-positivas, por agir na lise celular foram encontrados indícios do solvente no produto final, o que limita algumas aplicações, principalmente na área médica.

b) Digestão celular por via química

Na recuperação por digestão celular por via química, um dos grandes desafios é minimizar a modificação química do polímero pelo agente digestor, a qual pode ter um impacto negativo sobre algumas propriedades do mesmo. Outra dificuldade encontrada nesta técnica é o decréscimo acelerado da eficiência de digestão celular com o aumento da proporção de biomassa seca e volume de solução utilizada.

López-Abelairas *et al.* (2015) avaliaram o desempenho dos seguintes compostos na digestão celular de *C. necator*: hidróxido de sódio (NaOH), cloreto de sódio (NaCl), ácido sulfúrico (H₂SO₄), ácido sulfúrico combinado com hipoclorito de sódio (NaClO) e NaCl combinado com diclorometano (CH₂Cl₂). Embora com a digestão com ácido sulfúrico tenha gerado percentuais de recuperação e pureza maiores, os autores afirmaram que o custo de produção seria mais baixo com o uso de NaOH. Com 4 horas de contato, os valores de taxa de recuperação de P(3HB) e pureza foram, respectivamente, de 82 % e 97-98 % quando usada uma concentração de células de 2,5 % (massa sólida / volume de solução de hipoclorito de sódio) e

de 70 e 80 % para a concentração de 7,5 %. Foi possível evidenciar a redução de massa molar do P(3HB), a qual diminuiu entre 3,8 a 11,8 vezes quando comparada ao polímero extraído por extração com clorofórmio. Além disso, observou-se o aumento do índice de polidispersão entre 1,6 e 4,5 vezes.

Posada (2011) estudaram a extração de P(3HB) de células de *C. necator* por meio de um pré-tratamento alcalino com solução de NaOH, seguido da digestão celular com NaOCl e dodecilsulfato de sódio (SDS). Ao final do processo foi obtido P(3HB) a 99,9 % em peso por secagem em *spray drying*.

Uma das alternativas existentes conjuga a ação de agentes surfactantes e quelantes. Enquanto o agente quelante promove o rompimento celular, o agente surfactante promove a solubilização do material que não seja de P(3HB) (Borges, 2017; Chen *et al.*, 1999).

Chen *et al* (1999) estudaram o rendimento de recuperação do polímero a partir da Gram-negativa *Alcaligenes eutrophus*. O surfactante (betaína) e o quelato (sal dissódico EDTA) foram dissolvidos em água deionizada (200 mL) e o valor do pH foi ajustado com NaOH. Tal método, nas condições ideais encontradas no estudo foi capaz de permitir recuperação de 98,7 % com pureza de 93,3 %. Porém, como consequência do ataque químico, houve grande diminuição da massa molar do P(3HB) no processo de recuperação.

2.6.3. Métodos bioquímicos de recuperação

A técnica de digestão celular por ação enzimática pode ser classificada como método bioquímicos de recuperação do P(3HB). Algumas enzimas são capazes de solubilizar a parede celular sem agredir a massa molar do polímero por terem como vantagem suas especificidades. No final do processo se obtém duas fases, uma sólida constituída de P(3HB) e uma fase líquida com os demais constituintes do microrganismo.

As vantagens da digestão celular por ação enzimática incluem condições de operação mais brandas em comparação com extrações por solventes (temperatura e pH) e o fato de as enzimas não serem nocivas e não causarem impacto ao meio ambiente. Além disso, as enzimas são catalisadores biológicos altamente específicos, ou seja, atuam diretamente no produto ao qual possuem afinidade, não formando subprodutos indesejados e não atacando o biopolímero, sem causar impacto nas propriedades do produto final (Kapritchkoff *et al.*, 2006).

Kapritchkoff *et al.* (2006) verificaram a capacidade de digestão de material celular de *C. necator* por diversas enzimas, tomando como referência a concentração de enzima por biomassa (e não a atividade enzimática). Foram testadas com a mesma metodologia as enzimas: bromelina, tripsina (bovina), quimotripsina (bovina), papaína, lisozima, pancreatina e celulase.

A tripsina foi selecionada devido à sua especificidade para ligações peptídicas com lisina e bromelina devido à sua ampla especificidade. Embora a lisozima tenha uma baixa eficiência na quebra celular e seja uma enzima de elevado custo, também foi escolhida para o estudo, uma vez que é frequentemente citada como uma enzima para a quebra do peptidoglicano. Foram realizados testes variando tempos de contato, temperatura, pH e concentração enzimática na solução. Além disso, foram realizados testes com mais de um estágio de contato, e com enzimas diferentes em cada etapa, a fim de aumentar a eficiência do processo. Entre todas as enzimas e condições testadas, a maior eficiência foi encontrada com a enzima pancreatina, com 8 h de contato, na temperatura de 50 °C e com solução de pH igual a 8,0. O percentual recuperado de polímero foi de 90,3 % e a pureza de 62,2 %. Com a bromelina os autores obtiveram percentuais próximos (88 % e 66 %, respectivamente), porém com 10 h de contato e tendo um custo muito elevado quando comparado com a pancreatina. No estudo, afirmou-se que o biopolímero obtido não sofreu degradação, o que confirma a especificidade das enzimas.

Outro aspecto importante é que de forma geral na literatura o processo de digestão enzimática é realizado de forma combinada com outra técnica com a finalidade de aumentar rendimento e pureza do produto final.

Posada (2011) além de testar métodos de digestão química, como já descrito, avaliou o rendimento com a combinação de pré-tratamento alcalino (com NaOH), uma etapa de contato com dodecil sulfato de sódio como surfactante e NaClO, e por fim contato enzimático com a pancreatina. Após estas etapas de extração, o produto foi lavado com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), seco e armazenado. Em comparação com a metodologia utilizando dodecilsulfato de sódio (SDS), o percentual recuperado foi o mesmo, porém a metodologia com a enzima foi avaliada como de menor custo de produção.

Suzuki *et al.*, (2008) utilizaram células da espécie *Burkholderia cepacia* para a extração de P(3HB) por via enzimática, utilizando a enzima Esperase. O estudo reuniu testes enzimáticos isolados e utilizados em conjunto com um tratamento com H₂O₂, além de comparar com o método químico utilizando o agente digestor SDS. Nos testes enzimáticos realizados em conjunto com os químicos foi variada a ordem dos tratamentos. O experimento com a maior taxa de pureza foi o enzimático seguido de SDS. A taxa utilizada foi 0,56 (SDS/células) e a pureza obtida foi de 71 %.

Yasotha e colaboradores (2006) também realizaram experimentos para a recuperação do biopolímero via digestão enzimática e química combinadas, a partir células da espécie *Pseudomonas putida*. Os compostos utilizados na metodologia foram a enzima Alcalase (para digerir as proteínas desnaturadas), SDS para auxiliar a solubilização, ácido etilenodiamino

tetra-acético (EDTA) para complexar cátions e lisozima para digerir a parede de peptidoglicano envolvendo a célula. Os resultados mostram que a enzima Alcalase utilizada teve o efeito mais significativo no processo de tratamento e contribuiu para cerca de 71,5 % em termos de desempenho do tratamento para recuperação de polímero. No experimento obteve-se 92,6 % de pureza e aproximadamente 90 % de recuperação.

Neves (2009) avaliou diferentes enzimas para digestão da parcela não-P(3HB) a partir de *C. necator*. A metodologia utilizada foi um pré-tratamento térmico, o contato enzimático e a recuperação do polímero com 1mL de clorofórmio. A enzima Celumax® BC foi identificada como a enzima de maior potencial para o processo de recuperação de polímero, atingindo um percentual de 88 % de recuperação e 94 % de pureza.

2.6.4. Métodos mecânicos de recuperação

A ruptura mecânica de células é amplamente usada para recuperar proteínas intracelulares. Este campo é dividido em duas categorias principais de ruptura: cisalhamento sólido (por exemplo, moinho de esferas) e cisalhamento líquido (por exemplo, homogeneizador de alta pressão) (Jacquel *et al.*, 2008).

A recuperação do P(3HB) por método mecânico ocorre em duas etapas. Inicialmente, as células suspensas em meio líquido são submetidas ao processo de rompimento celular e em seguida centrifugadas para separação do P(3HB) do restante dos resíduos celulares (Quines, 2015). Os equipamentos de ruptura celular mais referenciados na literatura são o moinho de esferas e o homogeneizador de alta pressão. Estas técnicas causam pouco dano ao produto e ao meio ambiente, o que constitui sua maior vantagem.

As desvantagens dos métodos mecânicos geralmente estão associadas ao alto custo de investimento, ao longo tempo de processamento e às limitações de rendimento e pureza, sendo geralmente utilizadas em combinação com outros métodos (Jacquel, Pacheco), como extração com solventes ou digestão química ou digestão bioquímica (Côrrea, 2014; Jacquel *et al.*, 2008).

O tratamento mecânico prévio da biomassa pode facilitar a solubilização do polímero por reduzir à resistência a transferência de massa ao fragilizar ou romper completamente a parede celular (Bissacot, 2018; Borges, 2017).

Tamer e Moo-Young (1998) realizaram experimentos para a extração de P(3HB) com as células *A. latus*, a partir das técnicas de moinho de esferas e de homogeneizador de alta pressão, e estes resultados foram comparados com o método de digestão química por SDS e NaClO. Pelo método químico, foram duas etapas: biomassa em contato com SDS por 1 hora e após com hipoclorito de sódio durante 24 horas, obtendo uma extração de 95 %. Valores

próximos foram alcançados em poucos minutos no método de moinho de esferas. A eficiência desta técnica foi independente da concentração de biomassa, mantendo constante a velocidade de agitação e a taxa de fluxo de biomassa diluída. Já o desempenho do homogeneizador foi dependente da concentração de biomassa. Em relação ao moinho, o homogeneizador não teve uma boa eficiência em baixos níveis de biomassa, mas com maior concentração de células o rendimento foi um pouco melhor. No entanto, bloqueios frequentes dificultaram o processamento, indicando que a técnica de moinho de esferas é mais indicada para a aplicação em escala industrial.

Ghatnekar *et al.* (2002) defendem que o homogeneizador de alta pressão seria um método com potencial para aplicação industrial. Os autores obtiveram um rendimento de 95 % e pureza de 80 % para o P(3HB) recuperado a partir de *Methylobacterium* sp V49, com dois ciclos com pressão igual a 400 kgf/cm². Os autores observaram ainda que o aumento da pressão, ocasiona aumento da temperatura, o que provoca o fenômeno de precipitação de algumas proteínas presentes na suspensão quando atinge valores próximos ou acima de 60 °C, dificultando a separação do P(3HB) do sólido obtido.

Ling *et al.* (1998) obtiveram o maior percentual de recuperação e pureza de P(3HB), 81 % e 96,5 %, respectivamente, utilizando a combinação de um homogeneizador de alta pressão (55MPa) com centrifugações, seguidas do contato com hipoclorito de sódio. A linhagem utilizada nos experimentos foi uma *E. coli* recombinante. Esse tratamento facilitou a separação dos grânulos de P(3HB) dos detritos residuais de biomassa, aumentando a pureza do produto obtido.

2.6.5. Outros métodos encontrados na literatura

Constam na literatura alguns outros métodos para a separação do biopolímero da biomassa residual, como a extração por fluidos supercríticos e a liberação espontânea por modificações genéticas. A técnica de extração com fluidos supercríticos tem como vantagem o fluido nesta condição apresentar propriedades físico-químicas únicas, como altas densidades e baixas viscosidades que os tornam adequados como solventes de extração, sendo o fluido mais utilizado o CO₂. Este método de extração também pode ser combinado com pré-tratamentos de NaOH ou NaCl para obtenção de maiores rendimentos (Hejazi *et al.*, 2003; Jacquél *et al.*, 2008).

Além destes, outros métodos de recuperação utilizam o ar, tais como: classificação via ar e flotação de ar dissolvido, porém estes são geralmente utilizados como uma etapa que antecede um método químico, bioquímico ou mecânico (Jacquél *et al.*, 2008). A técnica de classificação via ar, patenteada por Noda (1995), consiste em um pré-tratamento das células

com ultrassom, após liofilização e então as células são moídas e são separadas em fração fina (38 %) e fração grossa (62 %). A fração fina é então submetida à extração por clorofórmio seguida de precipitação com metanol para produzir partículas de P(3HB) com uma pureza de cerca de 95 % ou mais e um rendimento de cerca de 85 %. As experiências realizadas em *E. coli* levaram a uma pureza de 97 % e a um rendimento de 90 %. A técnica de flotação de ar dissolvido utiliza geralmente digestão enzimática como pré-tratamento.

Com relação à técnica que realiza modificações genéticas a fim de fragilizar a membrana celular e, assim, levar ao seu rompimento espontâneo após as células acumularem grandes quantidades de P(3HB), tem-se como exemplos de bactérias utilizadas para tais modificações a *Escherichia coli* e a *Azotobacter vinelandii*. Um dos genes utilizados nesta modificação é citado por Jacquelin (2008) e recebe o nome de *Alcaligenes phbCAB* (Posada *et al.*, 2011).

2.7. Considerações finais

Como relatado neste capítulo, a literatura científica sugere a aplicabilidade de diversas técnicas para obtenção do biopolímero intracelular produzido por uma grande gama de bactérias, como foi relatado na seção 2.5. Industrialmente a técnica mais utilizada é por solventes, sendo o principalmente o clorofórmio. Além disso, os microrganismos mais utilizados para a produção e extração do polihidroxibutirato são bactérias Gram-negativas pela menor espessura da parede celular. Porém, estas bactérias podem conter endotoxinas que permanecem no produto final, exigindo etapas adicionais para purificação e ainda com risco de causar respostas imunológicas nos seres humanos se não forem eliminadas de maneira satisfatória.

Outro fator que devemos ressaltar é a nocividade e alta volatilidade do solvente clorado que além de poder causar danos para quem opera o processo e na natureza ser de grande impacto, também causa modificações nas características do produto final.

Outras técnicas utilizando digestores químicos provaram alta eficiência, porém poucos compostos apresentam baixa/nenhuma nocividade e também foram feitos relatos de modificações nas propriedades do produto final.

Adicionalmente, os métodos bioquímicos e físicos são uma alternativa positiva para a extração dos grânulos de polímero, pois não há riscos à saúde e ao ambiente, o que está de acordo com o uso de biopolímeros, que tem como finalidade minimizar o acúmulo de plásticos de origem petroquímica e os impactos que estes causam no meio ambiente. Embora os métodos

físicos apresentem um rendimento mais baixo quando comparados com métodos químicos, utilizados de forma combinada com outras técnicas aumenta a eficiência do processo.

O método bioquímico de digestão enzimática – ainda pouco utilizado – tem inúmeras vantagens, como exemplo a especificidade das enzimas e o fato de não causar degradação do polímero. Também, o uso de enzimas – catalisadores orgânicos – ao invés de solventes ou digestores tóxicos vai ao encontro do apelo ambiental no uso de biopolímeros. Como desvantagem temos o custo das enzimas e conseqüentemente do processo de recuperação do biopolímero quando comparado ao processo de extração com solventes. O elevado custo desta metodologia torna mais importante o seu estudo, a fim de encontrar uma enzima mais barata e eficiente, além da otimização dos parâmetros do processo para melhorar rendimento e diminuir quantidade de enzima necessária.

Desta maneira, é imprescindível a realização de estudos que abordem novas metodologias de recuperação do P(3HB) do interior de células bacterianas, além de relacionar a eficiência do processo (rendimento e pureza do produto), como também manter às características do produto final. Com os fatores citados, a técnica de digestão enzimática se torna interessante para novos estudos. Também é necessário o estudo da digestão celular por enzimas em bactérias Gram-positivas que por sua camada espessa de peptidoglicano são menos estudadas, mesmo não possuindo endotoxinas na parede celular.

Como discutido ao longo do presente capítulo, sabe-se que o custo final do P(3HB) sofre grande impacto pelo substrato utilizado no cultivo, e ainda mais impacto com as etapas de recuperação e purificação do produto final. Dessa forma, é fundamental o uso de linhagens como a *Bacillus megaterium*, que utilizem substratos de menor custo agregado e ainda consigam armazenar uma boa quantidade de grânulos de polihidroxibutirato como reserva de energia. Além disso, seria de grande relevância estudar a aplicação da metodologia de digestão enzimática para este tipo de bactéria, buscando condições de processo que permitam atingir percentuais mais elevados de recuperação e pureza, com menor tempo e menores concentração de enzima na solução de contato.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1. Microrganismo

A massa de células utilizada na etapa inicial de ensaios preliminares foi obtida pela homogeneização da biomassa de *B. megaterium* previamente liofilizada de cultivos realizados durante a elaboração da dissertação de mestrado de Hassemer (2016). Para a complementação dos ensaios preliminares e para os testes realizados de acordo ao planejamento experimental para avaliação das condições ótimas de recuperação foram realizados cultivos adicionais com a linhagem cedida pelo Bioteclab - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS, já identificada como *B. megaterium*, que é reconhecidamente produtora de P(3HB). A bactéria foi armazenada congelada no meio de cultura com 20 % de glicerol, solução crioprotetora com a função de proteger as células para não ocasionar o rompimento celular no congelamento.

3.2. Meio de cultura e condições de cultivo

3.2.1. Biomassa utilizada no conjunto inicial de testes preliminares

Como mencionado na seção 3.1 a biomassa utilizada nos testes preliminares foi produzida em cultivos realizados no trabalho de Hassemer (2016), que verificou a viabilidade de produção de P(3HB) pelo *B. megaterium* a partir de soro de leite. Os cultivos foram realizados no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS, em biorreatores de 5,0 L contendo 4,0 L de meio de cultivo sob condições pre-estabelecidas dos seguintes

parâmetros operacionais: agitação (250 rpm, 300 rpm, 350 rpm); pH (7,0; 7,0 até 6,3; e sem controle de pH); e aeração constante ($4 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$). Após cada cultivo a biomassa foi liofilizada e mantida congelada a fim de garantir a integridade do polímero. Para a homogeneização de toda a biomassa liofilizada recebida, utilizou-se peneira da Série Tyler, garantindo-se, assim, uma mistura entre biomassa de diferentes cultivos e granulometria menor que 28 *mesh*.

3.2.2. Biomassa utilizada na complementação dos ensaios preliminares e nos testes realizados de acordo ao planejamento experimental

Neste caso, a biomassa utilizada foi produzida como parte do presente trabalho. O meio de cultivo utilizado foi o meio sugerido por Wang e Lee (1997). O meio é preparado conforme as composições mostradas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Meio mineral utilizado nos cultivos.

Nome do composto	Componente	Composição (g L^{-1})
Sulfato de magnésio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,008
Fosfato dissódico	Na_2HPO_4	3,6
Fosfato monopotássico	KH_2PO_4	1,5
Sulfato de ferro (II) heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05
Cloreto de cálcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01
Ácido cítrico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	0,1

A esse meio é adicionado 1 mL de solução de micronutrientes a cada litro de meio mineral. A composição da solução de micronutrientes é mostrada na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Solução de micronutrientes.

Nome do composto	Componente	Composição (mg L^{-1})
Ácido bórico	H_3BO_3	300
Cloreto de cobalto (II) hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	200
Sulfato de Zinco heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30
Cloreto de manganês (II) tetrahidratado	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	30
Molibdato de amônio tetrahidratado	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	30
Sulfato de níquel heptahidratado	$\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30
Sulfato de cobre (II) pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10

A fonte de carbono utilizada foi sacarose e a fonte de nitrogênio foi sulfato de amônio. Nos experimentos em estufa incubadora rotatória a concentração de sacarose foi de $16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e a de sulfato de amônio de $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, conforme otimização experimental realizada em Luvizetto (2012). Previamente à realização dos cultivos, as soluções foram preparadas, colocadas em Erlenmeyers limpos e então esterilizados em autoclave por 15 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$.

A reativação da bactéria, após congelamento com meio de cultura e glicerol, foi realizada em cultivo de frasco cônico contendo meio mineral com sacarose e sulfato de amônio, nas quantidades descritas no parágrafo anterior, em estufa incubadora rotatória (shaker), a 200 rpm e temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, por um período de 18 h (pré-inóculo). Após este período foram adicionados 5 % deste pré-inóculo em outro frasco contendo o mesmo meio (inóculo) e nas mesmas condições de agitação e temperatura. Aproximadamente 5 h depois, no início da fase de crescimento exponencial, alíquotas de 5 % do inóculo foram transferidas para diversos erlenmeyers, com a 50 mL de meio de cultura e cultivados por 20 h em shaker. Um resumo deste procedimento é apresentado na Figura 3.1.

Após cada cultivo a biomassa é centrifugada, congelada e então é liofilizada (Liofilizador LS6000 – Terroni) e armazenada. Para a homogeneização de toda a biomassa liofilizada, utilizou-se peneira da Série Tyler, garantindo-se, assim, uma mistura entre biomassa de diferentes cultivos e granulometria menor que 28 *mesh*.

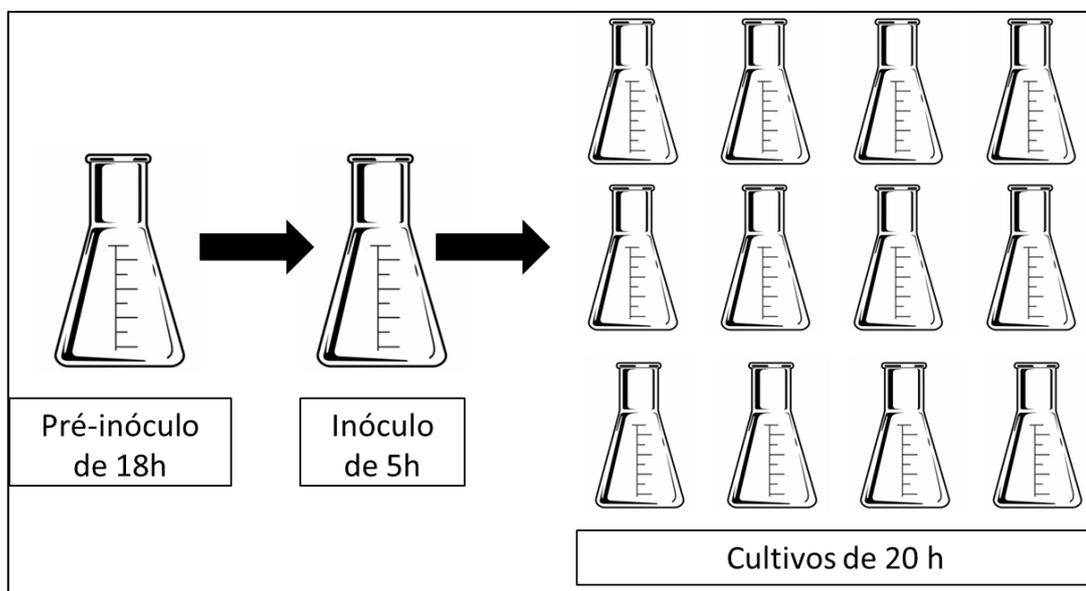


Figura 3.1: Resumo esquemático dos cultivos realizados em estufa incubadora rotatória.

3.3. Quantificação de biopolímero na biomassa

A quantificação do P(3HB) se deu pela metodologia proposta por Riis e Mai (1988), onde as cadeias do polímero são quebradas em seus monômeros via propanólise, sendo os ésteres obtidos analisados por cromatografia gasosa.

Para a análise pesou-se porções de 40 mg de biomassa, às quais foram adicionados 2 mL de n-propanol acidificado com ácido clorídrico (proporção 1:4), 2 mL de dicloroetano e 200 µL de solução padrão de ácido benzóico. Esta solução é preparada pela solubilização de 2 g de ácido benzóico em 50 mL de n-propanol. Cada frasco hermeticamente fechado, contendo a mistura de reagentes e biomassa, permaneceu em banho termostaticado por 2 h e 30 min a 100 °C. A cada intervalo de 15 min os tubos foram agitados manualmente por 20 s. Após o período de aquecimento, aguardou-se que o líquido resfriasse até a temperatura ambiente. Nesse momento, foram adicionados 4 mL de água destilada e se manteve a agitação por 4 min. Quando ocorreu a separação de fases, a mais densa (fase orgânica), que contém o polímero, foi removida com pipeta Pasteur e armazenada em frasco vial a fim de ser injetada no cromatógrafo gasoso da marca *Perkin Elmer Instruments – Autosystem XL* com detector de ionização de chama (FID). Foi utilizada a coluna *Elite-Wax* com comprimento de 30 m x 0,25 mm. A vazão utilizada para o gás de arraste (nitrogênio) foi de 2,0 mL·min⁻¹ e a vazão de *split* foi de 5,0 mL·min⁻¹. A temperatura foi medida na forma de uma rampa de 100 a 145 °C. As amostras foram injetadas manualmente.

Para cada conjunto de análises, foi construída uma curva de calibração com amostras de P(3HB) comercial (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), previamente preparadas seguindo os mesmos passos anteriormente descritos. O uso de uma curva de calibração para cada experimento visou diminuir a incerteza devido à erros experimentais (temperatura do banho, agitação dos frascos, variações do cromatógrafo, entre outros).

Com as áreas obtidas nos cromatogramas das amostras e com a equação obtida pela curva de calibração, podemos calcular o valor mássico (em gramas) da P(3HB) na amostra. Assim, o percentual de P(3HB) na biomassa foi calculado a partir da Equação 1, onde $m_{P(3HB)f}$ é a massa de biopolímero na biomassa calculado a partir da análise de cromatografia e m_t é a massa total da biomassa pesada.

$$\text{Pureza (\%)} = \frac{(m_{P(3HB)f})}{m_t} \times 100 \quad (1)$$

3.4. Enzimas e preparações

Neste trabalho foram utilizados preparados enzimáticos líquidos e secos (em forma de pó). As enzimas com preparações líquidas utilizadas, todas gentilmente doadas pela LNF Latino América (BR), foram as seguintes: Alcalase 2.4 L FG, Neutrase 0.8L, Pectinex Ultra SP-L, Viscozyme L e Saczyme Yield. As enzimas secas foram Papaína (Fragon – Índia), Bromelina (Prozyn - Brasil) e Pancreatina (Valdequímica - Índia). Na Figura A2.1-Apêndice 2 é possível observar algumas das enzimas de preparo líquido e em pó utilizadas neste trabalho.

As informações detalhadas sobre as enzimas foram obtidas a partir das respectivas fichas técnicas (classificação e microrganismo produtor) e do banco de dados online *Brenda-enzymes* (faixa de pH e temperatura), disponível em < <https://www.brenda-enzymes.org/> >, sendo que um resumo destas informações é apresentada na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Informações encontradas no banco de dados online *Brenda-enzymes* referentes às enzimas testadas.

Enzima	Microrganismo ou órgão produtor	Especificidade	Hidrolisa ligações	Faixa de pH	Faixa de temperatura
Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Endoprotease	Peptídicas	6,0 a 10,5	30 a 70 °C
Neutrase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Endoprotease	Peptídicas	6,0 a 10,0	30 a 70 °C
Pectinex®	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Poligalacturonase	(1,4)-alfa-D-galactosidurônica	3,0 a 6,0	30 a 80 °C
Viscozyme®	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Endo-beta-glucanase	(1,3) ou (1,4)-beta-glucanas	3,0 a 5,0	45 a 70 °C
Saczyme® Yield	<i>Aspergillus</i> , ou <i>Penicillium</i> ou <i>Rhizopus</i>	Glucoamilase	(1,4) e (1,6)-alfa-D-glicose	4,0 a 6,0	30 a 65 °C
Bromelina	<i>Ananas comosus</i> (fruto abacaxi)	Endoprotease	Peptídicas	3,5 a 8,5	30 a 70 °C
Papaína	<i>Carica papaya</i> (fruto mamão)	Endoprotease	Peptídicas	4,0 a 10,0	30 a 70 °C
Pancreatina	Pancreás bovino, porcino ou humano	Endoprotease	Peptídicas	4,0 a 10,0	30 a 70 °C

Com estes dados podemos observar que o substrato utilizado em cada estudo tem muita influência nas condições operacionais de cada enzima. Além disso, o microrganismo produtor e modificações genéticas destes também influenciam nestes fatores (Reed e Nagodawithana, 1995).

Como outras proteínas, as enzimas são produzidas dentro das células por ribossomos, que ligam aminoácidos em cadeias. Embora a maioria das enzimas industriais sejam produzidas por microrganismos, as enzimas são formadas exatamente da mesma maneira que nas células humanas. A estrutura e as propriedades das enzimas produzidas por uma célula específica são determinadas pelas instruções genéticas codificadas no ácido desoxirribonucleico (DNA) encontrado nos cromossomos da célula (Gurung *et al.*, 2013).

Além das informações gerais reportadas na Tabela 3.3, também foram encontrados na literatura algumas informações adicionais, que devem ser consideradas. Ma *et al.*, (2011) estudaram os efeitos do ultrassom na atividade enzimática da protease Alcalase, considerando como condições ótimas de trabalho pH 8,0 e temperatura de 50 °C. Kapritchkoff *et al.* (2006) estudaram a digestão enzimática de células Gram-negativas com algumas enzimas que também estão presentes neste estudo. Para a enzima Bromelina os autores encontraram como ótimo de trabalho pH de 4,75 e 50 °C de temperatura, para a Papaína as condições ótimas foram pH igual a 6,0 e temperatura de 40 °C e para a Pancreatina, pH de 8,0 e 50 °C. Ou *et al.*, (2010) estudaram o efeito das enzimas Alcalase, Neutrase e papaína na hidrólise da proteína do soro de leite. Os valores considerados ótimos de pH pelos autores foram 5,5, 7,0 e 8,0 para a papaína, neutrase e alcalase, respectivamente. E os valores ótimos de temperatura foram de 50 °C para neutrase e alcalase e 54 °C para a papaína.

As concentrações de enzimas em forma líquida necessárias em cada experimento foram calculadas com base nos valores de massa específica ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e composição constantes nas fichas técnicas. As enzimas que estavam em fase sólida foram previamente pesadas para chegar nas concentrações desejadas para cada experimento. Todas as enzimas foram empregadas com suspensões em tampão de fosfato de potássio, variando o pH dos testes de acordo com a matriz do planejamento experimental.

Para avaliar a influência da enzima, tomou-se como referência a concentração enzimática (enzima por biomassa, $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e não na atividade enzimática, uma vez que as atividades das diferentes enzimas utilizadas não são medidas no mesmo substrato, exceção feita às proteases. Assim, a ação das enzimas sob as células bacterianas não é diretamente comparável em termos de atividade enzimática.

3.5. Experimentos de recuperação enzimática de P(3HB)

3.5.1. Testes preliminares

As metodologias utilizadas para os testes preliminares e os experimentos de acordo com o planejamento experimental seguem as mesmas etapas e proporções, diferindo apenas no equipamento utilizado na etapa de contato enzimático.

Para os testes foram utilizadas 0,2 g de células de *Bacillus megaterium* suspensas em 20 mL de tampão fosfato com diferentes pH para cada enzima, armazenadas em tubo Falcon de 50 mL. Em seguida, se adicionou o volume de solução enzimática (para enzimas com preparações líquidas) ou a massa de enzima (para enzimas na forma sólida - em pó) para atingir a concentração enzimática desejada. Os Falcons então permanecem em agitação magnética em chapa de aquecimento, sob a temperatura constante, durante o tempo de duração da etapa de contato enzimático.

Após o processo de recuperação enzimática, a massa resultante é separada da solução enzimática por centrifugação (33496 x g por 10 min), lavada com água Mili-Q e novamente centrifugada. Esta amostra sólida que contém resíduo celular e biopolímero no meio é seca em estufa à 70 °C até atingir peso constante. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Os primeiros experimentos tiveram como objetivo avaliar a eficiência destas enzimas na digestão da parede celular da *B. megaterium* em diferentes condições dentro das faixas de pH e de temperatura encontradas na literatura. Para isto, todos estes testes foram realizados no tempo de 4 h de contato enzimático.

A escolha das faixas de pH e de temperatura para a realização dos primeiros experimentos foi feita após a avaliar os dados encontrados na literatura sobre cada enzima. Este estudo sobre as enzimas utilizadas neste trabalho e suas respectivas condições operacionais de melhor desempenho para a maior parte dos substratos utilizados foi realizado em artigos científicos e no site *Brenda-enzymes*. Este último reúne um banco de dados científicos de diversos autores para cada enzima e suas variações (organismos recombinantes, microrganismo produtor, etc), e para diversas aplicações.

Na Tabela 3.4 são apresentadas as faixas de pH e temperatura testadas para cada enzima na primeira fase (avaliação de desempenho em diferentes condições).

Tabela 3.4: Enzimas e suas respectivas faixas de pH e temperatura, avaliadas nos testes preliminares de eficiência na digestão enzimática em diferentes condições.

Enzima	Faixa de pH	Faixa de temperatura (°C)
Alcalase	6,5 a 7,0	40 a 70 °C
Neutrase	6,5 a 7,0	45 a 65 °C
Pectinex	4,5 a 6,5	45 a 60 °C
Viscozyme	4,0 a 5,0	40 a 50 °C
Saczyme Yield	4,5 a 6,5	45 a 65 °C
Bromelina	6,0 a 8,0	45 a 65 °C
Papaína	5,0 a 7,0	40 a 65 °C
Pancreatina	6,0 a 8,0	35 a 45 °C

Na sequência foram analisados diferentes tempos de contato de 3, 6, 9 e 12 h, nas condições de pH e temperatura que cada enzima teve o melhor desempenho para o substrato em estudo.

Finalizados os testes, selecionaram-se as enzimas que apresentaram maior eficiência na digestão celular e recuperação de P(3HB) para a realização dos experimentos de planejamento fatorial, que será descrito nas Seções 3.5.2 e 3.5.3.

Na Figura 3.2 observamos um dos experimentos preliminares realizados em duplicata na chapa de aquecimento.

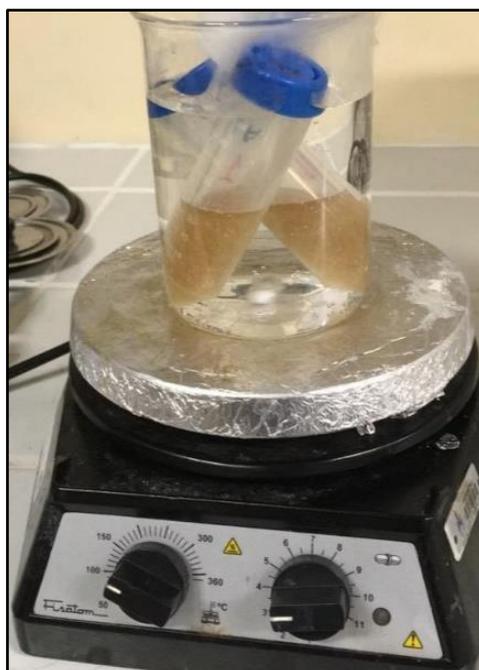


Figura 3.2: Imagem de um experimento preliminar em chapa de aquecimento.

3.5.2. Protocolo de testes realizados para o planejamento experimental

As células de *Bacillus megaterium* (0,2 g) foram suspensas em 20 mL de tampão fosfato com pH especificado de acordo com o planejamento experimental para cada enzima, e transferidas para um frasco Erlenmeyer de 50 mL. Em seguida, se adicionou o volume ou a massa de enzima para atingir a concentração enzimática desejada. Os frascos então permaneceram em agitação por 6 h em agitador rotativo (Banho Dubnoff – NI1232), a 220 rpm, sob a temperatura especificada constante.

Para auxiliar na agitação foram utilizados fragmentos de porcelana no interior do Erlenmeyer (Figura A2.2 no Apêndice 2).

Após o processo de recuperação enzimática, a massa resultante é separada da solução enzimática por centrifugação (33496 x g por 10 min), lavada com água Mili-Q, centrifugada e seca em estufa à 70 °C até atingir peso constante.

Os experimentos controle (sem adição de enzima) mostraram que as condições de reação utilizadas (pH, temperatura e agitação) não causaram lise celular significativa, pois mantiveram o mesmo percentual de P(3HB) que as células puras (dados não mostrados).

Também foram realizados testes de digestão enzimática nas mesmas condições, entre o banho rotativo e a chapa de para avaliar se há mudanças na eficiência dos dois métodos. Constatou-se que a troca da metodologia não afetou de forma significativa os resultados dos experimentos de controle. Na Figura 3.3 observamos um dos experimentos realizados de acordo com o planejamento experimental no banho com agitador rotativo.



Figura 3.3: Imagem de um experimento em banho rotativo.

3.5.3. Testes para avaliação das condições ótimas de recuperação

Os conjuntos de experimentos realizados para determinar as condições ótimas de recuperação para as enzimas selecionadas nos testes preliminares foram definidos usando um planejamento fatorial do tipo *Box Behnken (BBD)* (Ferreira *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2017; Novaes *et al.*, 2018). Foram considerados 3 fatores de interesse: concentração de enzima no meio (g de enzima por g de biomassa), o pH e a temperatura, e estes foram avaliados em 3 níveis (-1, 0, +1). O tempo de contato enzimático para todos os experimentos foi de 6 h.

A variável de resposta analisada para avaliação de desempenho da enzima foi a eficiência na solubilização da biomassa não-P(3HB) e, conseqüentemente, na liberação e purificação do P(3HB).

As condições experimentais para as variáveis independentes de cada enzima (avaliadas em três níveis) encontram-se na Tabela 3.5.

Tabela 3.5: Fatores do planejamento Box Behnken para cada enzima com os 3 níveis avaliados para cada fator.

Enzimas	pH	Temperatura (°C)	Concentração enzimática (%)
Pancreatina	6, 7 e 8	35, 40 e 45	5, 10 e 15
Alcalase	6, 7 e 8	45, 55 e 65	5, 10 e 15
Neutrase	6, 7 e 8	45, 55 e 65	5, 10 e 15
Papaína	5, 6 e 7	40, 50 e 60	5, 10 e 15
Bromelina	6, 7 e 8	45, 55 e 65	5, 10 e 15

Para cada conjunto de experimentos foram realizadas 4 repetições do ponto central, resultando no total de 16 experimentos para cada enzima testada, conforme dados da Tabela 3.6. Em relação à repetição no ponto central há duas finalidades básicas: fornecer uma medida do erro puro e estabilizar a variância da resposta prevista.

Tabela 3.6: Conjunto de experimentos definidos usando um planejamento *Box Behnken*, onde x_1 , x_2 e x_3 são os valores de pH, temperatura e a concentração enzimática, respectivamente.

Experimento	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0

Cada conjunto de dados foi analisado no software Statistica 10. A qualidade do ajuste dos dados experimentais foi avaliada em termos do coeficiente de determinação (R^2), usando o modelo estatístico definido pela Equação 2:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 \quad (2)$$

onde $(\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n)$ são os parâmetros do modelo, que foram estimados por mínimos quadrados. A resposta ou variável dependente (Y) foi o percentual pureza do P(3HB) obtido após a recuperação enzimática. Para o cálculo deste percentual é utilizada a Equação 1 (Seção 3.3), sendo $m_{P(3HB)f}$ é a massa de biopolímero calculado a partir da análise de cromatografia e m_t é a massa total da amostra pesada.

O nível de significância adotado para este estudo foi de 5 %. Após a definição dos coeficientes do modelo, foram construídos os gráficos de superfície de resposta com o intuito de ilustrar a região ótima dos parâmetros em questão.

Além do percentual de pureza de P(3HB), foi calculado o percentual de eficiência da digestão enzimática, avaliado segundo a Equação 3, que calcula a massa de material celular (não polimérico) solubilizado (S_N).

$$S_N (\%) = \frac{(Xrc_0 - Xrc_t)}{Xrc_0} \times 100 \quad (3)$$

Os valores de Xrc_0 e Xrc_t são os valores da concentração celular residual inicial e final (após o contato enzimático), respectivamente. A concentração celular total (X) e a concentração de P(3HB) permitem o cálculo da concentração celular residual (Xr) a partir da Eq. 4, ou seja, tudo que não é polímero. Este cálculo permite quantificar a solubilização do material celular não polimérico, avaliando assim a eficiência da digestão enzimática (Eq. 3).

$$Xr (g.l^{-1}) = X - [P(3HB)] \quad (4)$$

3.6. Teste de pré-tratamento da biomassa com sonicador

Também foram realizados ensaios no equipamento *Sonicador Sonics Vibra-cell VC 750* para avaliação do efeito do ultrassom no pré-tratamento da biomassa. As intensidades testadas foram de 20 e 50 %, avaliando-se o efeito somente do tratamento com ultrassom (Testes U20 e U50) e da utilização conjunta do pré-tratamento com ultrassom e digestão enzimática (Testes U20-PC4 e U50-PC4) com 4 % de pancreatina, enzima de melhor eficiência nos testes realizados seguindo o planejamento fatorial. As células de *B. megaterium* foram suspensas em 20 mL de tampão específico em beckers de 50 mL. O tempo avaliado no sonicador foi de 4 min (30 s por 10 s pausa). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

As células de *B. megaterium* foram suspensas em 20 mL de tampão específico em beckers de 50 mL. O tempo avaliado no sonicador foi de 4 min, com pulsar de 30 s de ultrassom por 10 s de pausa.

Os experimentos que tinham como finalidade avaliar apenas o efeito do ultrassom, não tiveram adicionada à solução a enzima.

Os experimentos utilizando sonicador e digestão enzimática foram realizados em duas etapas: sonicador (como descrito acima) e contato enzimático como descrito na Seção 3.6.

Na Figura 3.4 é mostrado o experimento com o *Sonicador Sonics Vibra-cell VC 750*.



Figura 3.4: Imagem do experimento de pré-tratamento da biomassa por sonicção.

3.7. Protocolo de experimentos de extração com clorofórmio

Os ensaios de extração utilizando o solvente clorofórmio foram realizados para fins comparativos, a partir das células de *B. megaterium* produzidas para o planejamento experimental, com sacarose. O clorofórmio por ser um solvente já bastante utilizado para extração do P(3HB), como abordado no Capítulo 2 foi avaliado para fins comparativos com relação a outros trabalhos da literatura com diferentes microrganismos.

Nestes experimentos, primeiramente foram incubadas amostras de 0,2 g de biomassa em 20 mL de solvente em tubos de vidro com tampa de rosca de *teflon*. Por não haver consenso na literatura a respeito da proporção biomassa/solvente utilizada, a proporção escolhida foi de 1 g para 100 mL de solvente, com base no proposto por Valappil *et al.* (2007). Após o contato

biomassa/solvente, sob temperatura de 60 °C e agitação magnética controladas, as amostras foram filtradas à vácuo, utilizando um conjunto de *Kitassato*, funil de *Büchner* e papel filtro qualitativo, como meio filtrante. O filtrado, contendo o P(3HB) extraído, foi seco em forno elétrico a 70 °C com circulação forçada até peso constante. A metodologia utilizada está esquematizada na Figura 3.5.

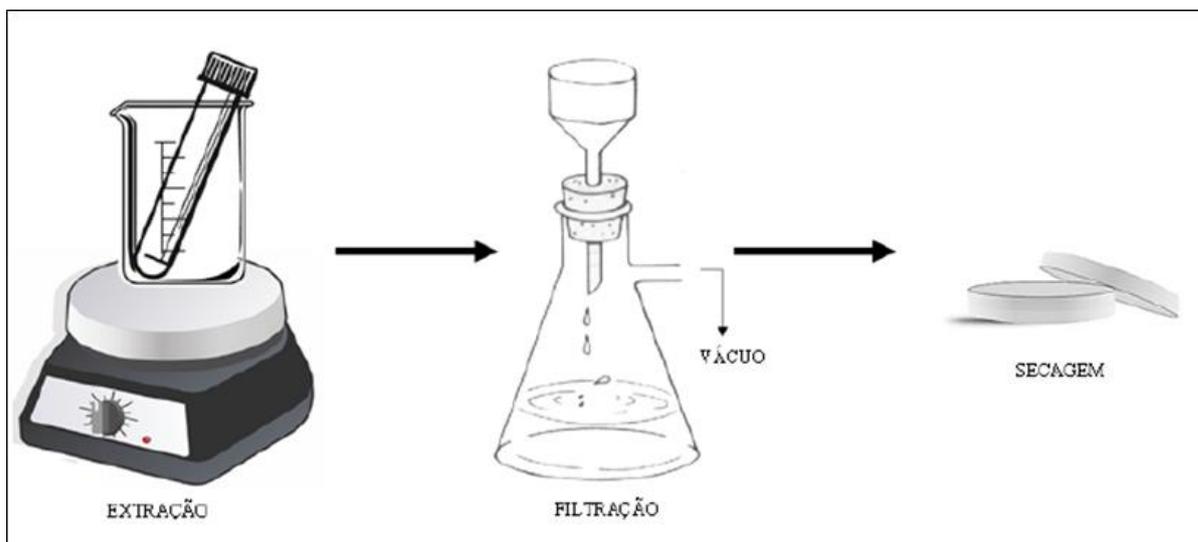


Figura 3.5: Etapas de extração de P(3HB) com clorofórmio a partir da biomassa.
Fonte: (Borges, 2017).

Os tempos testados foram 180 e 360 minutos, e todos os experimentos foram realizados em duplicatas. O P(3HB) obtido em Placa de Petri após secagem do solvente foi analisado, segundo sua pureza, por cromatografia gasosa pela metodologia descrita na Seção 3.3.

Os cálculos de eficiência da recuperação e pureza do biopolímero são realizadas com equações diferentes das utilizadas para recuperação enzimática pela metodologia ter ações diferentes. A recuperação do polímero por solvente foi calculada a partir da Equação 5.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{massa}_{\text{filme}}}{\text{massa}_{\text{P(3HB) na biomassa}}} \times 100 \quad (5)$$

O valor da $\text{massa}_{\text{filme}}$ é obtido em gramas pela pesagem do filme de biopolímero obtido após a evaporação completa do solvente e o da $\text{massa}_{\text{P(3HB) na biomassa}}$ é peso em gramas de P(3HB) na biomassa utilizada calculado por cromatografia gasosa (Seção 3.3). A pureza do polímero foi calculada conforme apresentado na Equação 6.

$$\text{Pureza (\%)} = \frac{\text{massa}_{\text{P(3HB)}}}{\text{massa}_{\text{filme}}} \times 100 \quad (6)$$

O valor da $massa_{P(3HB)}$ é obtido em gramas no filme de biopolímero após a evaporação completa do solvente quantificado por cromatografia e o da $massa_{filme}$ é o mesmo utilizado na Eq.5.

Na Figura 3.6 temos a imagem do experimento de extração com o solvente clorofórmio realizado em chapa de aquecimento.



Figura 3.6: Experimento de extração com clorofórmio realizado à 60 °C por 180 e 360 minutos.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1. Microrganismo e cultivos

Para todos os cultivos realizados com o meio sugerido por Wang e Lee (1997), conforme descrito na Seção 3.2.2, as células foram observadas em microscópio com aumento de 1600 vezes.

Na Figura 4.1 pode-se observar uma fotografia dos *B.megaterium* obtida com câmera digital direto na lente do microscópio. Esta imagem corresponde à coloração de GRAM de amostra do experimento realizado em shaker com (a) inóculo de 5 h e (b) final do cultivo de 20 h.

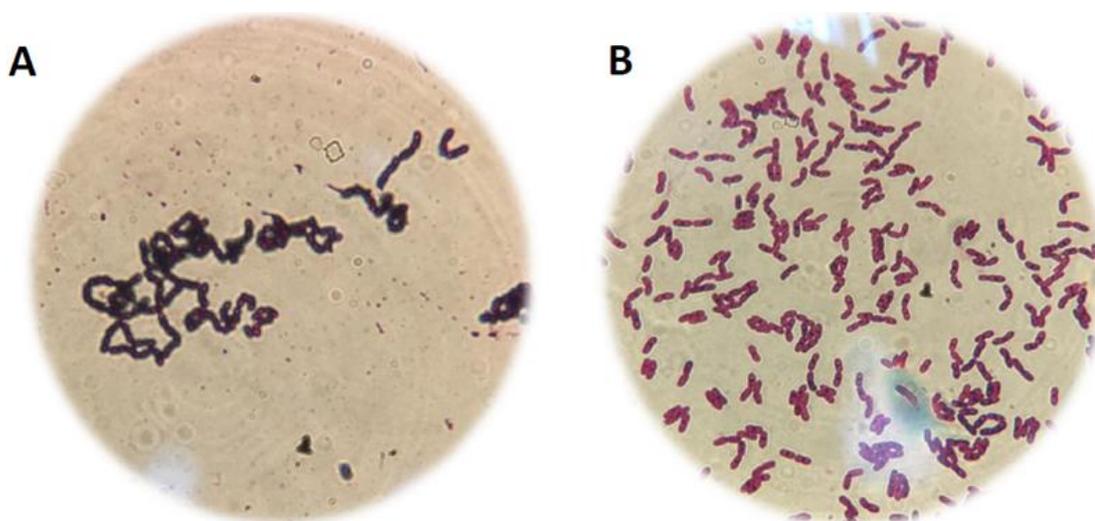


Figura 4.1: Imagens de placas com inóculo de 5 h (A) e após cultivo de 20 h (B) com coloração de Gram.

A diferença da coloração entre 5 e 20 h de cultivo deve-se ao aumento de acúmulo de grânulos de biopolímero no interior da célula, utilizado como reserva de energia, o que deixa a bactéria com maior largura. Na imagem (a) a taxa de divisão celular está muito alta de forma que vemos as células muito próximas umas das outras. Desta forma, como os nutrientes estão sendo usados para a divisão celular, ainda não há acúmulo de polímero no interior da célula e vemos um tom azul escuro típico da parede celular Gram-positiva. Na imagem (b), a divisão celular está chegando numa fase estacionária, por isso notamos as células mais distantes umas das outras e já com grânulos de polímero no seu interior, ocasionando coloração mais rosada e o formato mais arredondado dos *Bacillus*.

Após os cultivos foram realizadas a liofilização e a homogeneização da biomassa e por fim a quantificação do P(3HB) no interior das células. Esta quantificação foi realizada de acordo com a metodologia descrita na Seção 3.3.

Para cada propanólise realizada a fim de quantificar o biopolímero foi realizada uma curva de calibração usando P(3HB) comercial, para com a equação obtida pela linha de tendência desta curva calcular o valor em gramas de polímero. Uma das curvas padrões obtidas é mostrada na Figura 4.2 como exemplo. Todas as curvas obtiveram equações com o coeficiente de determinação (R^2) com aproximadamente o mesmo valor do exemplo.

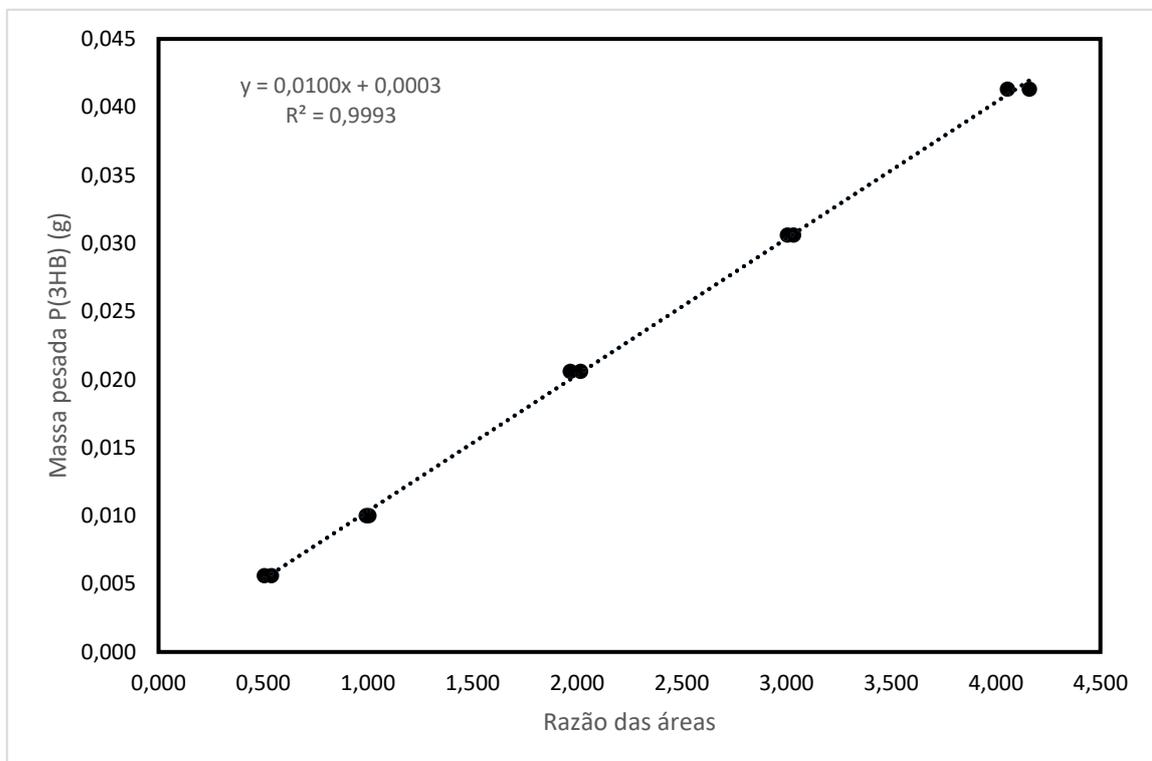


Figura 4.2: Curva de calibração para determinação da quantidade de polímero.

Como resultados desta quantificação, o percentual de P(3HB) intracelular na biomassa de *Bacillus megaterium* homogeneizada produzida a partir do soro de leite foi de $40,3 \pm 0,8$ %. E o percentual de P(3HB) existente na biomassa de *B. megaterium* homogeneizada produzida a partir de sacarose e sulfato de amônio foi de $50,2 \pm 0,4$ %.

4.2. Testes preliminares

Os primeiros experimentos realizados avaliaram as condições de pH e temperatura para as enzimas sob o substrato em questão – parede celular de *B. megaterium*. A faixa de trabalho de cada uma das enzimas para pH e temperatura foi testada de acordo com as informações obtidas na literatura.

A avaliação de eficiência destes experimentos foi realizada de acordo com o percentual de pureza do produto final (Y) e o respectivo desvio padrão. Todos os experimentos preliminares foram realizados em duplicata. Para os testes variando as condições operacionais o tempo da etapa de digestão enzimática foi de 4 h e a concentração enzimática de 5 %.

Na Tabela 4.1 são apresentados os dados de pH, temperatura e Y, dos primeiros experimentos realizados neste trabalho, de forma a avaliar a eficiência das enzimas em preparações líquidas em diferentes condições de trabalho. Em negrito estão as condições com maior eficiência. As células utilizadas nestes testes foram as obtidas a partir do cultivo com soro de leite com percentual de polímero de $40,3 \pm 0,8$ % na biomassa.

Analisando a Tabela 4.1, notamos que as enzimas Pectinex, Viscozyme e Saczyme Yield não obtiveram um biopolímero com bom percentual de pureza e este sendo muito próximo da biomassa utilizada ($40,3 \pm 0,8$ %). Com esta análise, novos experimentos foram realizados com estas três enzimas aumentando a concentração enzimática de 5 % para 20 % ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ enzima por biomassa). Na Tabela 4.2 são apresentados os dados destes experimentos que avaliaram se com maior concentração de enzima no meio haveria diferença na eficiência do processo.

Tabela 4.1: Experimentos preliminares com as enzimas em preparações líquidas avaliando a eficiência da digestão enzimática no percentual de pureza do biopolímero para diferentes condições de pH e temperatura.

Enzima	pH	Temperatura (°C)	Pureza P(3HB) (%) (média ± desvio padrão)
Alcalase	6,5	65	60,5 ± 0,9
	6,5	70	50,1 ± 0,5
	6,5	55	57,4 ± 1,4
	7,0	65	57,9 ± 1,0
	7,0	60	59,3 ± 1,2
Neutrase	7,0	55	59,2 ± 1,0
	7,0	45	53,5 ± 0,8
	6,5	60	50,6 ± 1,3
	6,5	50	58,5 ± 1,5
Pectinex	4,5	45	46,1 ± 1,2
	4,5	55	43,3 ± 0,8
	4,5	45	40,9 ± 1,1
Viscozyme	6,5	60	39,6 ± 1,6
	4,5	50	45,2 ± 1,0
	4,5	45	42,6 ± 0,9
Saczyme Yield	4,5	55	40,3 ± 1,2
	6,5	60	38,3 ± 1,9
	6,5	55	40,0 ± 0,3
Saczyme Yield	4,5	55	41,2 ± 0,8
	4,5	45	43,0 ± 0,4
	4,5	65	40,4 ± 0,7

Tabela 4.2: Experimentos preliminares com as enzimas Pectinex, Viscozyme e Saczyme avaliando a eficiência da digestão enzimática no percentual de pureza do biopolímero com concentração enzimática de 20 %.

Enzima	pH	Temperatura (°C)	Pureza P(3HB) (%) (média ± desvio padrão)
Pectinex	4,5	45	44,3 ± 1,4
Viscozyme	4,5	50	43,2 ± 1,6
Saczyme Yield	4,5	45	42,0 ± 1,3

Este percentual (20 %) foi escolhido para verificar se haveria alguma mudança significativa na eficiência das enzimas na digestão, o que não foi observado na prática (Tab. 4.2).

Na Tabela 4.3 são apresentados os dados dos experimentos preliminares que avaliaram a eficiência das enzimas Pancreatina, Papaína e Bromelina em diferentes condições de trabalho.

Nos experimentos complementares com as enzimas Alcalase e Neutrase, foram testados apenas uma condição de pH e temperatura para cada uma. Isto porque outras condições já haviam sido testadas com as células produzidas com soro de leite. Desta forma estes experimentos complementares foram realizados apenas para essas duas enzimas que apresentaram melhor desempenho nos experimentos preliminares (Tabela 4.1).

As células de *B. megaterium* que foram utilizadas nestes testes tinham $50,2 \pm 0,4$ % de P(3HB) no seu interior.

Tabela 4.3: Experimentos preliminares com as enzimas avaliando a eficiência da digestão enzimática no percentual de pureza do biopolímero para diferentes condições de pH e temperatura.

Enzima	pH	Temperatura (°C)	Pureza P(3HB) (%) (média \pm desvio padrão)
Bromelina	6,0	50	61,8 \pm 1,2
	5,0	40	58,6 \pm 2,1
Papaína	6,0	45	63,2 \pm 0,9
	5,0	40	60,8 \pm 1,1
Pancreatina	7,0	40	70,7 \pm 1,0
	8,0	50	66,8 \pm 0,8
	8,0	40	68,2 \pm 0,7
Alcalase	6,5	50	65,9 \pm 1,1
Neutrase	6,5	55	65,1 \pm 0,8

Na Tabela 4.4 são apresentadas as condições de pH e de temperatura selecionadas para cada enzima de preparação líquida para realização dos testes de tempo de contato enzimático (3, 6, 9 e 12 h), apresentados na Figura 4.3.

Tabela 4.4: Enzimas e suas respectivas condições de pH e temperatura, avaliadas nos testes de tempo de contato enzimático.

Enzima	pH	Temperatura (°C)
Alcalase	6,5	65
Neutrase	7,0	55
Pectinex	4,5	45
Viscozyme	4,5	50
Saczyme Yield	4,5	45

Na Figura 4.3 são apresentados os dados de recuperação das enzimas de preparo líquido para os tempos 3, 6, 9 e 12 horas. Destes testes preliminares foi possível observar que a enzima Saczyme Yield não apresentou diferença significativa de quantidade de biopolímero no meio em relação ao da biomassa celular inicial, permanecendo em aproximadamente 40 %. Além disso, apesar de os polímeros obtidos após contato com as enzimas líquidas Pectinex e Viscozyme tenham apresentado uma pureza de até 45 % em 12 horas, o erro experimental envolvido e o tempo muito longo de contato fizeram com que estas enzimas também fossem descartadas para os passos seguintes juntamente com a enzima Saczyme.

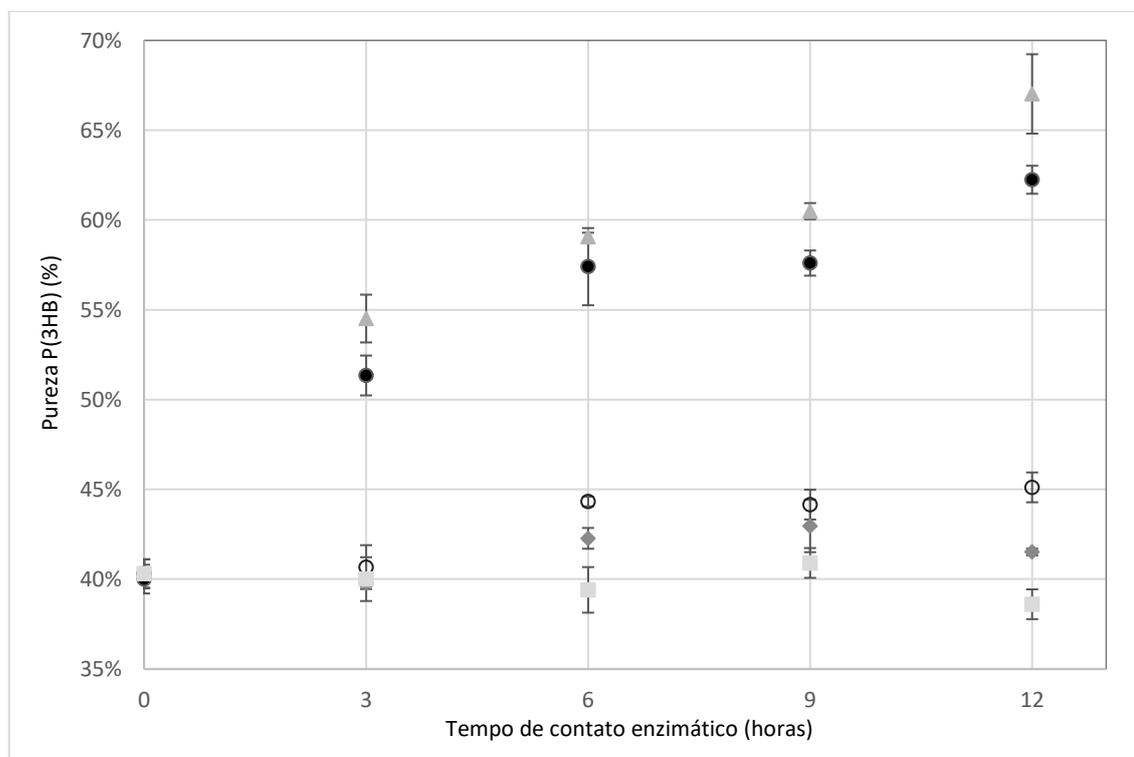


Figura 4.3: Gráfico do percentual de pureza de P(3HB) recuperado após reação enzimática de 3, 6, 9 e 12 horas das enzimas líquidas: Alcalase (●), Neutrase (▲), Pectinex (◆), Viscozyme (○) e Saczyme Yield (■).

Analisando os primeiros experimentos, selecionando as enzimas Alcalase e Neutrase por apresentarem maior eficiência dentre as enzimas de preparo líquido, foram realizados experimentos de até 9 horas com estas e com as enzimas em pó, Bromelina, Papaína e Pancreatina. As células utilizadas nestes experimentos foram as obtidas pelo cultivo com sacarose com percentual de polímero de $50,2 \pm 0,4$ % na biomassa final.

Na Tabela 4.5 são apresentadas as condições de pH e de temperatura dos experimentos de recuperação enzimática por tempo de contato apresentados na Figura 4.4. Com base no teste t, foi observado que entre 6 e 9 horas não houve uma variação significativa no percentual de pureza de P(3HB) recuperado. Desta análise, escolheu-se o tempo de 6 horas de contato enzimático para os testes do planejamento BBD, além de considerar um tempo menor de contato enzimático mais atrativo financeiramente para uma ampliação de escala.

Tabela 4.5: Enzimas e suas respectivas condições de pH e temperatura, avaliadas nos testes de até 9 horas de contato enzimático.

Enzima	pH	Temperatura (°C)
Alcalase	6,5	65
Neutrase	7,0	55
Bromelina	6,0	50
Papaína	6,0	45
Pancreatina	7,0	40

Na Figura 4.4 são apresentados os dados dos experimentos de 3, 6 e 9 h para as proteases, nas condições operacionais indicadas na Tabela 4.5.

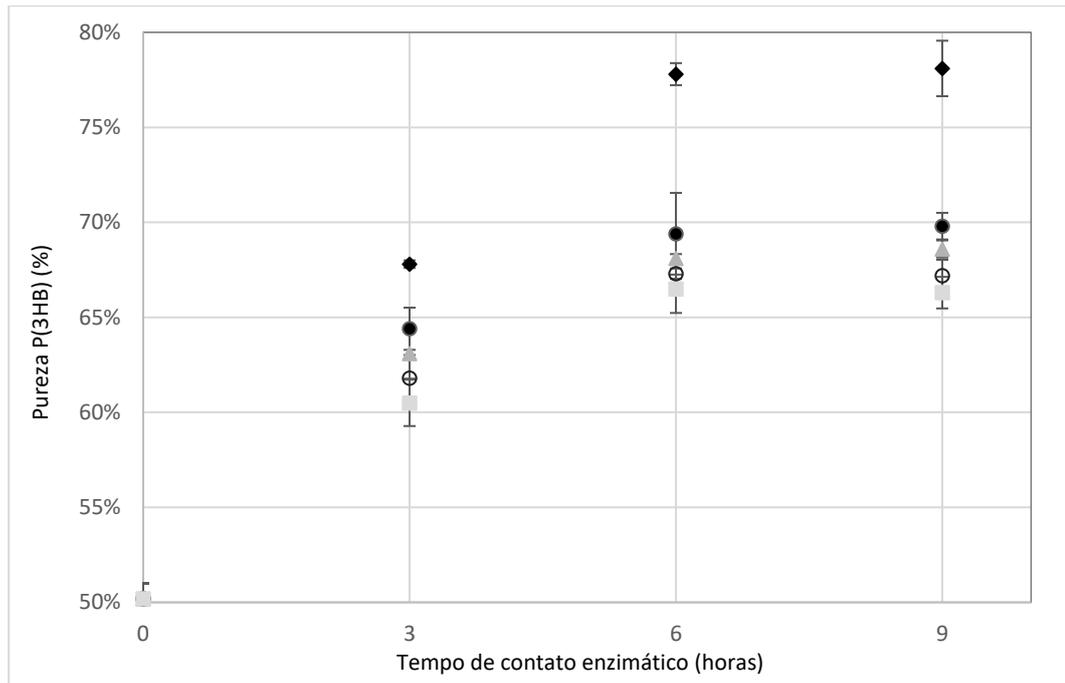


Figura 4.4: Gráfico do percentual de pureza de P(3HB) recuperado após reação enzimática de 3, 6 e 9 horas das enzimas líquidas: Alcalase (●), Neutrase (▲), Pancreatina (◆), Papaína (○) e Bromelina (■).

Podemos observar que todas apresentaram uma boa eficiência no processo de digestão celular obtendo P(3HB) com percentuais de pureza maiores que o da biomassa utilizada. Também é observado na Fig. 4.4 que a enzima Pancreatina obteve o biopolímero com o maior percentual de pureza entre as proteases nestes experimentos em todos os tempos de contato testados (3, 6 e 9 h).

Avaliando os testes realizados nesta seção, foi possível selecionar, conforme o desempenho obtido, 5 das 8 enzimas estudadas para realizar o planejamento fatorial escolhido: Alcalase, Neutrase, Bromelina, Papaína e Pancreatina. A eficiência destas proteases se deve – provavelmente – à sua especificidade, atuando diretamente na camada de peptidoglicano, como também em outras proteínas celulares, que constituem a maior parte da biomassa (Copeland, 2000a; Kapritchkoff *et al.*, 2006; Tortora *et al.*, 2012).

As outras três enzimas apresentaram baixa eficiência possivelmente não agirem diretamente na camada de peptidoglicano (ligações NAG-NAM). Desta forma, as três enzimas, Pectinex, Viscozyme e Saczyme não foram testadas no planejamento fatorial.

4.3. Planejamento experimental de recuperação enzimática de P(3HB)

Após a realização dos experimentos preliminares foi possível selecionar as 5 proteases para a realização do planejamento experimental a fim de encontrar as condições operacionais ótimas para estas enzimas. Além disso o tempo de contato para a etapa de digestão enzimática também foi determinada nestes experimentos, sendo 6 horas o escolhido.

A partir dos conjuntos de experimentos realizados segundo BBD (Tabela 3.6), a eficiência das cinco enzimas escolhidas para o estudo da solubilização das células de *B. megaterium* foi avaliada em termos de recuperação de P(3HB) após o contato enzimático.

Na Tabela 4.6 são apresentados os resultados experimentais obtidos a partir do planejamento fatorial BBD. O valor de Y (Eq. 2) é o percentual de pureza do biopolímero recuperado após as 6 horas de contato enzimático, com as condições de pH, temperatura e concentração de enzima, definidas de acordo com o planejamento.

O valor de S_N apresentado na Tabela 4.6 é a massa de material celular solubilizado, ou seja, tudo aquilo que não é polimérico e que a enzima digeriu durante o experimento (Eq. 3). Esta variável está diretamente correlacionada ao valor de Y , portanto quanto maior a pureza do P(3HB) obtido, maior será o percentual de material celular solubilizado pela enzima.

Na Tabela 4.6 são apresentados os dados para as 5 enzimas.

Nesta tabela podemos observar que a Pancreatina atingiu os maiores valores de pureza de P(3HB) (Y) na faixa de 80 a 85 %, com valor médio de Y para os 16 experimentos de 77 %, e com o percentual de material celular solubilizado (S_N) na faixa de 60 a 70 %. Estes valores como estão correlacionados apresentam comportamentos similares, sendo que quanto maior o percentual de Y maior será o percentual de S_N .

Para as enzimas Alcalase, Neutrase, Papaína e Bromelina, o percentual médio de Y obtido e S_N foi de 73 % e 47 %, 73 % e 46 %, 72 % e 44 %, e 68 % e 36 %, respectivamente.

Desta análise, as preparações enzimáticas, independente da concentração utilizada, resultaram na seguinte ordem crescente de eficiência na solubilização das células e maior percentual de pureza do polímero: Bromelina < Papaína < Neutrase < Alcalase < Pancreatina.

Tabela 4.6: Valores de Y e S_N obtidos para cada enzima nos experimentos definidos na Tabela 3.6. Os subíndices “pc”, “alc”, “neu”, “pap” e “bro” indicam resultados referentes, respectivamente a pancreatina, alcalase, neutrase, papaína e bromelina.

Experimento	Y_{pc}	S_N_{pc}	Y_{alc}	S_N_{alc}	Y_{neu}	S_N_{neu}	Y_{pap}	S_N_{pap}	Y_{bro}	S_N_{bro}
1	76 %	52 %	72 %	44 %	73 %	46 %	69 %	38 %	70 %	40 %
2	75 %	50 %	70 %	40 %	67 %	34 %	65 %	30 %	61 %	22 %
3	74 %	48 %	80 %	60 %	72 %	44 %	67 %	34 %	73 %	46 %
4	70 %	40 %	73 %	46 %	72 %	44 %	67 %	34 %	72 %	44 %
5	72 %	44 %	76 %	52 %	76 %	52 %	74 %	48 %	66 %	32 %
6	77 %	54 %	74 %	48 %	72 %	44 %	70 %	40 %	62 %	24 %
7	80 %	60 %	77 %	54 %	75 %	50 %	73 %	46 %	73 %	46 %
8	77 %	54 %	74 %	48 %	70 %	40 %	74 %	48 %	63 %	26 %
9	82 %	64 %	68 %	36 %	76 %	52 %	69 %	38 %	63 %	26 %
10	73 %	46 %	78 %	56 %	72 %	44 %	73 %	46 %	71 %	42 %
11	85 %	70 %	61 %	22 %	72 %	44 %	75 %	50 %	63 %	26 %
12	72 %	44 %	73 %	46 %	74 %	48 %	69 %	38 %	79 %	58 %
13	79 %	58 %	75 %	50 %	73 %	46 %	76 %	52 %	67 %	34 %
14	80 %	60 %	75 %	50 %	74 %	48 %	75 %	50 %	67 %	34 %
15	81 %	62 %	74 %	48 %	73 %	46 %	77 %	54 %	67 %	34 %
16	80 %	60 %	75 %	50 %	73 %	46 %	75 %	50 %	68 %	36 %

Na Tabela 4.7 estão apresentados os coeficientes dos modelos matemáticos estimados pelo software *Statistica 10* para cada uma das enzimas testadas. Os coeficientes estatisticamente significativos foram destacados em negrito. Todos os dados foram avaliados de forma normalizada a fim de comparar os efeitos na mesma ordem de grandeza.

Tabela 4.7: Coeficientes dos modelos matemáticos estimados pelo software Statistica 10, para as 5 enzimas utilizadas no planejamento fatorial BBD.

Fatores	Parâmetros Pancreatina	Parâmetros Alcalase	Parâmetros Neutrase	Parâmetros Papaína	Parâmetros Bromelina
Intercepto	0,7620	0,7299	0,7262	0,7039	0,0679
x_1	-0,0045	-0,0344	-0,0396	-0,0151	-0,0629
x_1^2	0,0372	-0,0207	0,0105	0,0378	0,0051
x_2	-0,0724	0,0830	0,0069	-0,0059	0,0971
x_2^2	0,0222	0,0312	0,01235	0,0507	-0,0207
x_3	0,0265	-0,0302	-0,0107	0,0112	0,0397
x_3^2	-0,0047	0,0166	-0,0140	-0,0066	0,0085
$x_1 x_2$	-0,0121	-0,0237	0,0268	0,0204	0,0429
$x_1 x_3$	-0,0412	-0,0052	-0,00237	0,0253	-0,0264
$x_2 x_3$	-0,0176	0,0065	0,0310	-0,0535	0,0414
R^2	0,852	0,877	0,946	0,891	0,953

A partir das conclusões obtidas analisando a Tabela 4.6, em que a Pancreatina foi a enzima com maior eficiência no processo de digestão celular enzimática, serão debatidos aqui outras análises realizadas para esta enzima e o modelo gerado a partir do planejamento Box Behnken.

O gráfico da probabilidade normal (Q-Q plot), Figura 4.5, permite a inspeção da normalidade por meio da comparação entre a frequência acumulada dos resíduos padronizados e a curva normal para a variável resposta. Podemos observar indícios de que os erros são normalmente distribuídos, pois a maioria dos pontos está localizada de forma aproximada ao longo da reta, demonstrando a confiabilidade dos pontos experimentais obtidos. Resultados similares foram obtidos para demais enzimas (Apêndice 2).

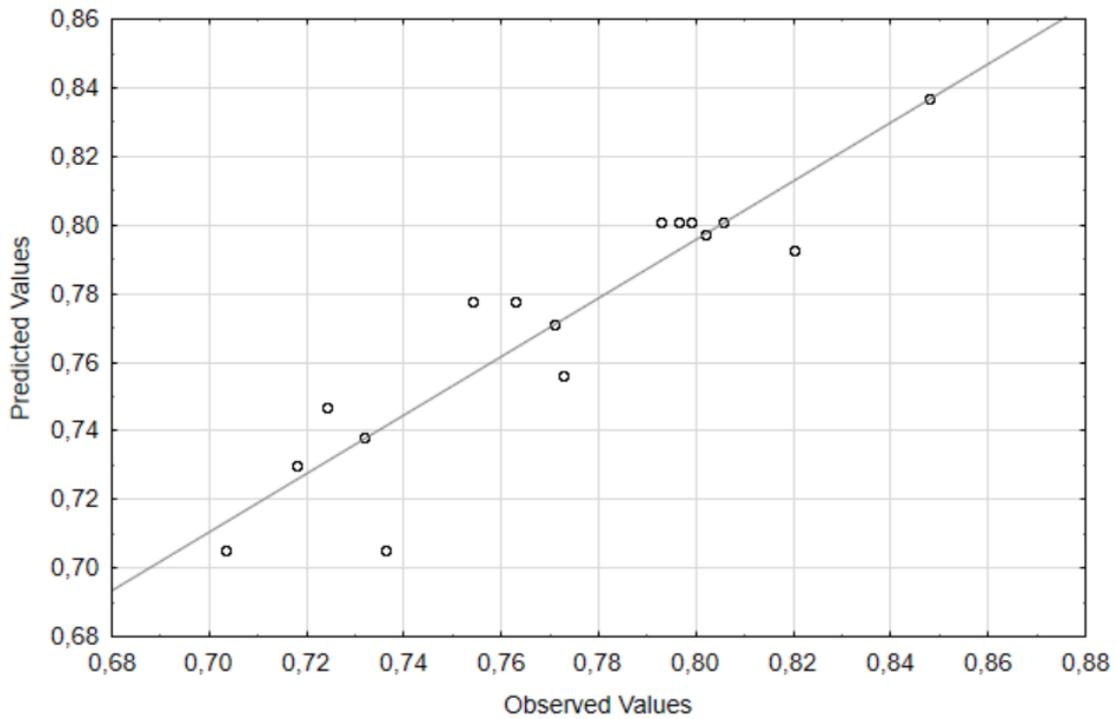


Figura 4.5: Gráfico de probabilidade normal dos resíduos para a variável de resposta recuperação de P(3HB) para Pancreatina.

Podemos observar na Figura 4.6 que os resíduos estão distribuídos aleatoriamente demonstrando que não há um erro sistemático no modelo e que este descreve adequadamente o sistema. Resultados similares foram obtidos para demais enzimas (Apêndice 2).

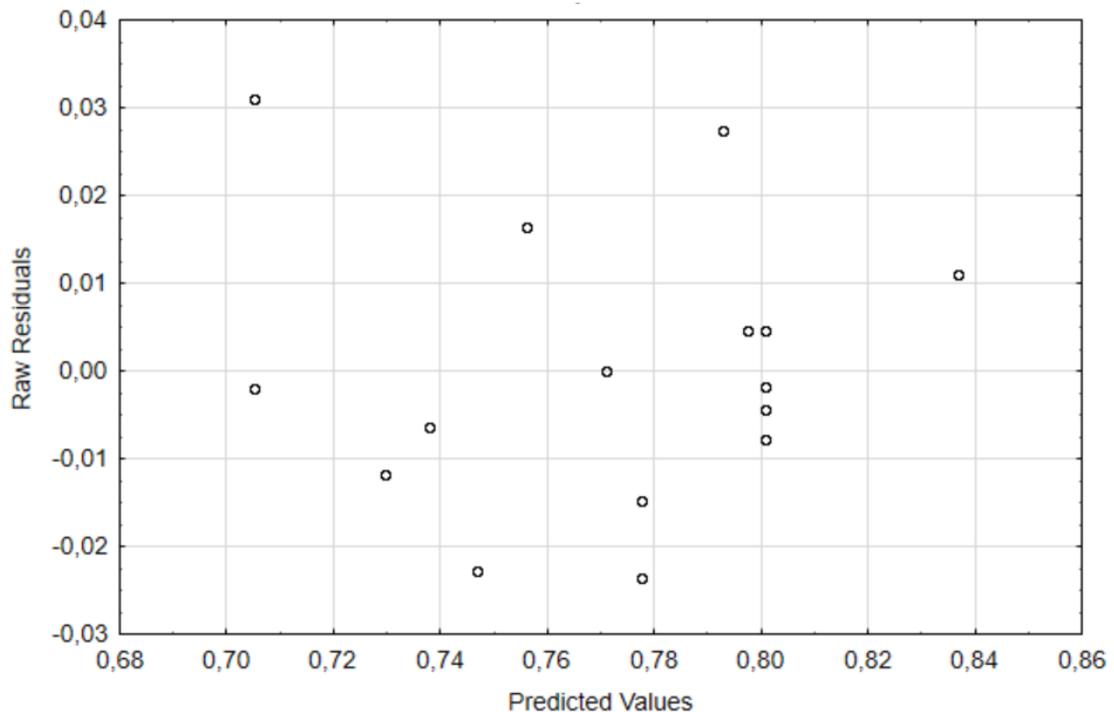


Figura 4.6: Gráfico dos resíduos versus valores preditos para a variável de resposta recuperação de P(3HB) para Pancreatina.

Na Tabela 4.8 são apresentados os coeficientes do modelo matemático estimados pelo software *Statistica 10*, bem como o erro padrão dos coeficientes, os respectivos valores de t de *Student*, as significâncias de cada coeficiente da regressão através do valor p e os limites de confiança (95 %). Os coeficientes estatisticamente significativos foram destacados em negrito. Estes dados pertencem à enzima Pancreatina.

Tabela 4.8: Coeficientes da regressão linear, desvio padrão destes, valores de t e probabilidade estatística p dos coeficientes do modelo e seus intervalos de confiança referente à Y – percentual de pureza de P(3HB) recuperado via Pancreatina.

Fatores	Efeito	Erro padrão	Valor t	Valor p	Limite confiança inferior	Limite de confiança superior
Intercepto	0,7620	0,0015	500,6824	0,0000	0,7572	0,7669
x ₁	-0,0045	0,0037	-1,2186	0,3101	-0,0164	0,0073
x ₁ ²	0,0372	0,0026	14,1284	0,0008	0,0289	0,0456
x ₂	-0,0724	0,0037	-19,4193	0,0003	-0,0843	-0,0605
x ₂ ²	0,0222	0,0026	8,4090	0,0035	0,0138	0,0306
x ₃	0,0265	0,0037	7,0987	0,0058	0,0146	0,0383
x ₃ ²	-0,0047	0,0026	-1,7686	0,1751	-0,0131	0,0037
x ₁ x ₂	-0,0121	0,0053	-2,2909	0,1059	-0,0289	0,0047
x ₁ x ₃	-0,0412	0,0053	-7,8206	0,0044	-0,0580	-0,0245
x ₂ x ₃	-0,0176	0,0053	-3,3357	0,0445	-0,0344	-0,0008

Para a Pancreatina, o modelo final obtido, utilizando somente os coeficientes estatisticamente significativos destacados na Tabela 4.7, foi capaz de explicar cerca de 85,2 % ($R^2 = 0,852$) da recuperação de P(3HB) por digestão celular. Dos valores destacados (em negrito) podemos concluir que as três variáveis independentes foram consideradas estatisticamente significativas nos termos lineares ou quadráticos para a recuperação de P(3HB) para esta enzima. Para a temperatura (x_2) o termo linear se destacou dentre as demais variáveis como a de maior efeito, influenciando de forma inversa (valor negativo do coeficiente), ou seja, quanto maior, menor a eficiência do processo. Para reações enzimáticas uma elevação da temperatura geralmente acima da temperatura ótima, reduz drasticamente a velocidade da reação. Isto se deve à desnaturação seguida da desativação da enzima. A desnaturação de uma enzima modifica o arranjo dos aminoácidos no sítio ativo, alterando sua forma e causando a perda da atividade enzimática (Tortora *et al.*, 2012).

A enzima Pancreatina é produzida pelo pâncreas humano, bovino ou porcino e é utilizada

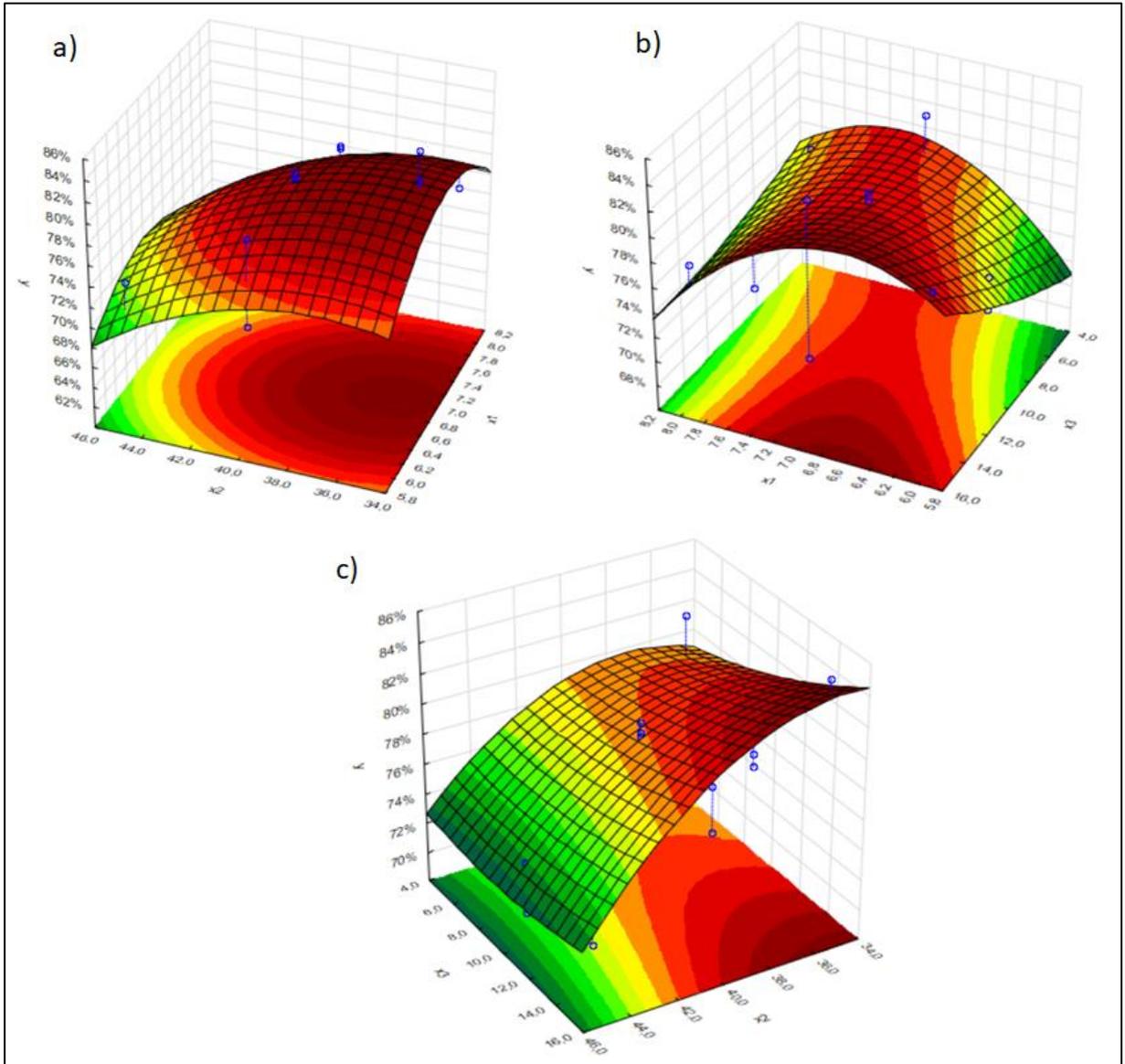
na faixa de 37 a 40 °C, que é a variação de temperatura corporal destes que a produzem. Sendo assim, o valor negativo do coeficiente da variável x_2 indica que temperaturas acima de 40 °C já teriam perda de atividade desta enzima, diminuindo assim a eficiência da reação.

Para a enzima Papaína a concentração enzimática (x_3), dentro da faixa testada, não apresentou efeito estatisticamente significativo, nem linear nem quadrático. Este fato pode ter como justificativa diversas situações, tais como a diminuição da concentração de ligações disponíveis para clivagem devido inibição do sítio ativo por algum substrato presente no meio ou formado durante a reação, ou ainda a diminuição da atividade enzimática, devido à desnaturação da enzima. Vale salientar que a estabilidade de uma enzima é dependente do tempo, podendo para a papaína o tempo de 6 horas afetar sua atividade enzimática.

O modelo final obtido com os termos que foram estatisticamente significativos foi capaz de explicar cerca de 87,7 % para a Alcalase, 94,6 % para Neutrase, 89,1 % para a Papaína e 95,3 % para a Bromelina (valores de R^2) da recuperação de P(3HB) pela digestão celular com cada enzima.

Para auxiliar na visualização da região ótima das condições de cada enzima, dentro da faixa estudada, são apresentadas as superfícies de resposta (MSR), Figuras 4.7, 4.8 e 4.9, geradas no Statistica para o percentual de pureza de P(3HB) recuperado a partir do modelo proposto para a enzima Pancreatina. As MSR expressam a interação entre duas variáveis independentes sobre a resposta, com a terceira variável mantida no ponto central do planejamento. As superfícies de resposta geradas para as outras quatro enzimas deste trabalho encontram-se no Apêndice 2. A análise das Figuras 4.7, 4.8 e 4.9 mostra que os valores ótimo de pH (x_1), temperatura (x_2) e concentração enzimática (x_3) são de aproximadamente 7,0, 37 °C e 16 %, respectivamente.

Avaliando experimentalmente por varredura da concentração enzimática, este parâmetro ótimo para a Pancreatina se encontra dentro da faixa de 8 – 10 %.



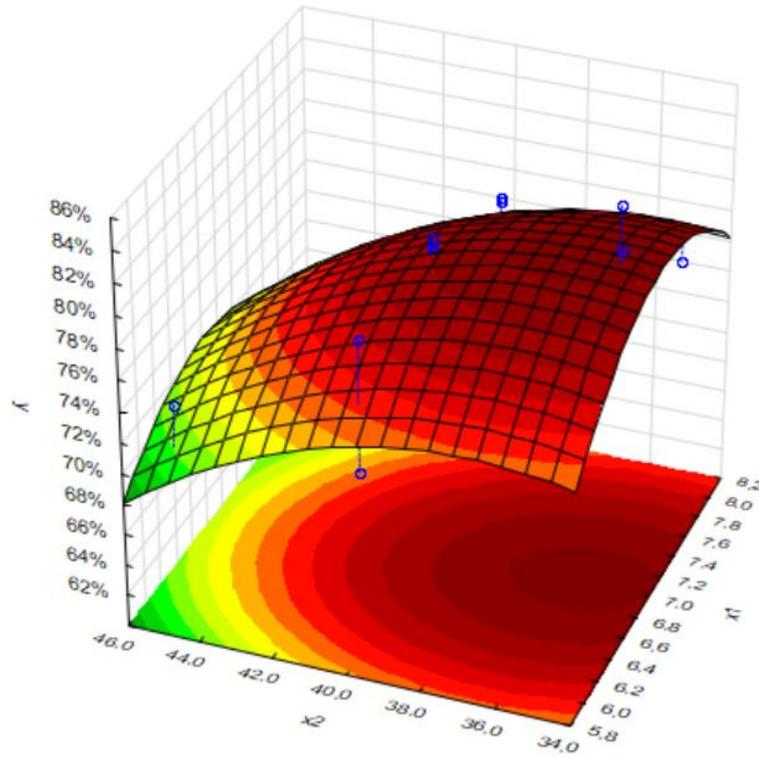


Figura 4.7: Superfície de resposta gerada para x_1 , x_2 e Y para a Pancreatina.

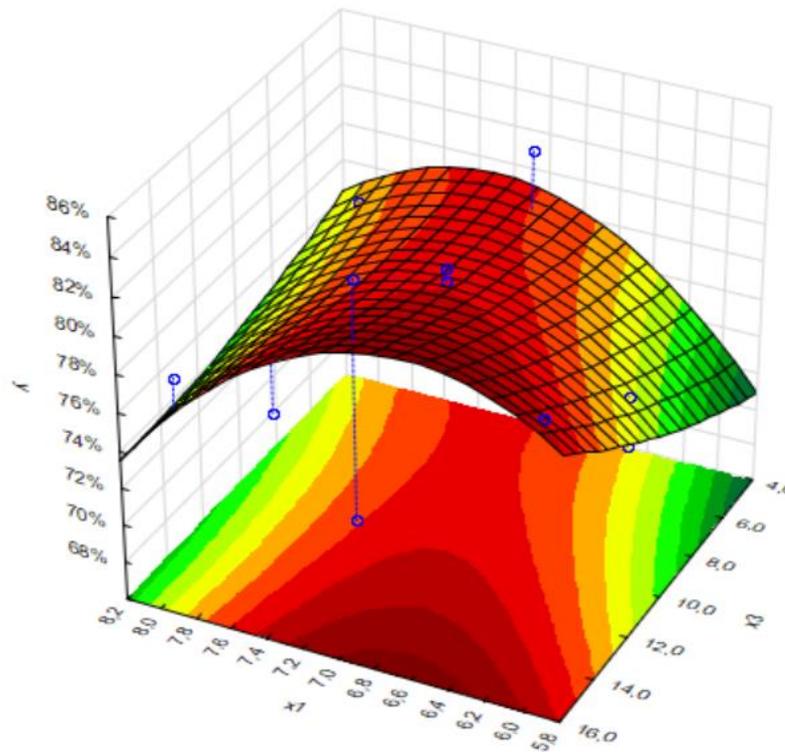


Figura 4.8: Superfície de resposta gerada para x_1 , x_3 e Y para a enzima Pancreatina.

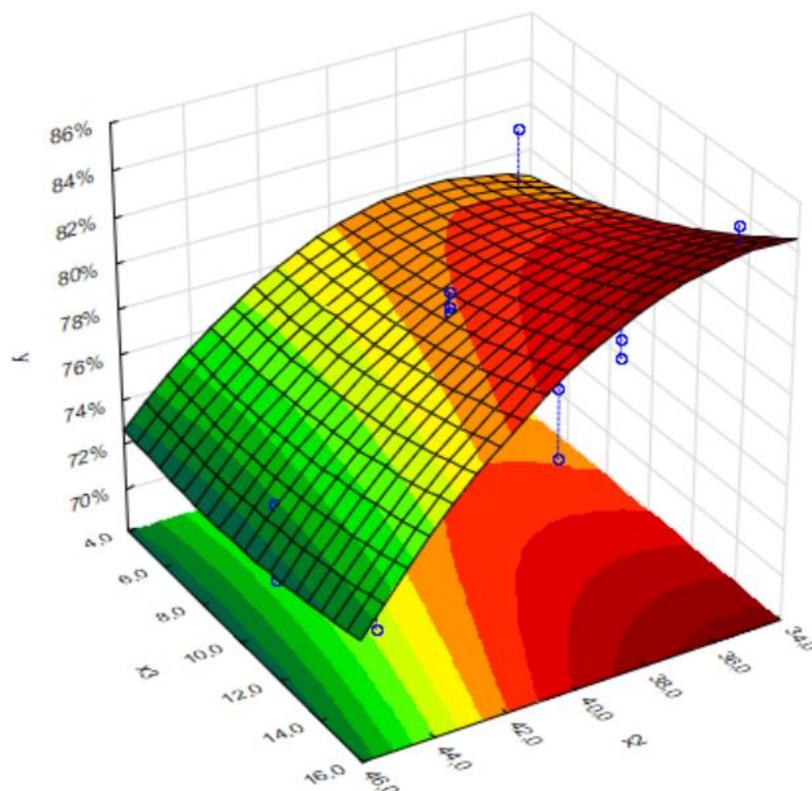


Figura 4.9: Superfície de resposta gerada para x_2 , x_3 e Y para a enzima Pancreatina.

As condições ótimas encontradas a partir do modelo estatístico e das superfícies de resposta geradas para cada enzima encontram-se na Tabela 4.8.

Tabela 4.9: Condições ótimas de acordo com o modelo estatístico para cada enzima gerado a partir dos experimentos *Box Behnken Design*.

Enzimas	pH	Temperatura (°C)	Concentração enzimática (%)
Pancreatina	7,3	37	8
Alcalase	7,5	60	10
Neutrase	6,0	52	15
Papaína	5,8	50	10
Bromelina	6,0	43	15

As condições ótimas que resultaram dos testes do planejamento fatorial para cada enzima encontram-se dentro das faixas encontradas no estudo da literatura. Para a Pancreatina as condições de pH e temperatura coincidiram com o que era esperado, visto que o pH do suco pancreático fica entre 7,0 e 8,0 e a temperatura corporal dos animais varia de 37 a 40 °C.

Comparando as condições ótimas da Tabela 4.8 com o estudo de Kapritchkoff *et al.*

(2006) podemos notar pequenas variações. Isto pode ser explicado pelo fato destes autores terem utilizado um microrganismo de diferente gênero, a *Ralstonia eutropha*, que é uma Gram-negativa. Além disso, os valores ótimos reportados por Kapritchkoff *et al.* (2006) eram em realidade a melhor condição encontrada entre as condições pontuais de pH e temperatura testadas por estes autores, não sendo o resultado de um modelo de interpolação na região experimental, como acontece no presente trabalho. Em relação ao ótimo de pureza de biopolímero, Kapritchkoff *et al.* (2006) consideraram a pancreatina como melhor desempenho e custo-benefício, chegando em 90,3 % de pureza com 8 horas de contato enzimático e 2 % de enzima no meio. Vale salientar que os autores realizaram um pré-tratamento térmico na biomassa celular a fim de fragilizar a parede celular e facilitar a digestão enzimática.

Na Figura 4.10 podemos observar o aspecto visual de duas amostras de biopolímero obtidas após o contato enzimático de 6 horas e após a etapa de secagem, uma com digestão com Pancreatina (a), com pureza de aproximadamente 80 %, e outra com Papaína (b), com pureza em torno de 65 %. No biopolímero de menor percentual de pureza podemos notar uma coloração mais marrom, característica da biomassa residual.

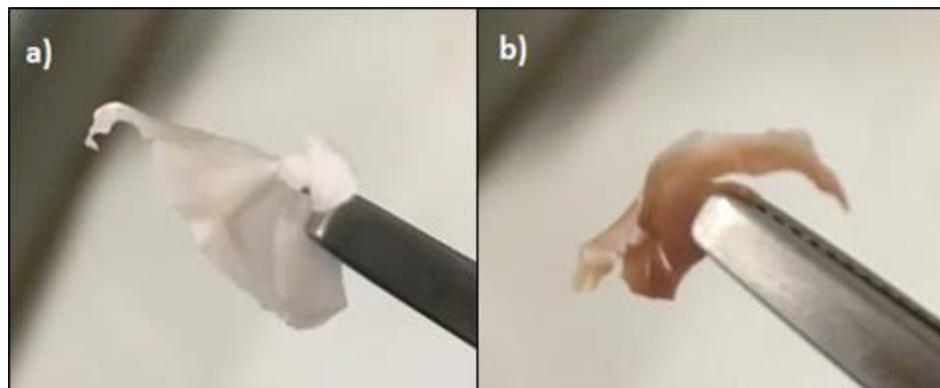


Figura 4.10: Filme de biopolímero após contato enzimático após processo de secagem, em (a) contato com Pancreatina e em (b) com Papaína.

Também foram realizados experimentos para varredura da concentração enzimática para a enzima Pancreatina. Nas condições ótimas de pH (7,3) e temperatura (37 °C) foram testadas quatro diferentes concentrações enzimáticas (4, 8, 10 e 15 %), conforme mostra a Tabela 4.10.

Analisando os dados da Tabela 4.10, para 8 % de enzima por biomassa, o percentual de polímero foi de aproximadamente 76 %, o qual se encontra dentro do intervalo de confiança de 74 a 78 %. Para 10 % de concentração enzimática o valor de pureza obtido foi 77 %, com intervalo de confiança na faixa de 76 a 78 %. Desta maneira a concentração enzimática

considerada ótima a partir dos experimentos de varredura foi de 8 % para esta enzima.

Tabela 4.10: Experimentos de digestão enzimática para a enzima Pancreatina em diferentes concentrações, nas mesmas condições de pH (7,3) e de temperatura (37 °C).

Concentração enzimática (%)	Pureza P(3HB) (%) (média ± desvio padrão)	Limite inferior (%)	Limite superior (%)
4	65,2 ± 1,30	63,7	66,7
8	75,9 ± 1,61	74,0	77,8
10	77,4 ± 0,85	76,4	78,4
15	70,3 ± 2,10	67,8	72,8

Com relação à influência da concentração de enzima, observa-se na Tabela 4.10 um decaimento na pureza do polímero quando a concentração enzimática foi aumentada até 15 %. Para entender este efeito, cabe primeiramente lembrar que o substrato está imobilizado na forma de camada de peptidoglicano, dificultando a formação do complexo enzima-substrato e criando a possibilidade de que haja uma saturação a partir de uma determinada concentração de enzima. Assim, à medida que se aumenta a concentração de enzima, a taxa de reação pode aumentar até o ponto em que quantidades significativas da concentração total do substrato estão sendo esgotadas durante a janela de tempo do ensaio. De acordo com esta hipótese, quando a depleção do substrato se torne significativa, aumentos adicionais na concentração de enzima não ocasionarão mudanças acentuada na taxa de reação.

Outro fenômeno que pode levar ao comportamento observado na taxa de reação é produção de moléculas inibidoras como subprodutos da reação enzimática, as quais podem interferir na dinâmica de formação/ruptura das interações enzima-substrato. Substâncias inibidoras podem formar complexos reversíveis e irreversíveis, sendo que muitas vezes a taxa de reação é determinada pela duração da interação reversível enzima-inibidor (Copeland, 2000b; Tortora *et al.*, 2012).

Outras causas potenciais para este efeito são a possibilidade de inibição e limitação na disponibilidade de um ativador ou cofator de enzima. Alguns inibidores, que podem estar na forma de proteínas e peptídeos, normalmente funcionam em classes de proteases com ação semelhante de redução de taxa. Com relação ao cofator, no caso de a enzima em estudo requerer um cofator dissociável para a atividade completa, a concentração de enzima livre dependerá da concentração de cofator livre e do complexo enzima-cofator.

Cabe ainda mencionar que o percentual de pureza do P(3HB) obtido no presente trabalho, mesmo utilizando apenas a digestão enzimática e para uma bactéria Gram-positiva, é da mesma ordem que o valor de 71 % de pureza obtido por Suzuki *et al.* (2008), sendo que estes autores usaram tratamento combinado SDS e digestão enzimática da bactéria Gram-negativa *Burkholderia cepacia IPT 64* com a enzima Esperase a 2 % de concentração ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ enzima por biomassa). Também utilizando métodos combinados com SDS, EDTA e digestão enzimática, os autores Yasotha *et al.* (2006) que utilizaram a Gram-negativa *Pseudomonas putida*, com as enzimas Alcalase e Lisozima, obtendo o biopolímero com purezas em torno de 90 %. Embora o percentual de pureza seja maior que o encontrado neste trabalho, para algumas aplicações (por exemplo, na área médica) este polímero iria necessitar de uma etapa adicional de purificação.

Além destes, podemos mencionar o trabalho dos autores Kapritchkoff *et al.* (2006) que utilizaram a Gram-negativa *Ralstonia eutropha* e obtiveram purezas próximas de 90 % com a digestão enzimática utilizando a Pancreatina. Esta pureza, entretanto, foi encontrada após 8 horas de contato enzimático.

Podemos observar aqui que a diferença estrutural entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas influencia diretamente na recuperação do biopolímero. Com isso torna-se fundamental o estudo de um pré-tratamento celular para fragilizar a parede peptidoglicana e auxiliar o processo de digestão enzimática das células Gram-positivas.

4.4. Testes de pré-tratamento celular com ultrassom

Os valores de pureza e massa celular solubilizada encontrados nos experimentos envolvendo tratamento com ultrassom são apresentados na Tabela 4.11.

Dos resultados obtidos com os experimentos sem uso de enzima percebe-se que com a intensidade de 20 % (teste U20) o tratamento com ultrassom não promoveu a liberação do polímero das células, visto que a pureza obtida é da mesma ordem que a quantidade de houve biopolímero na biomassa utilizada ($50,2 \pm 0,4$ %).

No tratamento com ultrassom na intensidade de 50 % (teste U50) sem uso de enzima houve liberação do biopolímero mesmo sem a etapa de digestão enzimática, visto que a pureza encontrada no experimento foi de $70,3 \pm 1,1$ %.

Tabela 4.11: Percentual de pureza e percentual de massa celular solubilizada (S_N) do biopolímero a partir dos testes com ultrassom.

Amostra	Pureza P(3HB) (%) (média \pm desvio padrão)	S_N (%)
U20	50,6 \pm 1,9	1,2
U20-PC4	65,4 \pm 1,6	30,8
U50	70,3 \pm 1,1	40,6
U50-PC4	80,7 \pm 1,3	61,4

Os mesmos efeitos são observados ao comparar os testes com combinação de tratamento com ultrassom e digestão com a enzima Pancreatina ((U20-PC4 e U50-PC4): (i) não havendo aumento na de pureza do produto com relação ao obtido usando somente digestão enzimática com 4 % de Pancreatina (65 \pm 1,3 %) usando intensidade de 20 % (U20-PC4); a pureza do P(3HB) obtido aumento para 80,7 \pm 1,3 % no teste U50-PC4, indicando o aumento da eficiência do processo de recuperação quando o tratamento com ultrassom é realizado com 50 % de intensidade.

É importante ressaltar que este aumento de eficiência de recuperação a partir da *B. megaterium* com uso de ultrassom é da mesma ordem do obtido por Quines *et al.* (2011) na recuperação de P(3HB) a partir de células de *C. necator* com extração com carbonato de propileno (de 82 % para 92 %). Cabe ainda mencionar que Koller *et al.* (2013), usando pré-tratamento com ultrassom antes do tratamento químico de extração a partir de Gram-negativas, e avaliando o produto obtido após o ultrassom, não observaram diminuição de massa molar do produto final. No entanto, este aspecto teria que ser confirmado via análises específicas para o caso do P(3HB) obtido no teste U50-PC4.

4.5. Custo-benefício das enzimas utilizadas nos experimentos definidos de acordo ao planejamento experimental

Após realizar os experimentos de contato enzimático de acordo com o planejamento experimental escolhido e gerar os modelos estatísticos de cada enzima, uma análise de custo-benefício foi realizada para as 5 proteases utilizadas no BBD.

Para esta análise foram considerados o preço por kg de enzima, a quantidade de enzima utilizada (em gramas a partir da concentração enzimática) e a pureza de P(3HB) obtido com cada enzima. Estes fatores foram considerados para cada enzima nas suas respectivas condições ótimas de pH e temperatura apresentados na Tabela 4.8.

Para o cálculo deste custo-benefício foi utilizada a Equação 5.

$$Custo (U\$) / g_{P(3HB)} = \frac{(massa\ enzima \times valor / grama)}{Pureza \times massa_{0P(3HB)}} \times 100 \quad (5)$$

Os valores desta análise encontram-se na Tabela 4.12. Podemos observar que a Neutrase é a enzima com o menor custo por ter o menor valor por quilo de enzima, porém a de melhor custo-benefício de acordo com o cálculo realizado (Eq. 5) é a enzima Pancreatina.

Tabela 4.12: Fatores considerados no cálculo do custo-benefício para cada enzima e o custo para a produção de P(3HB).

Enzimas	Valor (U\$·kg⁻¹)	Concentração enzimática (%)	Pureza de P(3HB) (%)	Custo (U\$) / g P(3HB)
Pancreatina *2	54,76	8	81	1,05
Alcalase *1	49,50	10	75	1,20
Neutrase *1	39,76	15	74	1,10
Papaína *2	106,19	10	75	3,91
Bromelina *2	128,31	15	70	4,73

*1: Orçamento do preço do kg das enzimas realizado com a Novozymes;

*2: Orçamento do preço do kg das enzimas realizado com a Fragon;

Diferentes orçamentos foram realizados para obter os custos de kg das enzimas. Na Tabela 4.12 foram considerados os valores mais baixos encontrados para todas as enzimas, estes valores podem sofrer alterações em novos orçamentos, mas aqui todos foram realizados no mesmo dia.

Pelos valores do custo por grama de biopolímero produzido podemos observar que as enzimas Pancreatina e Neutrase possuem valores muito próximos, o que demonstra que ambas possuem potencial de aplicação. Neste trabalho com a mesma referência de custo, a Pancreatina possui um valor por kg de enzima maior do que a Neutrase, o que pode variar segundo a demanda para estas enzimas.

4.6. Testes de extração com clorofórmio

Os percentuais de pureza e de recuperação do biopolímero nos testes realizados com extração química da *B. megaterium* com o solvente clorofórmio a 60 °C estão apresentados na Figura 4.11. Os experimentos foram realizados na proporção de biomassa/solvente de 1 % (0,01 g·mL⁻¹), em duplicata e estão apresentados com o desvio padrão de cada um.

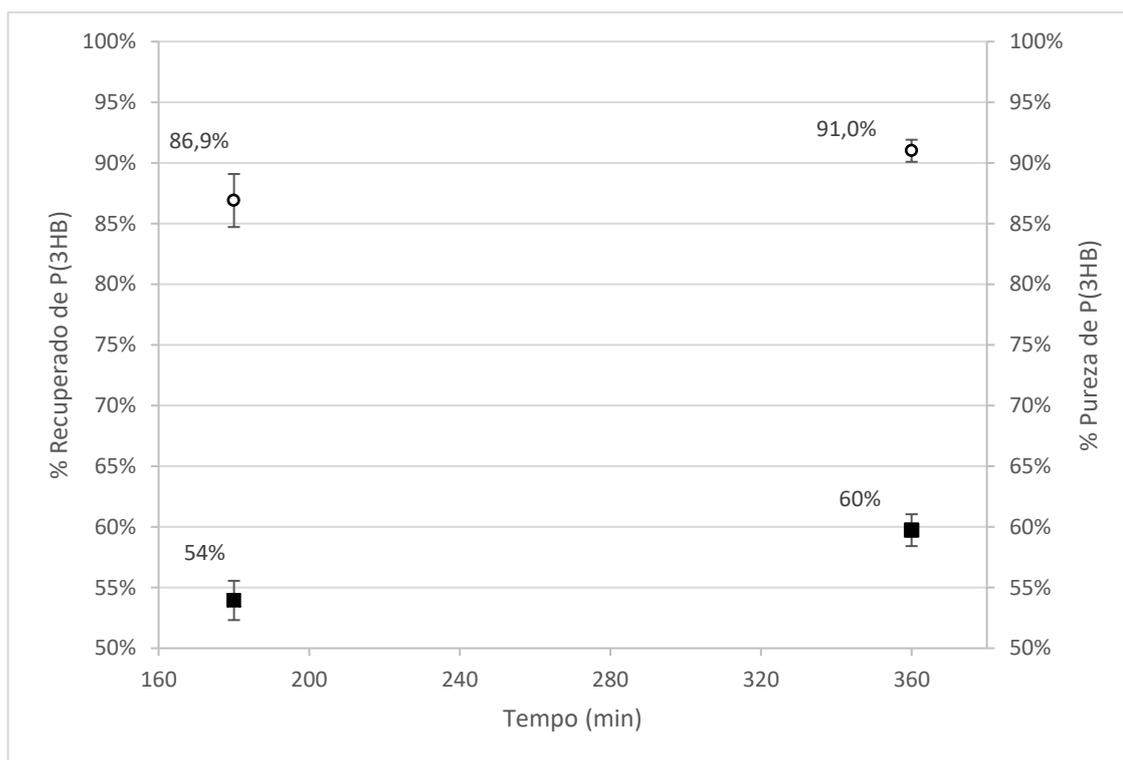


Figura 4.11: Percentual de recuperação (■) e de pureza (○) do P(3HB) extraído a partir da biomassa de *B. megaterium* com clorofórmio (Chl) para os tempos de 180 e 360 min.

Os valores de recuperação de P(3HB) encontrados no presente trabalho foram superiores aos encontrados no trabalho de Borges, também a partir da *B. megaterium*, sendo que para o cálculo da recuperação e de pureza foram utilizadas as mesmas equações. As causas para estas diferenças não foram encontradas.

Em comparação com a metodologia de digestão enzimática aplicada neste estudo, os percentuais de pureza encontrados com o solvente foram superiores – na faixa de 90 % de pureza utilizando clorofórmio e na faixa de 80 % utilizando a enzima pancreatina. Entretanto o percentual de polímero recuperado é bem superior utilizando enzimas. Com o clorofórmio o percentual recuperado se encontra em torno de 60 %, já com as enzimas este valor é considerado 100 %. Isso se deve pelas diferentes ações entre os solventes e as enzimas, pois enquanto o

solvente solubiliza o material polimérico que depois é recuperado por evaporação, a enzima solubiliza a parede celular (e outras proteínas liberadas no meio) liberando o polímero do interior das células sem afetá-lo.

Comparando com os resultados obtidos por Dalcaton (2006) e Fiorese *et al.* (2009), que fizeram a extração a partir de bactérias gram-negativas, os valores de pureza aqui obtidos foram inferiores. Dalcaton obteve recuperação de 86 % a partir de *C. necator*, para 1 hora de contato e de 94 % para 2 h, na mesma temperatura com maior proporção de biomassa/solvente, igual a 2 % ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$). Fiorese *et al.* obtiveram 96 % de recuperação com pureza de 95 % na extração com Chl, também a partir da *C. necator*, para 2 h de contato, a 60 °C, biomassa/solvente na proporção de 2 % ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$). Estas diferenças refletem o fato de que a transferência de massa pela parede celular é bastante dificultada em bactérias Gram-positivas, como a *B. megaterium*.

Essa maior resistência a permeabilidade em bactérias Gram-positivas deve-se à estrutura da parede, conforme visto no Capítulo 2. A parede celular do *B. megaterium* é relativamente menos complexa se comparada a *C. necator*, porém é formada por várias camadas de peptidoglicanos unidos por ligações cruzadas, responsáveis por sua grande resistência mecânica. Para as bactérias Gram-negativas essa parede celular é responsável por 10 % do peso total da célula em peso seco, já para as Gram-positivas a parede representa de 30 a 70 % deste valor, desconsiderando o produto intracelular como o P(3HB) (Quines *et al.*, 2011; Tortora *et al.*, 2012).

Somado a isso, bactérias Gram-positivas contêm ácidos teicoicos, polissacarídeos que atribuem carga global negativa à parede celular. Isto pode gerar leve repulsão das moléculas de Chl da superfície celular, visto que a molécula desse solvente tem região fortemente negativa, pelo deslocamento da nuvem eletrônica atribuído a presença de três átomos de cloro na molécula (Borges, 2017; Hogg, 2005).

Novamente se torna interessante um pré-tratamento celular que seja capaz de romper ou causar fissuras ao longo da parede celular, a fim de melhorar o percentual de recuperação do polímero. As técnicas mecânicas de rompimento celular de bactérias Gram-positivas se mostram promissoras, como exemplo, o uso de uma sonda de ultrassom.

Para os experimentos realizados percebe-se uma tendência de aumento da pureza na medida em que o tempo de contato biomassa/solvente aumenta. O mesmo comportamento foi percebido no trabalho de Corrêa (2014), que avaliou a pureza do P(3HB) obtido a partir de *B. megaterium* após 1 e 48 h de contato com clorofórmio a 37 °C, encontrando 87,6 % e 100 %, respectivamente. Valappil *et al.* (2007) realizaram a extração de P(3HB) a partir da bactéria

Gram-positiva *B. cereus*, alcançando uma recuperação igual a 31 % e pureza de 92 % após um período de 48 h, também a 37 °C, utilizando a mesma proporção biomassa/solvente adotada na presente pesquisa, 1 %.

Ainda assim os valores de pureza observados nos experimentos foram inferiores aos relatados para bactérias Gram-negativas. A pureza do P(3HB) obtido após tempo de extração de 3 h, por exemplo, foi igual a $86,9 \pm 2,0$ %, enquanto o valor por Daltacon (2006) para o mesmo tempo de contato e temperatura foi de 95 %. Isso, possivelmente está relacionado também à diferença estrutural da parede celular de *Bacillus megaterium*. Supõe-se que a permeação do extrato do meio intracelular para o exterior do microrganismo seja um processo mais lento nas Gram-positivas, o que facilita a solubilização de outras moléculas orgânicas, resultando na redução da pureza do polímero obtido (Borges, 2017).

Na Figura 4.12 podemos observar o filme de biopolímero formado nesta extração após 180 minutos de contato das células com o solvente.



Figura 4.12 – Filme de biopolímero após extração com clorofórmio durante o processo de secagem.

Capítulo 5

Conclusões

5.1. Considerações Finais

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a eficiência da digestão enzimática das células Gram-positivas *Bacillus megaterium* na recuperação de P(3HB).

Dentre as enzimas testadas inicialmente, as proteases foram as enzimas que apresentaram melhores resultados de digestão da parede celular sendo estas utilizadas no planejamento fatorial *Box Behnken* para encontrar os valores ótimos operacionais de cada enzima – pH, temperatura e concentração enzimática (grama de enzima por grama de biomassa).

No presente trabalho foi possível alcançar uma boa recuperação do biopolímero mesmo sem utilizar pré-tratamentos (na faixa de 70 a 80 %). A Pancreatina foi a enzima com maior eficiência permitindo obtenção de biopolímero com maior pureza final dentre as enzimas testadas (na faixa de 80 a 85 %).

A análise de custo-benefício das enzimas demonstrou que a Pancreatina, a Neutrase e a Alcalase possuem potencial de aplicação, com o valor de custo do produto final obtido respectivamente de 1,05, 1,10 e 1,20. Este cálculo considerou o preço do kg da enzima, a concentração enzimática ideal de cada uma, e a pureza do polímero obtido. Embora o valor das enzimas possa mudar realizando outros orçamentos, neste trabalho a Pancreatina foi escolhida como melhor opção.

A utilização de ultrassom como pré-tratamento foi positiva para a fragilização da parede celular das células de *B. megaterium*, alcançando um polímero com pureza de 70 % com a intensidade do ultrassom de 50 % por apenas 4 minutos. Além disso, para essa mesma

intensidade de ultrassom (50 %) e utilizando 4 % da enzima Pancreatina, foi possível obter um biopolímero com 80,7 % de pureza. Da metodologia combinada do pré-tratamento com sonificador e digestão enzimática já foi possível reduzir a quantidade de enzima utilizada e se obter aproximadamente um P(3HB) com mesmo percentual de pureza utilizando apenas enzima com uma maior concentração. Além disso, de acordo com estudos publicados na literatura, este pré-tratamento não afeta a massa molar do biopolímero.

A extração com clorofórmio resultou em percentuais de pureza mais altos (90 %) em relação à digestão enzimática (80 %), porém com percentuais de recuperação mais baixos (60 % contra 100 % para digestão enzimática). Outra desvantagem da utilização desse solvente nocivo para extração é a alteração de algumas características do biopolímero final, diversos autores na literatura discutem as alterações causadas.

Desta forma, podemos concluir que a metodologia de digestão enzimática descrita neste trabalho possui grande potencial de aplicação, principalmente associada a algum pré-tratamento celular que além de fragilizar a parede celular bacteriana possibilita alcançar os mesmos níveis de pureza do produto final com menor concentração enzimática. Estes dois tratamentos combinados – pré-tratamento com ultrassom seguido da digestão enzimática – seriam uma possibilidade de recuperar o biopolímero poli(3-hidroxi-butirado) sem a utilização de produtos químicos nocivos, além de não causar danos ao produto final.

5.2. Trabalhos Futuros

A fim de complementar esta pesquisa seria importante realizar análises sobre as propriedades mecânicas do produto final obtido após o pré-tratamento, e após as metodologias com clorofórmio e com a digestão enzimática. Desta forma, a confirmação com os dados da literatura sobre as propriedades do P(3HB) após diferentes metodologias de recuperação poderia ser feita.

Além disso, seria interessante realizar mais ensaios com a sonda de ultrassom, a fim de avaliar diferentes tempos e intensidades para fragilização da parede celular de bactérias gram-positivas. Embora seja um método simples, com o aumento da intensidade da sonda ultrassônica temos também o aumento da temperatura da solução, o que poderia afetar a fragilidade celular, ou então seria necessário avaliar o uso de um sistema de refrigeração.

Com as enzimas ainda podem ser realizados testes com a combinação de enzimas que apresentam maior atividade nas mesmas faixas operacionais (de pH e temperatura). E testes para a reutilização de enzimas para mais de um ciclo de reações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, P. B. S.; MALAFAIA, C. B. Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, n. PartA, p. 615–625, 2018.
- BERGER, E. *et al.* PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. **Biotechnology Techniques**, v. 3, n. 4, p. 227–232, 1989.
- BISSACOT, E. P. **Comparação de diferentes metodologias para purificação de PHA: uma revisão bibliográfica.** [s.l: s.n.].
- BORGES, F. Avaliação do desempenho de solventes não-halogenados na extração do poli (3-hidroxitirato) a partir de *Bacillus megaterium*. p. 84, 2017.
- BROWN, S. *et al.* Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 313–336, 2013.
- CAVALHEIRO, J. M. B. T. *et al.* Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 509–515, 2009.
- CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 621–632, 2010.
- CHEN, Y. *et al.* Recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Alcaligenes eutrophus* by surfactant-chelate aqueous system. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 153–157, 1999.
- COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. **The Cell: A Molecular Approach**, 4th ed. 4. ed.
- COPELAND, R. A. **Chemical Mechanisms in Enzyme Catalysis.** 7. ed.
- Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis. **Enzymes**, v. 7, p. 385–386, 2000b.
- CÔRREA, M. P. Extração do biopolímero P(3HB) com solvente renovável. p. 64, 2014.
- DALCANTON, F. Produção, extração e caracterização de Poli(3-hidroxitirato) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos. p. 150, 2006.
- DAUVERGNE, P. Why is the global governance of plastic failing the oceans? **Global Environmental Change**, v. 51, n. May, p. 22–31, 2018.
- FACCIN, D. J. L. **Avaliação de condições de cultivo para aumento da produção de P (3HB) por *Bacillus megaterium* e modelagem do bioprocesso.**

FERREIRA, S. L. C. *et al.* Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, n. 2, p. 179–186, 2007.

FIORESE, M. L. *et al.* Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, n. 6, p. 454–461, 2009.

GHATNEKAR, M. S.; PAI, J. S.; GANESH, M. Production and recovery of poly-3-hydroxy- butyrate from *Methylobacterium* sp V49. v. 448, n. July 2001, p. 444–448, 2002.

GOUDA, M. K. . *et al.* Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. **Microbiological Research**, v. 156, n. 3, p. 201–207, 2001.

GURUNG, N. *et al.* A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

HANNA, P. C. .; IRELAND, J. A. W. . Understanding *Bacillus anthracis* pathogenesis. **Trends in Microbiology**, n. 5, p. 180–182, 1999.

HARRISON, S. T. L. Bacterial cell disruption: A key unit operation in the recovery of intracellular products. **Biotechnology Advances**, v. 9, n. 2, p. 217–240, 1991.

HASSEMER, G. DE S. Produção de P(3HB) Por *Bacillus megaterium* Utilizando Permeado de Soro de Leite. p. 65, 2016.

HEJAZI, P. *et al.* Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* for Poly(β -hydroxybutyrate) Recovery. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 5, p. 1519–1523, 2003.

HOGG, S. **Essential Microbiology**.

HOLMES. Application of PHB: a microbially produced biodegradable thermoplastic. **Physics in Technology**, v. 32, n. 16, p. 32–36, 1985.

HONG, S. G.; HSU, H. W.; YE, M. T. Thermal properties and applications of low molecular weight polyhydroxybutyrate. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 2, p. 1243–1250, 2012.

JACQUEL, N. *et al.* Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 1, p. 15–27, 2008.

JAMBECK, J. R. *et al.* Plastic waste inputs from land into the ocean. **Sciencemag.org**, n. 6223, 2015.

KAPRITCHKOFF, F. M. *et al.* Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. **Journal of Biotechnology**, v. 122, n. 4, p. 453–462, 2006.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 607–619, 2005.

KOLLER, M.; NIEBELSCHÜTZ, H.; BRAUNEGG, G. Strategies for recovery and purification of

poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass. **Engineering in Life Sciences**, v. 13, n. 6, p. 549–562, 2013.

KOTIRANTA, A. *et al.* Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **DNA and Cell Biology**, v. 21, n. 5, p. 367–373, 2000.

KULPREECHA, S. *et al.* Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 3, p. 240–245, 2009.

KUSAKA, S. *et al.* Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in a recombinant *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 140–143, 1997.

LEBRETON, L. C. M. *et al.* River plastic emissions to the world's oceans. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–10, 2017.

LEE, SANG YUP; CHANG, H. N. High cell density cultivation of *Escherichia Coli* W using sucrose as a carbon source. **Engineering Research Center and Department**, v. 15, n. 9, p. 971–974, 1993.

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

LEE, S.; CHOI, J.; HAN, H.; SONG, J.Y.; Removal of endotoxin during purification of poly(3-hydroxybutyrate) from gram-negative bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2762–2764, 1999.

LING, Y. *et al.* Pilot-scale extraction of PHB from recombinant *E. coli* by homogenization and centrifugation. **Bioseparation**, v. 7, n. 1, p. 9–15, 1998.

LÖHR, A. *et al.* Solutions for global marine litter pollution. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, v. 28, p. 90–99, 2017.

LÓPEZ-ABELAIRAS, M. *et al.* Comparison of several methods for the separation of poly(3-hydroxybutyrate) from *Cupriavidus necator* H16 cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 250–259, 2015.

MA, H. *et al.* Effect of energy-gathered ultrasound on Alcalase. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 1, p. 419–424, 2011.

MARTINS, J. E. C. A. *et al.* Delineamento Box-Behnken para remoção de DQO de efluente têxtil utilizando eletrocoagulação com corrente contínua pulsada. **Eng Sanit Ambient**, p. 1055–1064, 2017.

MERRICK, J. M.; DOUDOROFF, M. DEPOLYMERIZATION OF POLY-beta-HYDROXYBUTYRATE BY AN. **Journal of Bacteriology**, v. 88, n. 1, p. 60–71, 1964.

MOKHTARI-HOSSEINI, Z. B. *et al.* Effect of feed composition on PHB production from methanol by HCDC of *Methylobacterium extorquens* (DSMZ 1340). **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 8, p. 1136–1139, 2009.

- MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Applied Statistics and Probabilty for Engineers**.
- NARANJO, J. M. *et al.* Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 38–44, 2013.
- NEVES, A. L. DE P. Uso de enzimas na extração de polihidroxialcanoatos sintetizados por *Cupriavidus necator*. 2009.
- NKWACHUKWU, O. *et al.* Focus on potential environmental issues on plastic world towards a sustainable plastic recycling in developing countries. **International Journal of Industrial Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 34, 2013.
- NODA, I. **Process for recovering polyhydroxyalkanoates using air classification, Solvent extraction of polyhydroxy-alkanoates from biomass facilitated by the use of marginal nonsolvent, U.S. Patent 5,849,854 (1998)**., 1995.
- NOVAES, C. G. *et al.* Optimization of analytical methods using response surface methodology. **Revista Virtual de Quimica**, v. 10, n. 2, p. 393–420, 2018.
- OU, K. *et al.* Effect of neutrase, alcalase, and papain hydrolysis of whey protein concentrates on iron uptake by Caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4894–4900, 2010.
- PARK, S. J.; PARK, J. P.; LEE, S. Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* in a pilot-scale fermenter. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 3, p. 185–189, 2002.
- PEÑA, C. *et al.* Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): A review of recent research work. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 278–293, 2014.
- POIRIER, Y.; NAWRATH, C.; SOMERVILLE, C. Production of Polyhydroxyalkanoates, a Family of Biodegradable Plastics and Elastomers, in *Bacteria and Plants*. **Biotechnology Letters**, 1995.
- POSADA, J. A. *et al.* Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 310–317, 2011.
- POVOLO, S. *et al.* Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 20, p. 7902–7907, 2010.
- QUINES, L. K. *et al.* Extração de Poli(3-hidroxibutirato), produzido por *Cupriavidus necator*, com carbonato de propileno e ultrassom. p. 1–7, 2011.
- QUINES, L. K. DE M. Extração de poli(3-hidroxibutirato), produzido por *Cupriavidus necator*, utilizando carbonato de propileno combinado com métodos mecânicos. **Quimica Nova**, v. 38, n. 2, p. 214–220, 2015.
- QUINES, L. K. M. *et al.* Métodos de extração de poli-hidroxialcanoatos a partir de biomassa

bacteriana. v. 38, n. 9, p. 1207–1218, 2015.

RAMSAY, J. A. *et al.* Extraction of Poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. **Biotechnology Progress**, v. 8, n. 8, p. 589–594, 1994.

REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. **Biotechnology: Enzymes, Biomass, Food and Feed.**

REITH, J.; MAYER, C. Peptidoglycan turnover and recycling in Gram-Positive bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 1, p. 1–11, 2011.

RIBEIRO, F. *et al.* Accumulation and fate of nano- and micro-plastics and associated contaminants in organisms. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 111, p. 139–147, 2018.

RIEDEL, S. L. *et al.* Recovery of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from *Ralstonia eutropha* cultures with non-halogenated solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 2, p. 461–470, 2013.

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

SATHIYANARAYANAN, G. *et al.* Optimization of polyhydroxybutyrate production by marine *Bacillus megaterium* MSBN04 under solid state culture. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, n. April 2014, p. 253–261, 2013.

STEEN, A. Functional characterisation and cell wall interactions of peptidoglycan. 2005.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 25, n. 10, p. 1503–1555, 2000.

SUZUKI, D. V. *et al.* Purification of polyhydroxybutyrate produced by *Burkholderia cepacia* IPT64 through a chemical and enzymatic route. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 771–775, 2008.

TAMER, M.; MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. Disruption of *Alcaligenes latus* for recovery of poly(β -hydroxybutyric acid): Comparison of high-pressure homogenization, bead milling, and chemically induced lysis. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 37, n. 5, p. 1807–1814, 1998.

TORTORA, G. J. *et al.* **Microbiologia**. 10^a ed.

VALAPPIL, S. P. *et al.* Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: Insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 91, n. 1, p. 1–17, 2006.

VALAPPIL, S. P. *et al.* Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. **Journal of Biotechnology**, v. 132, n. 3, p. 251–258, 2007.

VILLANO, M. *et al.* Polyhydroxyalkanoates production with mixed microbial cultures: From

culture selection to polymer recovery in a high-rate continuous process. **New Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 289–296, 2014.

VIZCAINO-CASTON, I. *et al.* Development of a rapid method to isolate polyhydroxyalkanoates from bacteria for screening studies. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 1, p. 101–104, 2016.

WALPOLE, R. *et al.* **Probability & Statistics**. [s.l: s.n.].

WANG, F. AND LEE, S. Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus* under Nitrogen Limitation. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 63, p. 3703–3706, 1997.

WANG, X. *et al.* Chapter 2: Purification and Characterization of Lipopolysaccharides. **BioPharm International**, v. 24, n. 8, p. 14–17, 2011.

YASOTHA, K. *et al.* Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, n. 3, p. 260–268, 2006.

ZHANG, Y. *et al.* Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using *Bacillus megaterium* R11. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 307–314, 2013.

ZINN, M. *et al.* Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. **elsevier**, v. 22, n. 47, p. 5–21, 2001.

Apêndice 1

CULTIVO

O cultivo foi realizado em 3 etapas: pré-inóculo, inóculo e cultivo, a fim de alcançar a maior biomassa possível e a maior concentração de polímero no interior da célula. Para o tempo de cultivo foram analisados os dados da dissertação de Luvizetto (2007). A partir dos dados experimentais foi possível criar um gráfico e analisar em relação ao tempo de cultivo os valores de biomassa total e percentual de biopolímero no interior das células. Como é de interesse deste trabalho o rompimento das células para obter o grânulo intracelular de polímero, e obter células com a maior reserva de carbono possível em seu interior, ou seja, o maior percentual possível de P(3HB), o tempo escolhido foi de 20 horas para o cultivo das células de *B. megaterium*. Abaixo é apresentado o gráfico dos dados adaptados da autora em que podemos observar circulado em cinza o porquê desta escolha.

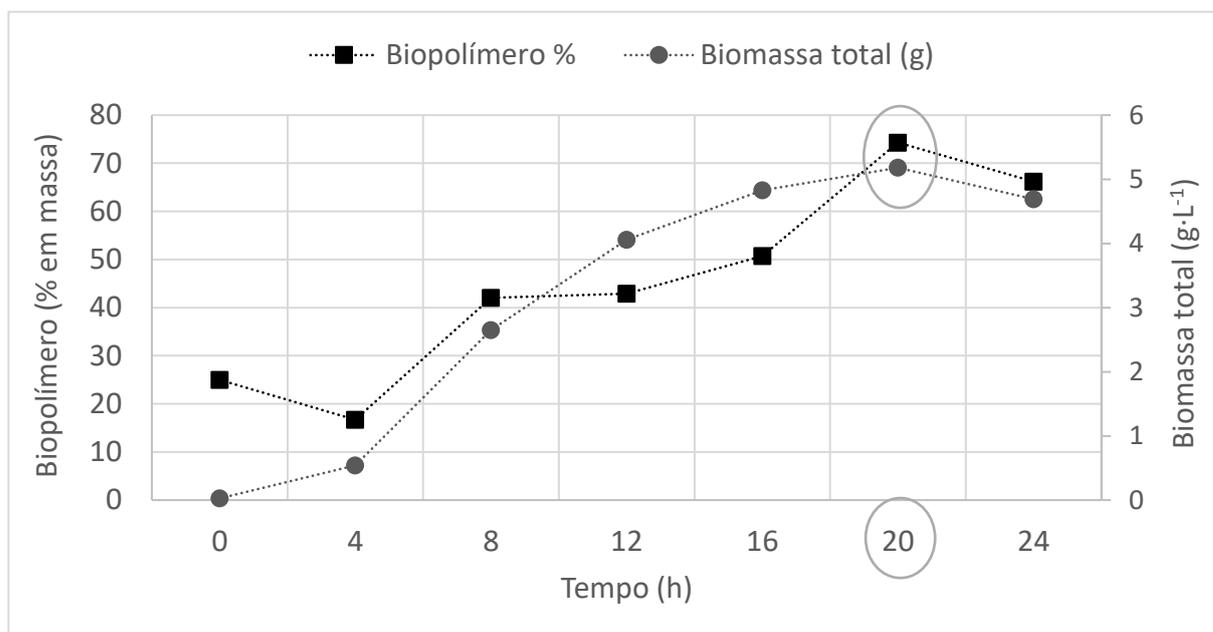


Figura A1.1: Gráfico do cultivo realizado por Luvizetto (2007) nas condições de 16 g·L⁻¹ de sacarose e fonte de nitrogênio 2 g·L⁻¹.

Após a etapa de cultivo, as células são liofilizadas, porém neste processo são formados alguns aglomerados de células, o que não é favorável ao processo de recuperação de polímero, seja por um solvente ou por digestão, pois ambos necessitam entrar em contato com a parede celular bacteriana. Desta forma, a etapa de peneiração se torna essencial para a homogeneização

dos cultivos, além de garantir que todas as células liofilizadas possuam uma granulometria menor que o tamanho da peneira escolhida (neste trabalho *28 mesh*). Na Figura A1.2 podemos observar o antes e depois da biomassa peneirada.

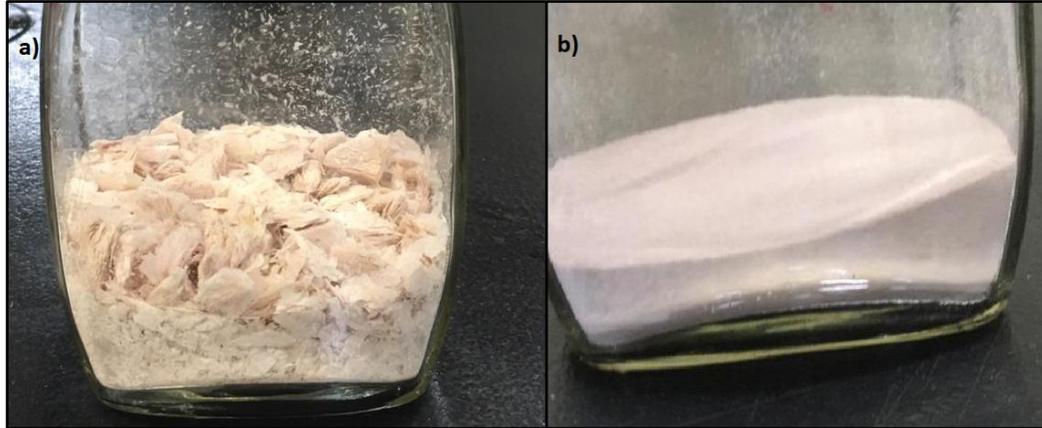


Figura A1.2: Em (a) temos a biomassa liofilizada sem peneiração e em (b) a mesma biomassa após peneiração.

Como complemento da imagem apresentada na Seção 3.1 deste trabalho, na Figura A1.3 é apresentada a mesma imagem, porém com um recorte e um zoom maior.

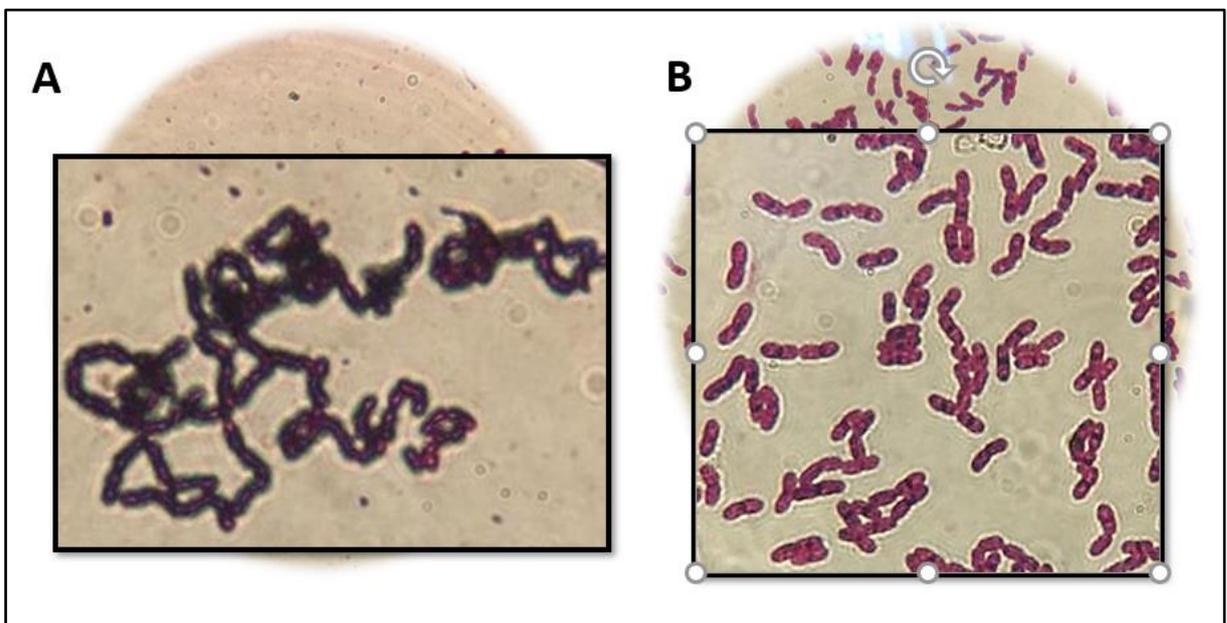


Figura A1.3: Imagens de placas com inóculo de 5 h (A) e após cultivo de 20h (B) com coloração de gram.

Apêndice 2

DIGESTÃO ENZIMÁTICA - EXPERIMENTOS PRELIMINARES

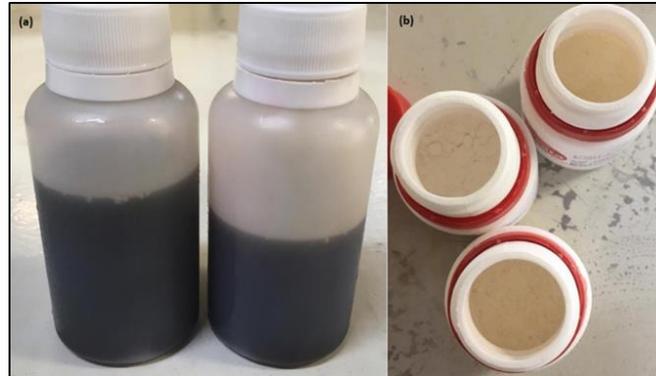


Figura A2.1: Ilustração das enzimas com preparação líquidas (a) e em pó (b).

DIGESTÃO ENZIMÁTICA - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Na Figura A2.2 podemos observar os fragmentos cerâmicos utilizados na etapa de contato enzimático no banho rotativo, como descrito na Seção 3.5.2, os fragmentos maiores com tamanho aproximado de 1cm x 1cm e os menores com aproximadamente 0,8 cm x 0,8 cm.



Figura A2.2: Fragmentos cerâmicos utilizados na etapa de contato enzimático no banho rotativo para auxiliar na agitação dos experimentos.

Nas Tabelas A2.1, A2.2, A2.3 e A2.4 são apresentados dados para as enzimas Alcalase, Neutrase, Papaína e Bromelina, dos coeficientes do modelo matemático estimados pelo software *Statistica 10*, bem como o erro padrão dos coeficientes, os respectivos valores de *t* de *Student*, as significâncias de cada coeficiente da regressão através do valor *p* e os limites de confiança (95 %). Os coeficientes estatisticamente significativos foram destacados em negrito.

Tabela A2.1: Coeficientes da regressão linear, desvio padrão dos coeficientes, valores de t e probabilidade estatística p dos coeficientes do modelo referente à pureza de P(3HB) recuperado via Alcalase.

Fatores	Efeito	Erro padrão	Valor t	Valor p	Limite confiança inferior	Limite de confiança superior
Intercepto	0,7300	0,0012	615,2596	0,0000	0,7262	0,7337
X ₁	-0,0344	0,0029	-11,8529	0,0013	-0,0437	-0,0252
X ₁ ²	-0,0208	0,0021	-10,1073	0,0021	-0,0273	-0,0142
X ₂	0,0831	0,0029	28,5802	0,0001	0,0738	0,0923
X ₂ ²	0,0312	0,0021	15,1844	0,0006	0,0247	0,0377
X ₃	-0,0302	0,0029	-10,4082	0,0019	-0,0395	-0,0210
X ₃ ²	0,0166	0,0021	8,0822	0,0040	0,0101	0,0231
X ₁ X ₂	-0,0238	0,0041	-5,7805	0,0103	-0,0368	-0,0107
X ₁ X ₃	-0,0052	0,0041	-1,2674	0,2945	-0,0183	0,0079
X ₂ X ₃	0,0065	0,0041	1,5933	0,2093	-0,0065	0,0196

Tabela A2.2: Coeficientes da regressão linear, desvio padrão dos coeficientes, valores de t e probabilidade estatística p dos coeficientes do modelo referente à pureza de P(3HB) recuperado via Neutralse.

Fatores	Efeito	Erro padrão	Valor t	Valor p	Limite confiança inferior	Limite de confiança superior
Intercepto	0,7262	0,0009	775,8381	0,0000	0,7233	0,7292
X ₁	-0,0396	0,0023	-17,2840	0,0004	-0,0469	-0,0323
X ₁ ²	0,0105	0,0016	6,4751	0,0075	0,0053	0,0157
X ₂	0,0069	0,0023	3,0118	0,0571	-0,0004	0,0142
X ₂ ²	0,0124	0,0016	7,6215	0,0047	0,0072	0,0175
X ₃	-0,0107	0,0023	-4,6704	0,0185	-0,0180	-0,0034
X ₃ ²	-0,0140	0,0016	-8,6487	0,0033	-0,0192	-0,0089
X ₁ X ₂	0,0268	0,0032	8,2643	0,0037	0,0165	0,0371
X ₁ X ₃	-0,0024	0,0032	-0,7305	0,5180	-0,0127	0,0080
X ₂ X ₃	0,0310	0,0032	9,5636	0,0024	0,0207	0,0413

Tabela A2.3: Coeficientes da regressão linear, desvio padrão dos coeficientes, valores de t e probabilidade estatística p dos coeficientes do modelo referente à pureza de P(3HB) recuperado via Papaína.

Fatores	Efeito	Erro padrão	Valor t	Valor p	Limite confiança inferior	Limite de confiança superior
Intercepto	0,7039	0,0024	288,5505	0,0000	0,6961	0,7116
x ₁	-0,0151	0,0060	-2,5279	0,0856	-0,0341	0,0039
x ₁ ²	0,0378	0,0042	8,9550	0,0029	0,0244	0,0513
x ₂	-0,0059	0,0060	-0,9916	0,3945	-0,0249	0,0131
x ₂ ²	0,0508	0,0042	12,0216	0,0012	0,0373	0,0642
x ₃	0,0113	0,0060	1,8882	0,1554	-0,0077	0,0303
x ₃ ²	-0,0066	0,0042	-1,5713	0,2142	-0,0201	0,0068
x ₁ x ₂	0,0205	0,0085	2,4205	0,0941	-0,0064	0,0473
x ₁ x ₃	0,0254	0,0085	3,0052	0,0574	-0,0015	0,0523
x ₂ x ₃	-0,0535	0,0085	-6,3369	0,0079	-0,0804	-0,0267

Tabela A2.4: Coeficientes da regressão linear, desvio padrão dos coeficientes, valores de t e probabilidade estatística p dos coeficientes do modelo referente à pureza de P(3HB) recuperado via Bromelina.

Fatores	Efeito	Erro padrão	Valor t	Valor p	Limite confiança inferior	Limite de confiança superior
Intercepto	0,6795	0,0017	395,1653	0,0000	0,6740	0,6850
x ₁	-0,0630	0,0042	-14,9462	0,0007	-0,0764	-0,0495
x ₁ ²	0,0051	0,0030	1,7280	0,1824	-0,0043	0,0146
x ₂	0,0972	0,0042	23,0701	0,0002	0,0838	0,1106
x ₂ ²	-0,0207	0,0030	-6,9624	0,0061	-0,0302	-0,0113
x ₃	0,0398	0,0042	9,4409	0,0025	0,0264	0,0532
x ₃ ²	0,0086	0,0030	2,8780	0,0636	-0,0009	0,0180
x ₁ x ₂	0,0430	0,0060	7,2177	0,0055	0,0240	0,0619
x ₁ x ₃	-0,0264	0,0060	-4,4372	0,0213	-0,0454	-0,0075
x ₂ x ₃	0,0414	0,0060	6,9559	0,0061	0,0225	0,0604

A Metodologia da Superfície de Resposta (MSR) surgiu para auxiliar na determinação de condições ótimas de variáveis independentes (fatores) em respostas de sistemas e processos. A resposta (Y) de interesse é influenciada por diversas variáveis, sendo o objetivo otimizar a

mesma. É necessário inicialmente que seja gerado um modelo empírico, a partir do qual haja uma aproximação adequada entre resposta e variáveis, podendo-se estimar e analisar os valores ótimos para esta função. Em termos de superfície, são localizados pontos estacionários, que são posições nas quais a variação de uma resposta é nula ou muito pequena em relação às variáveis, indicando pontos de máximo, mínimo ou de sela. Esses pontos localizam-se em regiões notoriamente curvas e, quando se afastam desses setores, a superfície assume pouca ou nenhuma curvatura. Assim, as superfícies podem ser representadas por polinômios lineares ou quadráticos, sendo otimizados através do método numérico *Steepest Ascent* (maximizando a resposta) ou *Descent* (minimizando a resposta) (Montgomery e Runger, 2014; Walpole *et al.*, 2012).

Na Figura A2.3 podemos observar as superfícies de resposta geradas para a enzima **Alcalase**.

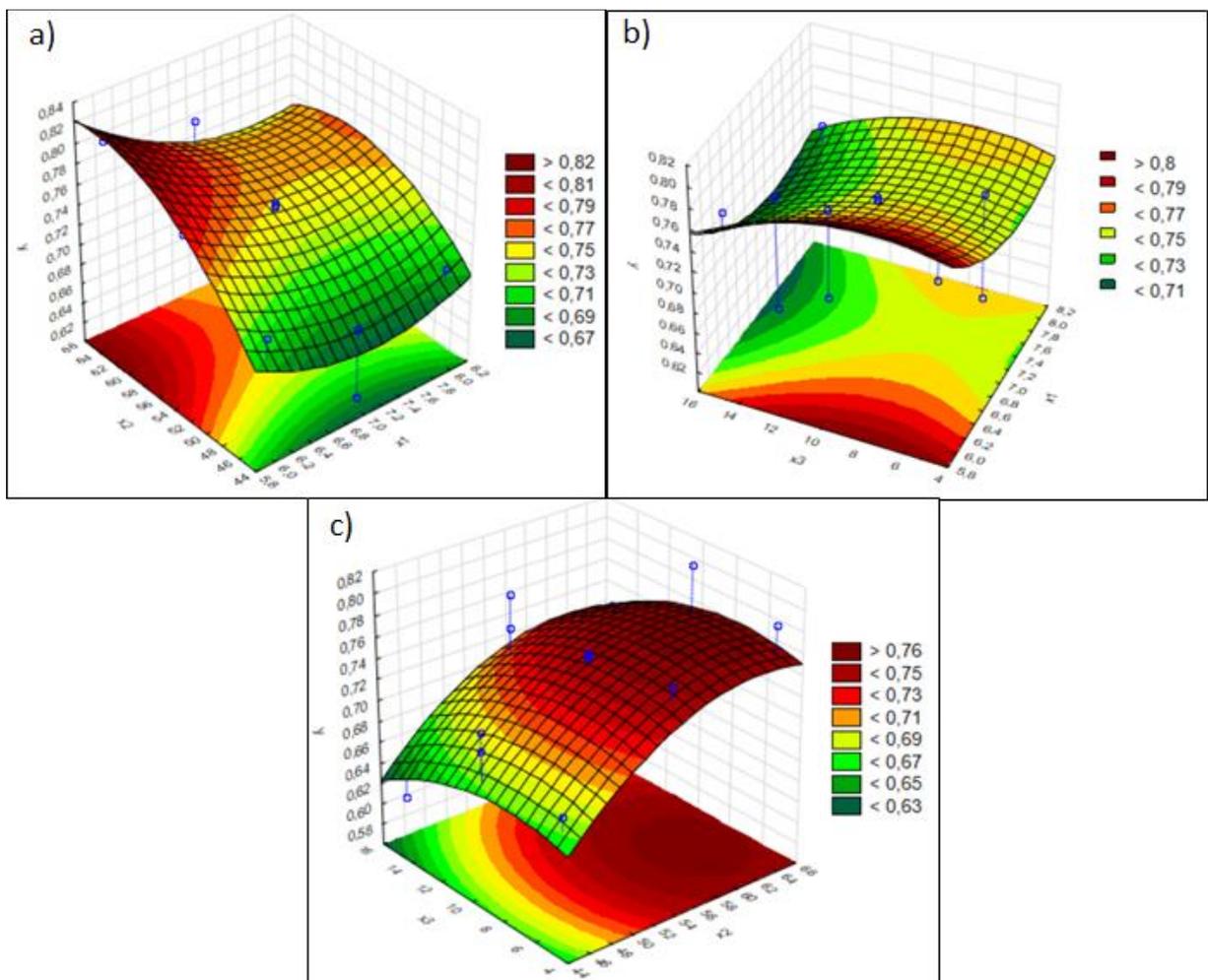


Figura A2.3: Superfície de resposta gerada para x_1 , x_2 e y em (a); x_1 , x_3 e y em (b); e x_2 , x_3 e y em (c) para a enzima Alcalase.

A Figura A2.4 ilustra o gráfico da probabilidade normal (Q-Q plot) para a enzima Alcalase.

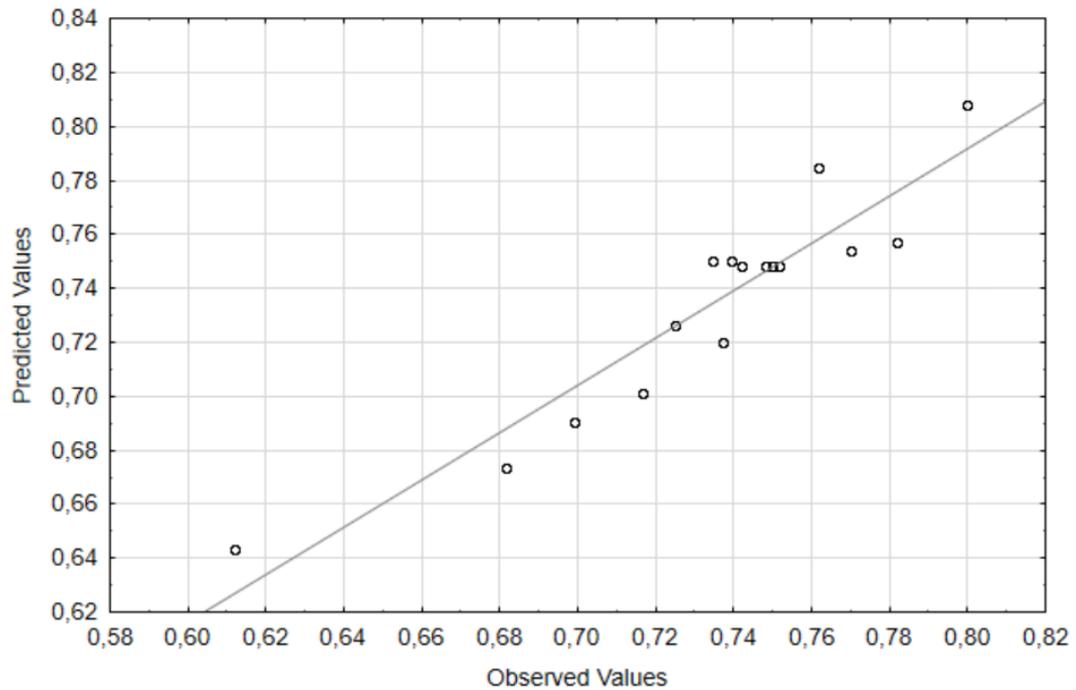


Figura A2.4: Gráfico de probabilidade normal dos resíduos para a variável de resposta recuperação de P(3HB) para a Alcalase.

A Figura A2.5 ilustra o gráfico dos resíduos versus valores preditos para a enzima Alcalase.

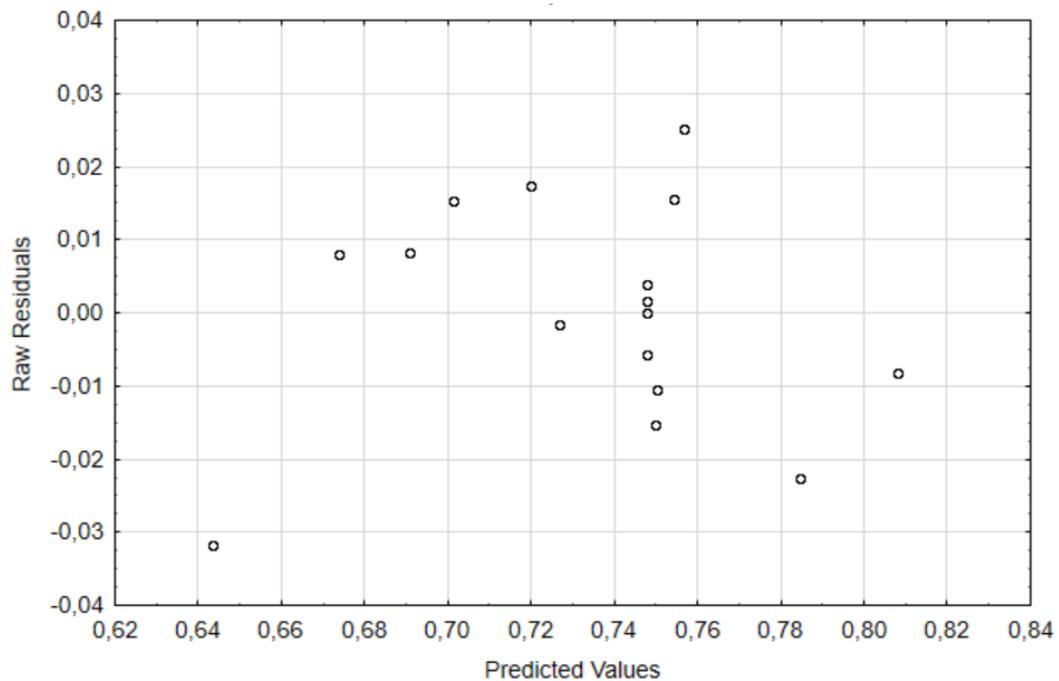


Figura A2.5: Gráfico dos resíduos versus valores preditos variável de resposta recuperação de P(3HB) para a Alcalase.

Na Figura A2.6 podemos observar as superfícies de resposta geradas para a enzima **Neutrase**.

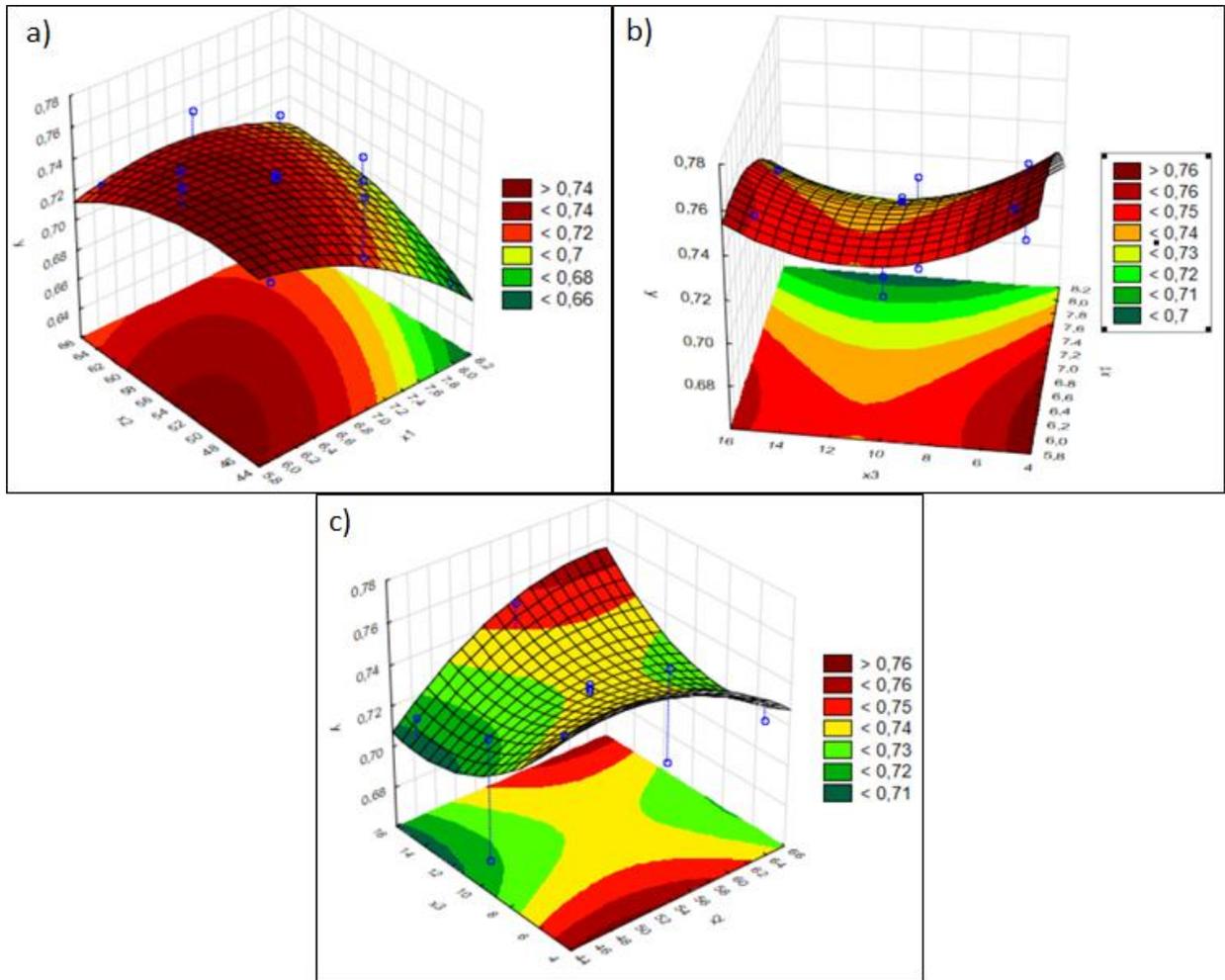


Figura A2.6: Superfície de resposta gerada para x_1 , x_2 e y em (a); x_1 , x_3 e y em (b); e x_2 , x_3 e y em (c) para a enzima Neutrase.

A Figura A2.7 ilustra o gráfico da probabilidade normal (Q-Q plot) para a enzima Neutrase.

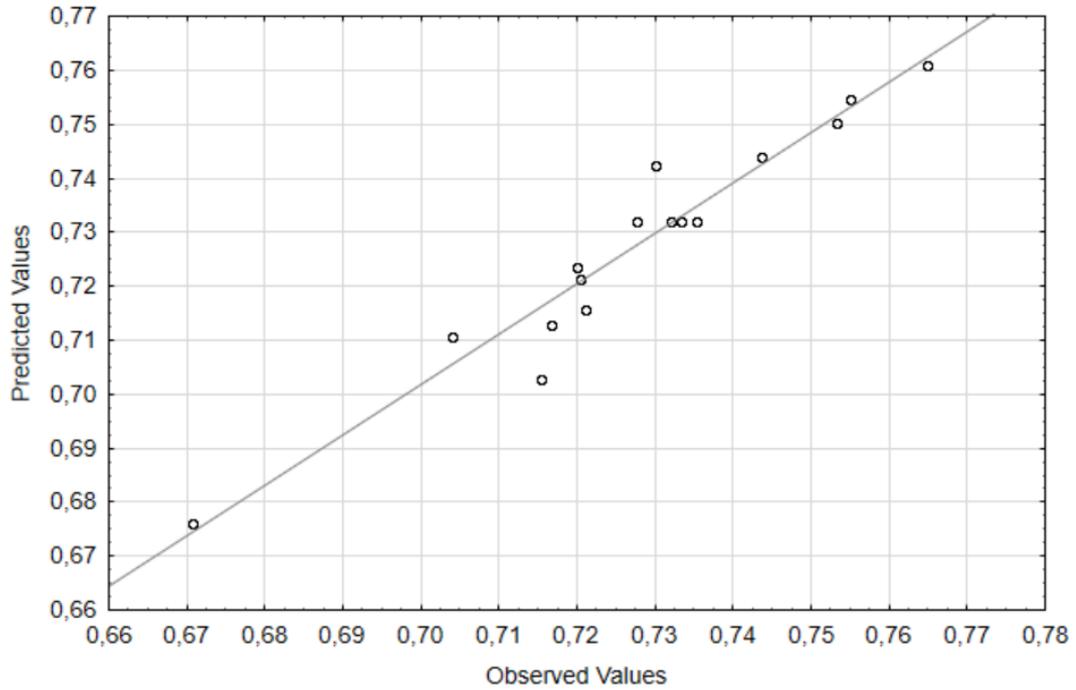


Figura A2.7: Gráfico de probabilidade normal dos resíduos para a variável de resposta recuperação de P(3HB) para a Neutrase.

A Figura A2.8 ilustra o gráfico dos resíduos versus valores preditos para a enzima Neutrase.

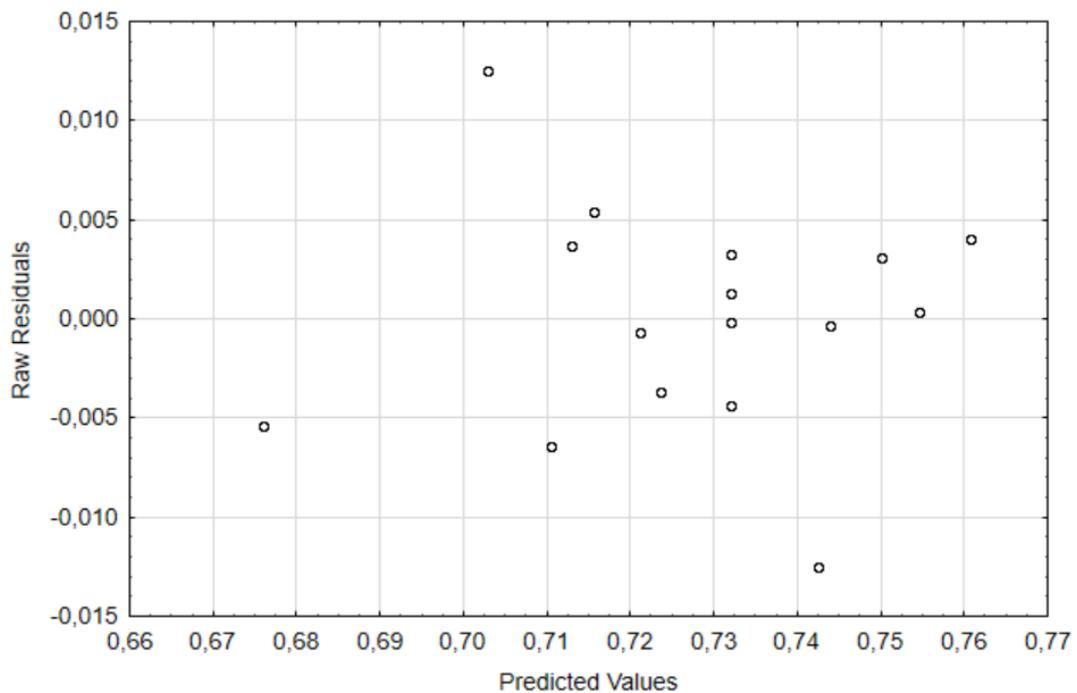


Figura A2.8: Gráfico dos resíduos versus valores preditos variável de resposta recuperação de P(3HB) para a Neutrase.

Na Figura A2.9 podemos observar as superfícies de resposta geradas para a enzima **Papaína**. Para o caso desta enzima que teve o termo x_3 linear e quadrático não significativo, a superfície de resposta será na forma 2D.

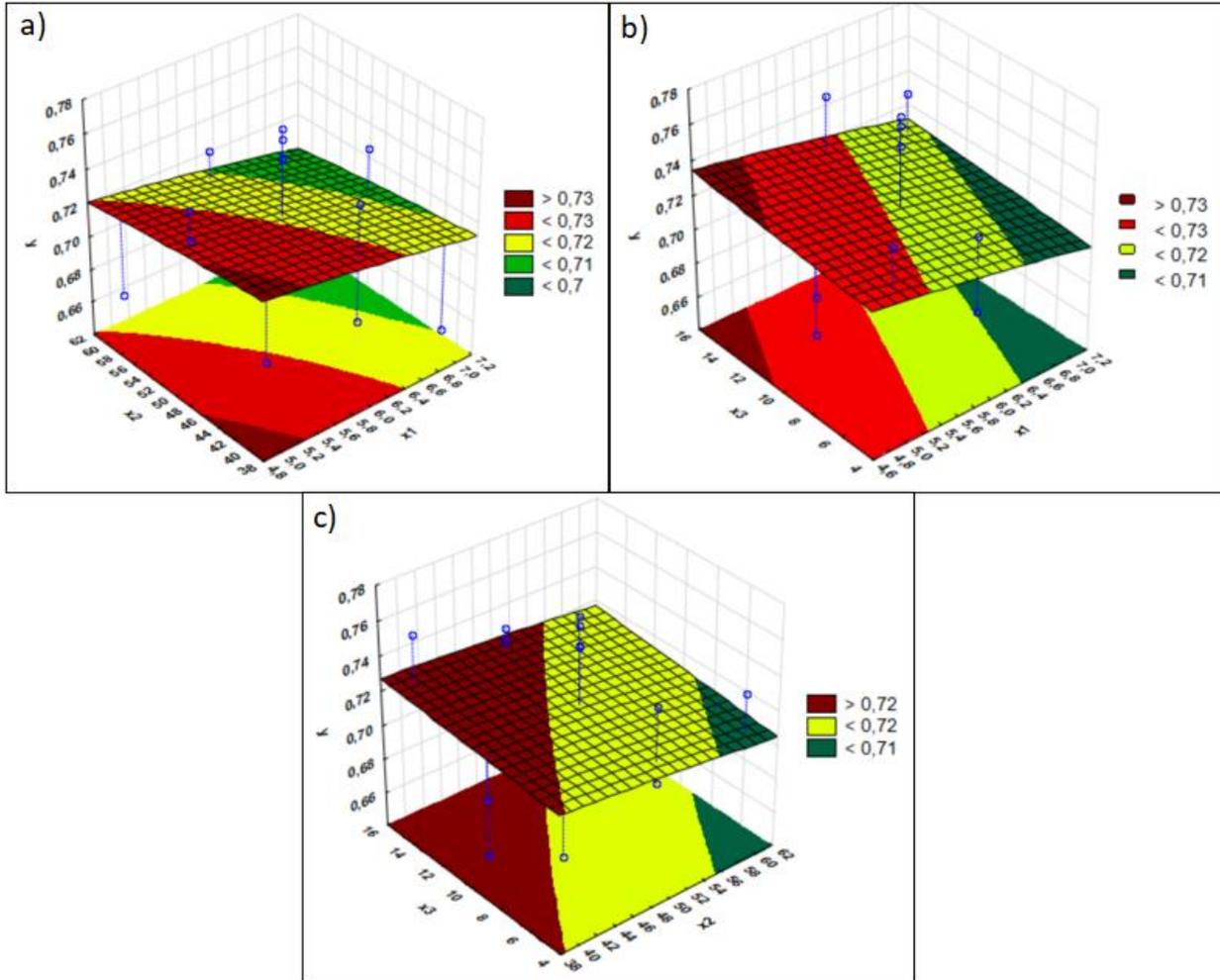


Figura A2.9: Superfície de resposta gerada para x_1 , x_2 e y em (a); x_1 , x_3 e y em (b); e x_2 , x_3 e y em (c) para a enzima Papaína.

A Figura A2.10 ilustra o gráfico da probabilidade normal (Q-Q plot) para a enzima Papaína.

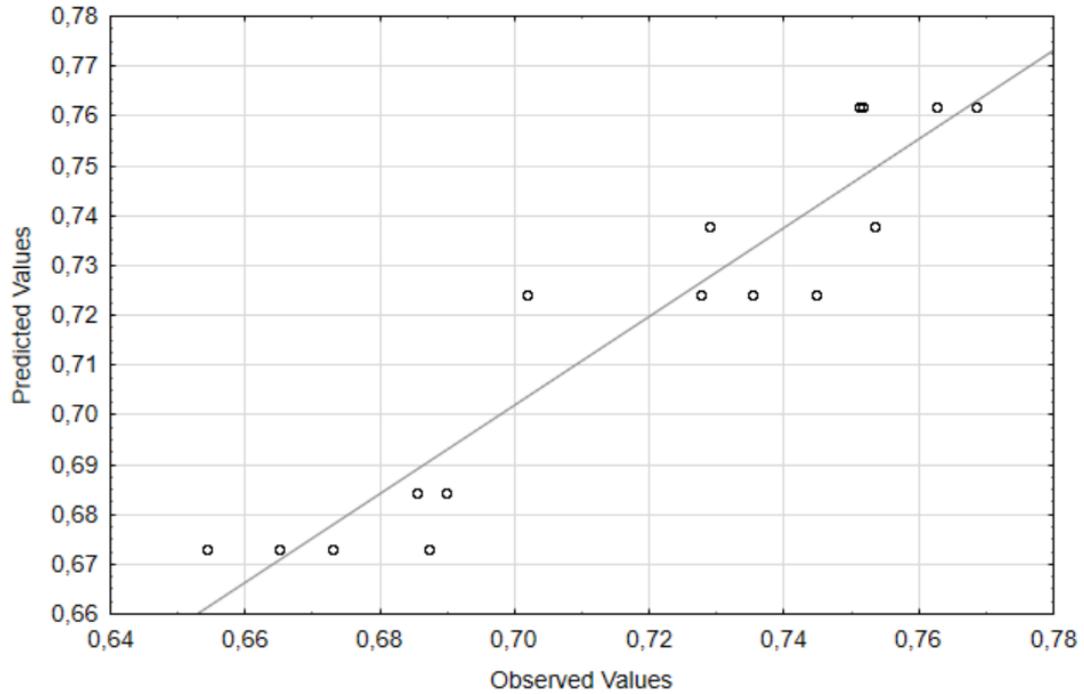


Figura A2.10: Gráfico de probabilidade normal dos resíduos para a variável de resposta recuperação de P(3HB) para a Papaína.

A Figura A2.11 ilustra o gráfico dos resíduos versus valores preditos para a enzima Papaína.

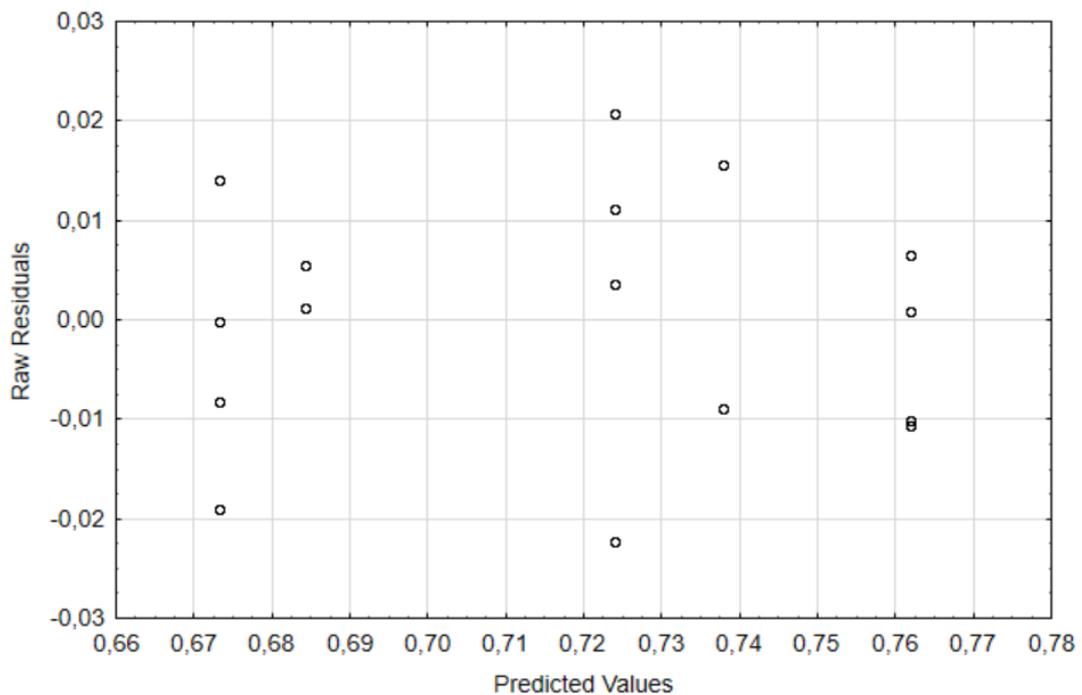


Figura A2.11: Gráfico dos resíduos versus valores preditos variável de resposta recuperação de P(3HB) para a Papaína.

Na Figura A2.12 podemos observar as superfícies de resposta geradas para a enzima **Bromelina**. Para esta enzima os termos x_2 e x_3 quadráticos não foram considerados estatisticamente significativos.

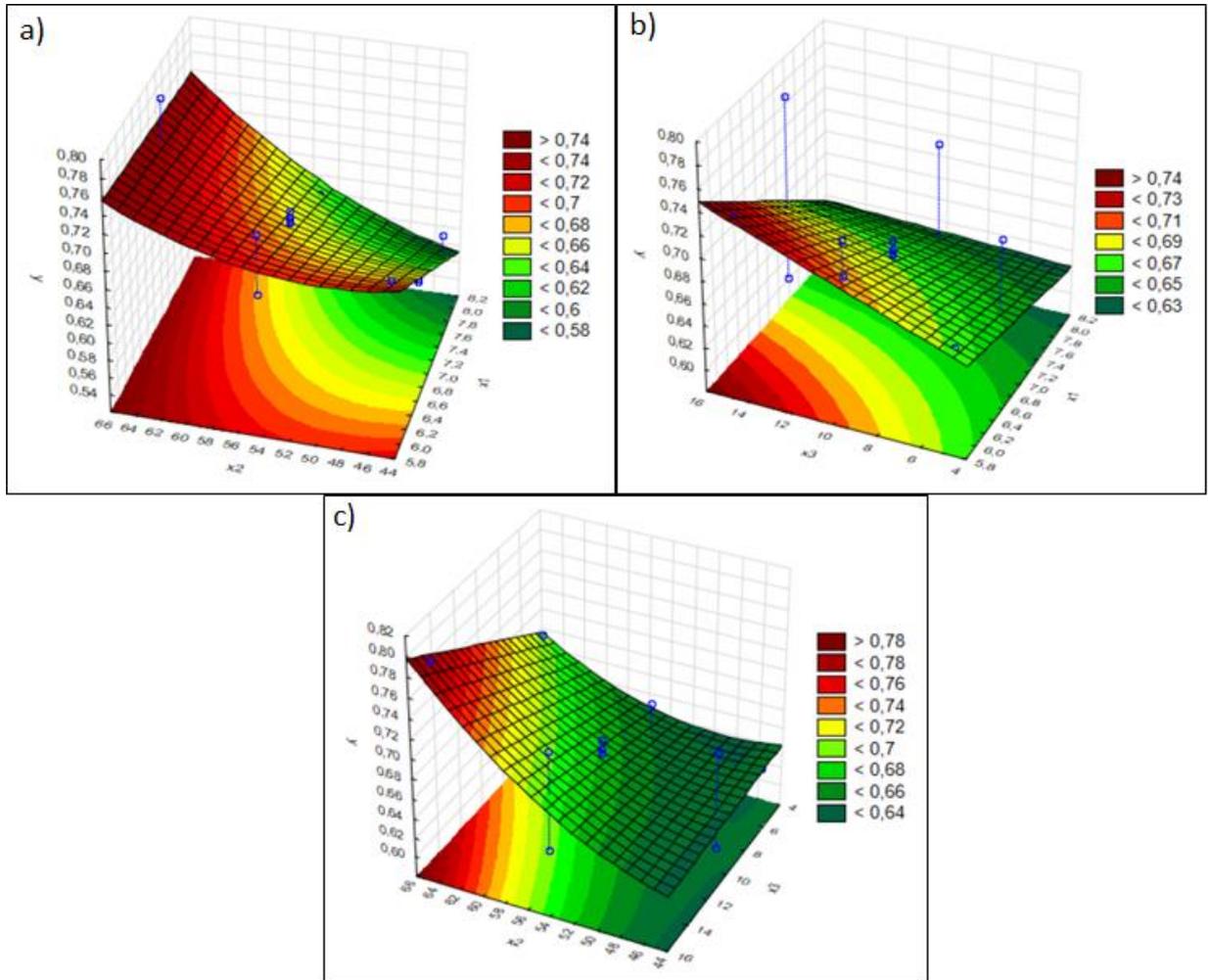


Figura A2.12: Superfície de resposta gerada para x_1 , x_2 e y em (a); x_1 , x_3 e y em (b); e x_2 , x_3 e y em (c) para a enzima Bromelina.

A Figura A2.13 ilustra o gráfico da probabilidade normal (Q-Q plot) para a enzima Bromelina.

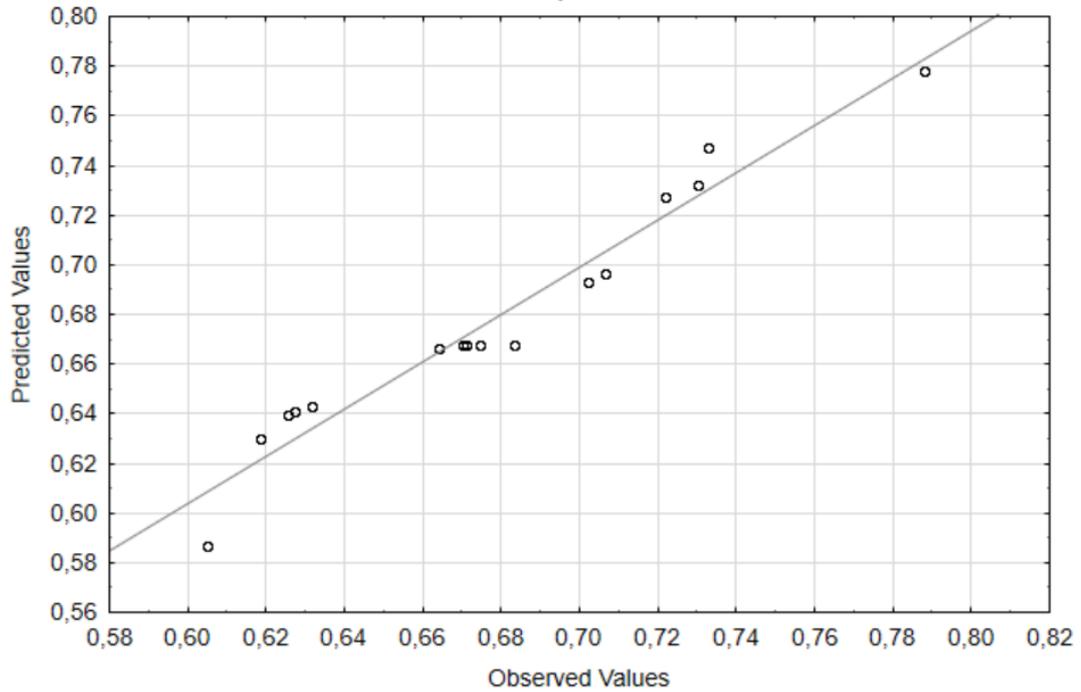


Figura A2.13: Gráfico de probabilidade normal dos resíduos para a variável de resposta recuperação de P(3HB) para a Bromelina.

A Figura A2.14 ilustra o gráfico dos resíduos versus valores preditos para a enzima Bromelina.

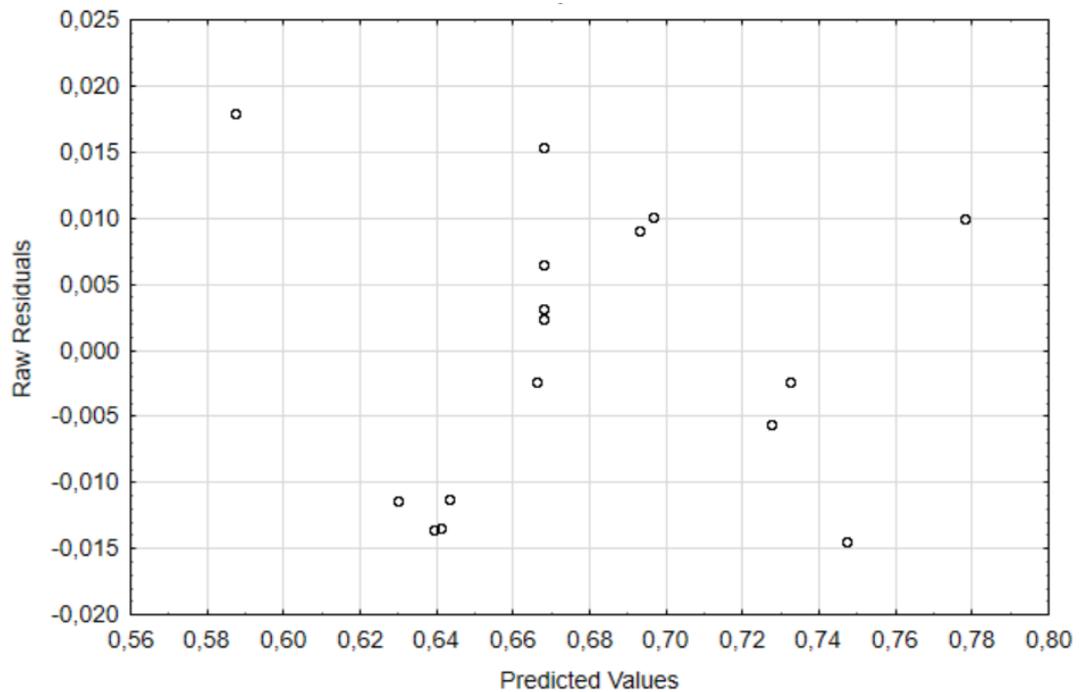


Figura A2.14: Gráfico dos resíduos versus valores preditos variável de resposta recuperação de P(3HB) para a Bromelina.

Anexo 1

DADOS DAS FICHAS TÉCNICAS

De acordo com as fichas técnicas para as enzimas com preparações líquidas, o armazenamento deve ser feito mantendo-as entre 0 e 10 °C. A embalagem deve ser mantida intacta, seca e ao abrigo da luz. Todas estas enzimas foram cedidas pela LNF-Brasil (representante Novozymes).

Tabela A4.1: Informações contidas nas fichas técnicas das enzimas de preparo líquido testadas.

Enzima	Produção via	Especificidade	Densidade aproximada (g.mL ⁻¹)	Atividade declarada
Alcalase 2.4L FG	<i>Bacillus licheniformis</i>	Endoprotease	1,17	2,4 AU-A/g
Neutrase 0.8L	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Endoprotease	1,26	0,8 AU-N/g
Pectinex® Ultra SP-L	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Poligalacturonase	1,16	3800 PGNU/ml
Viscozyme®	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Endo-beta-glucanase	1,21	100 FBG/g
Saczyme® Yield	-	Glucoamilase	1,15	900 AGU/g

Os dados encontrados nas fichas técnicas para as enzimas com preparações sólidas (em pó) constam na Tabela A4.2. Para armazenamento é indicado guardar em geladeira.

Tabela A4.2: Informações contidas nas fichas técnicas das enzimas de estado sólido testadas.

Enzima	Origem	Especificidade	Atividade declarada	Procedência
Bromelina	<i>Fungica Ananas comosus</i> (fruto abacaxi)	Endoprotease	305 BTU/g	Prozyn
Papaína	<i>Carica papaya</i> (fruto mamão)	Endoprotease	112 USP u/mg	Fragon
Pancreatina	-	Endoprotease	6100 units/mg	Valdequímica